

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **026731**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.05.31

(21) Номер заявки
201171417

(22) Дата подачи заявки
2010.05.20

(51) Int. Cl. **C07H 19/10** (2006.01)
C07H 19/073 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

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

(43) **2012.05.30**

(56) **WO-A2-2008121634**

(86) **PCT/US2010/035641**

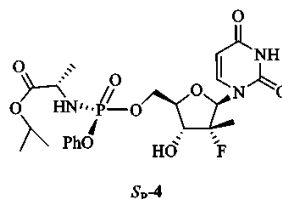
(87) **WO 2010/135569 2010.11.25**

(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 Бьён-квон, Ван Пейюань (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н., Павловский А.Н. (RU)

(57) В изобретении описан нуклеозидный фосфорамидат формулы S_p-4 и его применение в качестве агента для лечения вирусных заболеваний. Данное соединение является ингибитором РНК-зависимой 5' РНК вирусной репликации и является полезным в качестве ингибитора NS5В полимеразы вируса гепатита С, в качестве ингибитора репликации вируса гепатита С и для лечения инфекции гепатита С у млекопитающих. Также описан способ лечения вирусной инфекции гепатита С, включающий введение субъекту соединения формулы S_p-4 .

**B1****026731****026731****B1**

Данная заявка подана 20 мая 2010 г. как международная патентная заявка по процедуре РСТ от имени Pharmasset, Inc., национальной корпорации США, заявителя для указания всех стран, за исключением США и Майкла Джозефа София и Брюса С. Росса, оба из которых являются гражданами США, Ганапати Редди Памулапати и Сугуна Рачаконда, оба из которых являются гражданами Индии, Хаи-Рен Жанг, гражданина США, Бийонг-Квон Чун, гражданина республики Корея и Пейюан Ванг, гражданина Китая, заявителей для указания только США и заявляет приоритет предварительной патентной заявки США серийные номера 61/179923, поданной 20 мая 2009 г., и 61/319519, поданной 31 марта 2010 г., объекты которых включены в данную заявку полностью путем ссылки.

Область техники

В изобретении описаны нуклеозидные фосфорамидаты и их применение в качестве средств для лечения вирусных заболеваний. Данные соединения являются ингибиторами РНК-зависимой РНК вирусной репликации и являются полезными в качестве ингибиторов NS5В 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 десяти-двадцати процентов 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, ограниченное 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, Е1 и Е2 и не структуральных белков NS2, NS3, NS4А и NS4В и NS5А и NS5В. Неструктуральные (НС) белки, как считают, должны обеспечивать каталитический механизм для вирусной репликации. NS3 протеаза высвобождает NS5В, РНК-зависимую РНК полимеразу, из полипротеиновой цепи. NS5В полимеразу вируса гепатита С необходима для синтеза двухцепочечной РНК из одноцепочечной вирусной РНК, которая служит темплатой в цикле репликации вируса гепатита С. Поэтому NS5В полимеразу считают необходимым компонентом в комплексе репликации вируса гепатита С (K. Ishi, et al. *Heptology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118). Ингибирование полимеразы NS5В 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 связанности (Calisher et al., *J. Gen. Virol.*, 1993, 70, 37-43). Клинические симптомы варьируются и включают лихорадку, энцефалит и геморрагическую 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 геморрагическую 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, 641-643).

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) приводит 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 Virus 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 А, GB вирус А-подобные агенты, GB вирус-В и GB вирус-С (который также называют вирусом гепатита G, HGV). Гепацивирусная 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 гепацивирусами в сочетании с низкой способностью гепацивирусов 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 гепацивирусов 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 карбоксиконца. Две трети ORF имеют название неструктуральных (NS) белков. Генетическая организация и белковая обработка неструктуральной белковой части ORF для пестивирусов и гепацивирусов очень схожа. Как для пестивирусов, так и для гепацивирусов зрелые неструктуральные (NS) белки в последовательном порядке от аминоконца неструктурального белка, кодирующего область к карбоксиконцу ORF, состоит из p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B.

NS белки пестивирусов и гепацивирусов 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 гепацивирусов имеют мотивы, характеристичные для РНК-направленных РНК полимераз (Koonin, E.V. and Dolja, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Действительные роли и функции NS белков пестивирусов и гепацивирусов 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; Warrenner and Collett, *J. Virol.* 1995, 69, 1720-1726). Наконец, NS5B белки пестивирусов и гепацивирусов 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 мишеней для разработки лекарственных средств, противовирусных препаратов, непосредственно воздействия, таких как терапевтические средства против вируса гепатита С, включая, но не ограничиваясь приведенным, NS2-NS3 аутопротеазу, NS3 протеазу, NS3 геликазу и NS5B полимеразу. РНК-зависимая РНК полимераз 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; Carrol, 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.

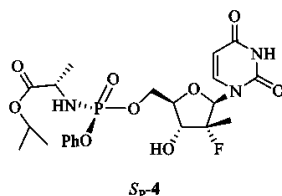
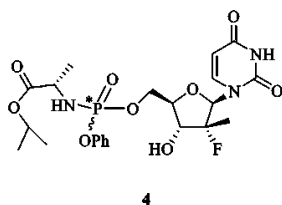
Нуклеозидные ингибиторы NS5B полимеры могут действовать либо в качестве неструктурального субстрата, что приводит к обрыванию цепи, или в качестве конкурентного ингибитора, который конкурирует с нуклеотидом за связывание полимеразы. Для функционирования в качестве агента, обрывающего цепь, нуклеозидный 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. Образование монофосфата 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 цельные 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 монофосфатного аналога по сравнению с введением родительского нуклеозида отдельно. Ферментно-опосредованный гидролиз фосфатного сложноэфирного фрагмента приводит к получению нуклеозидного монофосфата, в котором изначальное фосфорилирование, ограничивающее скорость, является необязательным. Для этого в патентной заявке США №12/053015, 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 изобретении описано соединение, представленное формулой 4 и его фосфорсодержащие диастереомеры, представленные формулами S_P-4 и R_P-4



В соответствии с представленной формулой изобретения настоящее изобретение относится к фосфорсодержащему диастереомеру, представленному формулой S_p-4 .

Краткое описание чертежей

- Фиг. 1 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения 4;
 фиг. 2 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения R_p-4 ;
 фиг. 3 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения S_p-4 (форма 1);
 фиг. 4 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения S_p-4 (форма 1);
 фиг. 5 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (форма 2);
 фиг. 6 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения $S_p-4 \cdot CHCl_3$ (форма 3);
 фиг. 7 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения S_p-4 (форма 4);
 фиг. 8 - дифрактограмма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения S_p-4 (форма 5);
 фиг. 9 - дифрактограмма 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 $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (форма 2);
 фиг. 12 - рентгеновская кристаллическая (анизотропная) структура для $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (форма 2);
 фиг. 13 - рентгеновская кристаллическая структура для $S_p-4 \cdot CHCl_3$ (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. 20A - рентгеновская кристаллическая структура для 8 (S_p -изомер) (молекула №1 асимметричного элемента);
 фиг. 20B - рентгеновская кристаллическая структура для 8 (S_p -изомер) (молекула №2 асимметричного элемента).

Подробное описание изобретения

Определения.

Выражения, описывающие единственное число, как используют в данной заявке, относятся к одному или более объектам; например, соединение относится к одному или более соединениям или как минимум одному соединению. Как таковые, термины "один или более" и "как минимум один" могут быть в данной заявке как взаимозаменяемые.

Термины "необязательный" или "необязательно", как используют в данной заявке, означают, что описанные позднее событие или обстоятельство могут произойти, но не обязательно произойдут и что описание включает случаи, в которых событие или обстоятельство произойдут и случаи, в которых они не произойдут. Например, "необязательная связь" означает, что связь может присутствовать, а может не присутствовать и что описание включает одинарные, двойные или тройные связи.

Термин "Р*" означает, что атом фосфора является хиральным и имеет соответствующее обозначение по правилу Кана-Ингольда-Прелонга "R" или "S", которые имеют их принятые очевидные значения.

Термин "очищенный," как описано в данной заявке, относится к чистоте данного соединения. Например, соединение является "очищенным", если данное соединение является основным компонентом данной композиции, т.е. как минимум 50% мас./мас. чистоты. Таким образом, "очищенный" охватывает как минимум 50% мас./мас. чистоты, как минимум 60% мас./мас. чистоты, как минимум 70% чистоты, как минимум 80% чистоты, как минимум 85% чистоты, как минимум 90% чистоты, как минимум 92% чистоты, как минимум 94% чистоты, как минимум 96% чистоты, как минимум 97% чистоты, как минимум 98% чистоты, как минимум 99% чистоты, как минимум 99,5% чистоты и как минимум 99,9% чистоты, где "существенно чистый" охватывает как минимум 97% чистоты, как минимум 98% чистоты, как минимум 99% чистоты, как минимум 99,5% чистоты и как минимум 99,9% чистоты.

Термин "метаболит," как описано в данной заявке, относится к соединению, полученному *in vivo* после введения субъекту, который в этом нуждается.

Термин "приблизительно" (также представленный при помощи ~) означает, что указанное числен-

ное значение входит в диапазон, который варьируется в пределах стандартной экспериментальной ошибки.

Выражение "существенно как показано на..." указанной дифрактограммы порошковой рентгеновской дифракции означает, что положения пиков, показанные на дифрактограмме порошковой рентгеновской дифракции существенно являются аналогичными в пределах визуального исследования или обращения к отобраным перечням пиков ($\pm 0,2^\circ 2\theta$).

Средний специалист понимает, что интенсивности могут варьироваться в зависимости от образца.

Термин "существенно безводный" означает, что вещество содержит не более чем 10% по массе воды, преимущественно не более чем 1% по массе воды, более преимущественно не более чем 0,5% по массе воды и наиболее преимущественно не более чем 0,1% по массе воды.

Растворитель или антирастворитель (как используют в реакциях, кристаллизации и т.д. или растворители в решетках и/или поглощенные растворители) включает как минимум один из C₁-C₈ спирта, C₂-C₈ простого эфира, C₃-C₇ кетона, C₃-C₇ сложного эфира, C₁-C₂ хлорированного углерода, C₂-C₇ нитрила, смешанного растворителя, C₅-C₁₂ насыщенного углеводорода и C₆-C₁₂ ароматического углеводорода.

C₁-C₈ спирт относится к разветвленному/неразветвленному и/или циклическому/ациклическому спирту, имеющему такое количество атомов углерода. C₁-C₈ спирт включает, не ограничиваясь приведенным, метанол, этанол, н-пропанол, изопропанол, изобутанол, гексанол и циклогексанол.

C₂-C₈ простой эфир относится к разветвленному/неразветвленному и/или циклическому/ациклическому простому эфиру, имеющему такое количество атомов углерода. C₂-C₈ простой эфир включает, не ограничиваясь приведенным, диметилловый простой эфир, диэтиловый простой эфир, диизопропиловый простой эфир, ди-н-бутиловый простой эфир, метил-трет-бутиловый простой эфир (МТБЭ), тетрагидрофуран и диоксан.

C₃-C₇ кетон относится к разветвленному/неразветвленному и/или циклическому/ациклическому кетону, имеющему такое количество атомов углерода. C₃-C₇ кетон включает, не ограничиваясь приведенным, ацетон, метил этил кетон, пропанон, бутанон, метил изобутил кетон, метил бутил кетон и циклогексанон.

C₃-C₇ сложный эфир относится к разветвленному/неразветвленному и/или циклическому/ациклическому сложному эфиру, имеющему такое количество атомов углерода. C₃-C₇ сложный эфир включает, не ограничиваясь приведенным, этил ацетат, пропиловый ацетат, н-бутил ацетат и т.д.

C₁-C₂ хлорированный углерод относится к хлорированному углероду, имеющему такое количество атомов углерода. C₁-C₂ хлорированный углерод включает, не ограничиваясь приведенным, хлороформ, метилхлорид (ДХМ), тетрахлорид углерода, 1,2-дихлорэтан, итетрахлорэтан.

C₂-C₇ нитрил относится к нитрилу, имеющему такое количество атомов углерода. C₂-C₇ нитрил включает, не ограничиваясь приведенным, ацетонитрил, пропионитрил и т.д.

Смешанный растворитель относится к растворителю, который традиционно используют в органической химии, который включает, не ограничиваясь приведенным, диэтиленгликоль, диглим (диэтиленгликоль диметилловый простой эфир), 1,2-диметоксиэтан, диметилформамид, диметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин, гексаметилфосфорамид, гексаметилфосфортриам, N-метил-2-пирролидинон, нитрометан, пиридин, триэтиламин и уксусную кислоту.

Термин C₅-C₁₂насыщенный углеводород относится к разветвленному/неразветвленному и/или циклическому/ациклическому углеводороду. C₅-C₁₂ насыщенный углеводород включает, не ограничиваясь приведенным, н-пентан, петролейный эфир (лигроин), н-гексан, н-гептан, циклогексан и циклогептан.

Термин C₆-C₁₂ ароматика относится к незамещенным или замещенным углеводородам, содержащим фенильную группу в качестве каркаса. Преимущественные углеводороды включают бензол, ксилол, толуол, хлорбензол, о-ксилол, м-ксилол, п-ксилол, ксилолы, где толуолом является более предпочтительным.

Термин "гало" или "галоген", как используют в данной заявке, включает хлор, бром, йод и фтор.

Термин "блокирующая группа" относится к химической группе, проявляющей следующие характеристики. "Группа" получена из "защитного соединения". Группы, которые являются селективными для первичных гидроксильных по сравнению с вторичными гидроксильными, которые быть помещены в условия, согласующиеся со стабильностью фосфорамидата (pH 2-8) и придают полученному в результате продукту существенно различные физические свойства, позволяющие более легкое отделение содержащего новую группу 3'-фосфорамидат-5'-ного продукта из непрореагировавшего соединения. Группа должна селективно реагировать с хорошим выходом с получением защищенного субстрата, стабильного в предложенных реакциях (см. Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed. T.W. Greene and P.G.M. Wuts, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1999). Примеры групп включают, не ограничиваясь приведенным: бензоильную, ацетильную, фенилзамещенную бензоильную, тетрагидропиранильную, тритильную, ДМТ (4,4'-диметокситритильную), ММТ (4-монометокситритильную), триметокситритильную, пиксильную (9-фенилксантен-9-ильную) группу, тиопиксил (9-фенилтиоксантен-9-ильную) или 9-(п-метоксибензил)ксантин-9-ильную (МОХ) и т.д.; C(O)-алкил, C(O)PH, C(O)арил, CH₂O-алкил, CH₂O-арил, SO₂-алкил, SO₂-арил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил. Ацетали, такие как MOM или THP и т.д. рассматривают в качестве возможных групп. Фторированные соединения также охвачены до такой

степени, до которой они могут быть присоединены к соединению и селективно удалены путем пропускания через фторидные твердофазные экстракционные среды (FluoroFlash®). Конкретный пример включает фторированный тритильный аналог, тритильный аналог 1-[4-(1H,1H,2H,2H-перфтордецил)фенил]-1,1-дифенилметанола. Также охвачены другие фторированные аналоги тритила, ВОО (трет-бутоксикарбонила), 9-флуоренилметоксикарбонила, CBz (кабамазепина) и т.д. Сульфонилхлориды, такие, как п-толуолсульфонил хлорид, могут селективно реагировать в 5' положении. Могут быть селективно образованы сложные эфиры, например ацетаты и бензоаты. Ангидриды дикарбоновых кислот, например ангидрид янтарной кислоты и его производные, могут быть использованы для получения связи сложного эфира со свободной карбоновой кислотой, такие примеры включают, не ограничиваясь приведенным, оксалил, малонил, сукцинил, глутарил, адипил, пимелил, суперил, азелаил, себацил, фталил, изофталил, терефталил и т.д. Свободная карбоновая кислота значительно повышает полярность и может быть также применена в качестве инструмента для экстракции продукта реакции в умеренно основные водные фазы, такие как растворы бикарбоната натрия. Фосфорамидатная группа является относительно стабильной в кислотной среде, так что могут быть также применены группы, требующие кислотных условий реакции, например тетрагидропиранил.

Термин "защитная группа", образованный из "защитного соединения," имеет свое прямое и обычное значение, т.е. как минимум одна защитная или блокирующая группа связана с как минимум одной функциональной группой (например, -ОН, -NH₂ и т.д.), что позволяет химическую модификацию как минимум одной другой функциональной группы. Примеры защитных групп включают, не ограничиваясь приведенным, бензоил, ацетил, фенилзамещенный бензоил, тетрагидропиранил, тритил, ДМТ (4,4'-диметокситритил), ММТ (4-монометокситритил), триметокситритил, пиксил (9-фенилксантен-9-ильную) группу, тиопиксил (9-фенилтиоксантен-9-ил) или 9-(п-метоксифенил)ксантин-9-ил (МОХ) и т.д.; C(O)-алкил, C(O)РН, C(O)арил, C(O)О(нижний алкил), C(O)О(нижний алкилен)арил (например, -C(O)ОСН₂РН), C(O)Оарил, СН₂О-алкил, СН₂О-арил, SO₂-алкил, SO₂-арил, защитная группа, содержащая как минимум один атом кремния, например трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, Si(нижний алкил)₂OSi(нижний алкил)₂ОН (например, -Si(¹Pr)₂OSi(¹Pr)₂ОН).

Термин "защитное соединение," как используют в данной заявке и если не определено иное, относится к соединению, содержащему "защитную группу", способному к реакции с соединением, содержащим функциональные группы, способные к тому, чтобы быть защищенными.

Термин "отходящая группа", как используют в данной заявке, имеет то же самое значение, которое известно специалисту в данной области (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure-Fourth Edition by Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992 pages 351-357) и представляет собой группу, которая является частью и присоединена у молекуле-субстрату; в реакции, в которой молекула-субстрат претерпевает реакцию замещения (с, например, нуклеофилом), затем замещается отходящая группа. Примеры отходящих групп включают, не ограничиваясь приведенным: галоген (F, Cl, Br и I), преимущественно Cl, Br или I; тозилат, мезилат, трифлат, ацетат, камфорсульфонат, арилоксид и арилоксид, замещенный как минимум одной электроноакцепторной группой (например, п-нитрофеноксидом, 2-хлорфеноксидом, 4-хлорфеноксидом, 2,4-динитрофеноксидом, пентафторфеноксидом и т.д.) и т.д. Термин "электроноакцепторная группа" в данной заявке соответствует своему прямому значению. Примеры электроноакцепторных групп включают, не ограничиваясь приведенным, галоген, -NO₂, -C(O)(нижний алкил), -C(O)(арил), -C(O)О(нижний алкил), -C(O)О(арил) и т.д.

Термин "основной реагент", как используют в данной заявке, означает соединение, способное к депротонированию гидроксильной группы. Примеры основных реагентов включают, не ограничиваясь приведенным, (нижний алк)оксид ((нижний алкил)ОМ) в комбинации со спиртовым растворителем, где (нижние алк)оксиды включают, не ограничиваясь приведенным, MeO⁻, EtO⁻, ⁿPrO⁻, ¹PrO⁻, ^tBuO⁻, ⁱAmO⁻ (изо-амилоксид) и т.д. и где М является катионом щелочного металла, например Li⁺, Na⁺, K⁺ и т.д. Спиртовые растворители включают (нижний алкил)ОН, например, MeОН, EtО/Н, ⁿPrОН, ¹PrОН, ^tBuОН, ⁱAmОН и т.д. Могут также быть использованы не-алкокси основания, например гидрид натрия, гексаметилдисилазан натрия, гексаметилдисилазан лития, диизопропиламид, гидрид кальция, карбонат кальция, карбонат калия, карбонат цезия, DBU, DBN, реагенты Гриньяра, например, (нижний алкил)Mg(галоген), включая, не ограничиваясь приведенным, MeMgCl, MeMgBr, ^tBuMgCl, ^tBuMgBr и т.д.

Термин "основание" охватывает термин "основной реагент" и предназначен быть соединением, способным депротонировать протонсодержащее соединение, т.е. основание Бренстеда. В дополнение к примерам, указанным выше, дополнительные примеры основания включают, не ограничиваясь приведенным, пиридин, коллидин, 2,6-(нижний алкил)пиридин, диметиланилин, имидазол, N-метилимидазол, пирозол, N-метилпирозол, триэтиламин, ди-изопропилэтиламин и т.д.

Термин "электроноакцепторные группы" в данной заявке соответствует своему прямому значению. Примеры электроноакцепторных групп включают, не ограничиваясь приведенным, галоген (F, Cl, Br или I), -NO₂, -C(O)(нижний алкил), -C(O)(арил), -C(O)О(нижний алкил), -C(O)О(арил) и т.д.

Термин "совместно кристаллизуется" включает совместные кристаллаты 4, R_p-4, или S_p-4 в комбинации с солями, что охватывает фармацевтически приемлемые соли.

Термин "соли," как описано в данной заявке, относится к соединению, содержащему катион и ани-

он, которое может быть образовано путем протонирования протон-акцепторного фрагмента и/или депротонирования протон-донорного фрагмента. Необходимо отметить, что протонирование протон-акцепторного фрагмента приводит к образованию катионных видов, в которых заряд уравновешен путем наличия физиологического аниона, в то время как депротонирование протон-донорного фрагмента приводит к образованию анионных видов, в которых заряд уравновешен путем наличия физиологического катиона.

Выражение "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая является фармацевтически приемлемой. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, не ограничиваясь приведенным: (1) кислотные аддитивные соли, образованные неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п.; или образованные органическими кислотами, например гликолевой кислотой, виноградной кислотой, молочной кислотой, малоновой кислотой, яблочной кислотой, малеиновой кислотой, фумаровой кислотой, винной кислотой, лимонной кислотой, 3-(4-гидроксibenзоил)бензойной кислотой, коричной кислотой, миндальной кислотой, метансульфоновой кислотой, этансульфоновой кислотой, 1,2-этандисульфоновой кислотой, 2-гидроксиэтансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, 4-хлорбензолсульфоновой кислотой, 2-нафталинсульфоновой кислотой, 4-толуолсульфоновой кислотой, камфорсульфоновой кислотой, лаурилсульфоновой кислотой, глюконовой кислотой, глютамовой кислотой, салициловой кислотой, муконовой кислотой и т.п., или (2) основными аддитивными солями, образованными конъюгированными основаниями любых неорганических кислот, перечисленных выше, где конъюгированные основания включают катионный компонент, выбранный из Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , R^{4-g+} , в которых R^{4-g+} представляет собой C_{1-3} алкил и g представляет собой число, выбранное из 0, 1, 2, 3 или 4. Необходимо понимать, что все ссылки на фармацевтически приемлемые соли включают формы с добавлением растворителей (солеваты), или кристаллические формы (полиморфы), как описано в данной заявке, той же самой кислотной аддитивной соли.

Термин "алкил" относится к насыщенному моновалентному углеводородному остатку, с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащему 1-30 атомов углерода. Термин " C_{1-M} алкил" относится к алкилу, содержащему 1-M атомов углерода, где M представляет собой целое число, имеющее следующие значения: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30. Термин " C_{1-4} алкил" относится к алкилу, содержащему 1-4 атомов углерода. Термин "нижний алкил" означает углеводородный остаток с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащий 1-6 атомов углерода. " C_{1-20} алкил", как используют в данной заявке, относится к алкилу, содержащему 1-20 атомов углерода. " C_{1-10} алкил", как используют в данной заявке, n относится к алкилу, содержащему 1-10 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, не ограничиваясь приведенным, группы нижних алкилов, включая метил, этил, пропил, i -пропил, n -бутил, i -бутил, трет-бутил или пентил, изопентил, неопентил, гексил, гептил и октил. Термин (ар)алкил или (гетероарил)алкил указывает на алкильную группу, необязательно замещенную арильной или гетероарильной группой соответственно.

Термин "алкенил" относится к углеводородному цепочечному незамещенному радикалу, имеющему от 2 до 10 атомов углерода и одну или две олефиновых двойных связей, преимущественно одну олефиновую двойную связь. Термин " C_{2-N} алкенил" относится к алкенилу, содержащему 2-N атомов углерода, где N представляет собой целое число, имеющее следующие значения: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. Термин " C_{2-10} алкенил" относится к алкенилу, содержащему 2-10 атомов углерода. Термин " C_{2-4} алкенил" относится к алкенилу, содержащему 2-4 атомов углерода. Примеры включают, не ограничиваясь приведенным, винил, 1-пропенил, 2-пропенил (аллил) или 2-бутенил (кротил).

Термин "арил," как используют в данной заявке и если не указано иное, относится к замещенному или незамещенному фенилу (Ph), бифенил, или нафтил, преимущественно, термин арил относится к замещенному или незамещенному фенилу. Арильная группа может быть замещена одним или более фрагментами, выбранными из гидроксила, F, Cl, Br, I, amino, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфониевой кислоты, фосфата и фосфоната, незамещенного либо замещенного, или замещенного при необходимости, как известно специалистам в данной области, например, как объяснено в T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

Термин "арилоксид," как используют в данной заявке и если не указано иное, относится к незамещенному или замещенному феноксиду (PhO-), p -фенилфеноксиду (P-Ph-PhO-), или нафтоксиду, преимущественно термин арилоксид относится к незамещенному или замещенному феноксиду.

Арилоксидная группа может быть замещена одним или более фрагментами, выбранными из гидроксила, F, Cl, Br, I, $-\text{C}(\text{O})$ (нижнего алкила), $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ (нижнего алкила), amino, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфорной кислоты, фосфата и фосфоната, незамещенного либо замещенного, или замещенного при необходимости, как известно специалистам в данной области, например, как объяснено в T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

Термин "препарат" или "лекарственная форма" предназначен для включения как твердых, так и жидких композиций активного соединения и специалист в данной области оценит, что активный ингре-

диент может существовать в различных препаратах в зависимости от желательной дозы и фармакокинетических параметров.

Термин "эксципиент", как используют в данной заявке, относится к соединению, которое используют для получения фармацевтической композиции и он, в общем, является безопасным, нетоксичным и ни биологически, ни с другой точки зрения нежелательным и включает эксципиенты, приемлемые для ветеринарного применения, а также фармацевтического применения у людей.

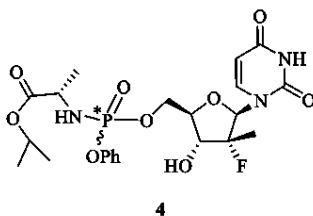
Термин "кристаллический" относится к ситуации, когда твердая проба любого из S_p-4 или R_p-4 имеет кристаллические характеристики при определении рентгеновской порошковой дифрактометрии или рентгеноструктурным анализом.

Термин "кристаллоподобный" относится к ситуации, когда твердая проба любого из S_p-4 или R_p-4 имеет кристаллические характеристики при определении одним методом, например визуально или при помощи оптической или поляризационной микроскопии, но не имеет кристаллических характеристик при определении другим методом, например рентгеновской порошковой дифрактометрией. Способы визуального определения кристалличности твердой пробы визуально или при помощи оптической или поляризационной микроскопии описаны в USP <695> и <776>, оба из которых включены путем ссылки. Твердая проба любого из S_p-4 или R_p-4, которая является "кристаллоподобной", может быть кристаллической в определенных условиях, но может стать некристаллической в других условиях.

Термин "аморфный" относится к ситуации, когда твердая проба любого из S_p-4 или R_p-4 не является ни кристаллической, ни кристаллоподобной.

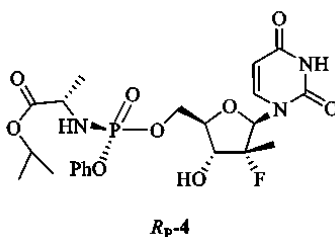
Варианты исполнения.

Первый вариант исполнения направлен на соединение, представленное формулой 4



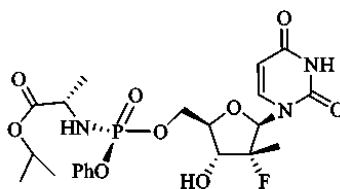
где P* представляет хиральный атом фосфора. Ввиду хиральности атома фосфора соединение, представленное формулой 4, содержит два диастереомера, обозначенные как R_p-4 и S_p-4. Соединение, представленное формулой 4, может быть также частью сольвата, гидрата или смешанного сольвата/гидрата. Сольват обозначен как 4·nS, в то время как гидрат обозначен как 4·H₂O, где S является растворителем, связанным решеткой, n варьируется как целое или дробное число от приблизительно 0 до приблизительно 3 и m варьируется как целое или дробное число от приблизительно 0 до приблизительно 5. Наконец, соединение, представленное формулой 4, может не существовать в виде сольвата либо гидрата, но иметь определенное преимущественное количество поглощенного растворителя (S) или воды. В таком случае количество S или воды может варьироваться от приблизительно 0 мас.% до приблизительно 10 мас.% по массе соединения, представленного формулой 4. Соединение, представленное формулой 4 или его сольватами и гидратами, является кристаллическим, кристаллообразным или аморфным.

Второй вариант исполнения направлен на соединение, представленное формулой R_p-4



Соединение, представленное формулой R_p-4, может быть также частью сольвата, гидрата или смешанного сольвата/гидрата. Сольват обозначен как R_p·4·nS, в то время как гидрат обозначен как R_p-4·mH₂O, где S является растворителем, связанным решеткой, n варьируется как целое или дробное число от приблизительно 0 до приблизительно 3 и m варьируется как целое или дробное число от приблизительно 0 до приблизительно 5. Наконец, соединение, представленное формулой R_p-4, может не существовать в виде сольвата, гидрата или смешанного сольвата/гидрата, но иметь определенное преимущественное количество поглощенного растворителя (S), воды или как S, так и воды. В таком случае количество S или воды может варьироваться от приблизительно 0 мас.% до приблизительно 10 мас.% по массе соединения, представленного формулой R_p-4. Соединение, представленное формулой R_p-4 или его сольватами и гидратами, является кристаллическим, кристаллообразным или аморфным.

Третий вариант исполнения направлен на соединение, представленное формулой S_p-4



Sp-4

Соединение, представленное формулой Sp-4, может быть также частью сольвата, гидрата или смешанного сольвата/гидрата. Сольват обозначен как Sp-4·nS, в то время как гидрат обозначен как Sp-4·H₂O, где S является растворителем, связанным решеткой, n варьируется как целое или дробное число от приблизительно 0 до приблизительно 3 и m варьируется как целое или дробное число от приблизительно 0 до приблизительно 5. Наконец, соединение, представленное формулой Sp-4, может не существовать в виде сольвата либо гидрата, но иметь определенное преимущественное количество поглощенного растворителя (S) или воды. В таком случае количество S или воды может варьироваться от приблизительно 0 мас.% до приблизительно 10 мас.% по массе соединения, представленного формулой Sp-4. Соединение, представленное формулой Sp-4 или его сольватами и гидратами, является кристаллическим, кристаллообразным или аморфным.

Первый аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4.

Второй аспект третьего варианта исполнения направлен на моноклинное кристаллическое Sp-4, преимущественно имеющее следующие параметры элементарной ячейки $a \sim 12,88 \text{ \AA}$, $b \sim 6,17 \text{ \AA}$, $c \sim 17,73 \text{ \AA}$ и $\beta \sim 92,05^\circ$.

Третий аспект третьего варианта исполнения направлен на моноклинное кристаллическое Sp-4, преимущественно имеющее следующие параметры элементарной ячейки $a \sim 20,09 \text{ \AA}$, $b \sim 6,10 \text{ \AA}$, $c \sim 23,01 \text{ \AA}$ и $\beta \sim 112,29^\circ$.

Четвертый аспект третьего варианта исполнения направлен на моноклинное кристаллическое Sp-4, преимущественно имеющее следующие параметры элементарной ячейки $a \sim 12,83 \text{ \AA}$, $b \sim 6,15 \text{ \AA}$, $c \sim 17,63 \text{ \AA}$ и $\beta \sim 91,75^\circ$.

Пятый аспект третьего варианта исполнения направлен на моноклинное кристаллическое Sp-4, преимущественно имеющее следующие параметры элементарной ячейки $a \sim 12,93 \text{ \AA}$, $b \sim 6,18 \text{ \AA}$, $c \sim 18,01 \text{ \AA}$ и $\beta \sim 96,40^\circ$.

Шестой аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4, имеющее 2θ-отражения ($^\circ$) порошковой рентгеновской дифракции при приблизительно: 5,2, 7,5, 9,6, 16,7, 18,3, 22,2.

Седьмой аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4, имеющее 2θ-отражения ($^\circ$) порошковой рентгеновской дифракции при приблизительно: 5,0, 7,3, 9,4 и 18,1.

Восьмой аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4, имеющее 2θ-отражения ($^\circ$) порошковой рентгеновской дифракции при приблизительно: 4,9, 6,9, 9,8, 19,8, 20,6, 24,7 и 26,1.

Девятый аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4, имеющее 2θ-отражения ($^\circ$) порошковой рентгеновской дифракции при приблизительно: 6,9, 9,8, 19,7, 20,6 и 24,6.

Девятый аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4, имеющее 2θ-отражения ($^\circ$) порошковой рентгеновской дифракции при приблизительно: 5,0, 6,8, 19,9, 20,6, 20,9 и 24,9.

Десятый аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4, имеющее 2θ-отражения ($^\circ$) порошковой рентгеновской дифракции при приблизительно: 5,2, 6,6, 7,1, 15,7, 19,1 и 25,0.

Одиннадцатый аспект третьего варианта исполнения направлен на кристаллическое Sp-4, имеющее дифрактограмму порошковой рентгеновской дифракции, существенно, как показано на любой из фиг. 3-8.

Двенадцатый аспект третьего варианта исполнения направлен на Sp-4, имеющее следующие пики Фурье-ИК (см⁻¹) при приблизительно: 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208 и 1082.

Тринадцатый аспект третьего варианта исполнения направлен на Sp-4, имеющее Фурье-ИК спектр, существенно, как показано на фиг. 7.

Четырнадцатый аспект третьего варианта исполнения направлен на существенно чистое Sp-4.

Пятнадцатый аспект третьего варианта исполнения направлен на существенно чистое кристаллическое Sp-4.

Шестнадцатый аспект третьего варианта исполнения направлен на существенно чистое аморфное Sp-4.

Дозировка, введение и применение.

Четвертый вариант исполнения направлен на композицию для лечения и/или профилактики любого из вирусных агентов при помощи любого из соединений 4, Rp-4 или Sp-4. Возможные вирусные агенты включают, не ограничиваясь приведенным: вирус гепатита С, вирус гепатита В, вирус гепатита А, вирус Западного Нила, вирус желтой лихорадки, вирус Денге, риновирус, полиовирус, вирус диареи крупного

рогатого скота, Вирус японского энцефалита или вирусы, относящиеся к группам пестивирусов, гепацивирусов или флавивирусов.

Аспект данного варианта исполнения направлен на композицию для лечения любого из вирусных агентов. В данной заявке описана указанная композиция, содержащая фармацевтически приемлемую среду, выбранную из эксципиента, носителя, разжижителя и эквивалентной среды и любое из соединений 4, R_p-4 или S_p-4, которые предназначены для включения их гидратов, сольватов и любых кристаллических форм любых соединений 4, R_p-4 или S_p-4 или их гидратов и сольватов.

Соединения 4, R_p-4 или S_p-4 могут быть независимо составлены в композиции в широком диапазоне лекарственных форм и носителей для перорального введения. Пероральное введение может быть произведено в форме таблеток, покрытых таблеток, твердых и мягких желатиновых капсул, растворов, эмульсий, сиропов или суспензий. Соединения 4, R_p-4 или S_p-4 являются эффективными при введении при помощи суппозитория, среди других маршрутов введения. Наиболее традиционным способом введения является. В общем, пероральное применение традиционного ежедневного режима дозирования, который может быть отрегулирован в соответствии с тяжестью заболевания и ответа пациента на противовирусные препараты.

Соединения 4, R_p-4 или S_p-4 вместе одним или более традиционными эксципиентами, носителями или разжижителями, могут быть помещены в форму фармацевтических композиций и стандартных лекарственных форм. Фармацевтические композиции и стандартные лекарственные формы могут содержать традиционные ингредиенты в традиционных пропорциях, с или без дополнительных активных соединений, а стандартные лекарственные формы могут содержать любые приемлемые эффективные количества активного ингредиента, соответствующие целевому ежедневному режиму дозирования для применения. Фармацевтические композиции могут быть применены в виде твердых веществ, таких как таблетки или заполненных капсул, полутвердых веществ, порошков, композиций с замедленным высвобождением или жидкостей, таких как суспензии, эмульсии или заполненные композиции для перорального применения; или в форму суппозитория для ректального или вагинального введения. Типичный препарат будет содержать от приблизительно 5 до приблизительно 95% активного соединения или соединений (мас./мас).

Соединения 4, R_p-4 или S_p-4 могут быть введены индивидуально, но в общем они будут введены в смеси с одним или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, разжижителей или носителей, выбранных с учетом целевого маршрута введения и стандартной фармацевтической практики.

Твердые лекарственные препараты включают, например, порошки, таблетки, пилюли, капсулы, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или более веществ, которые могут также действовать в качестве разжижителей, амортизаторов, солиubilизаторов, увлажнителей, суспендирующих средств, связывающих веществ, агентов распада таблеток или инкапсулирующих материалов. В порошках носитель в общем представляет собой мелкодисперсное твердое вещество, представляющее собой смесь мелкодисперсного активного компонента. В таблетках активный компонент в общем смешивают с носителем, имеющим требующуюся связывающую способность в приемлемых пропорциях и спрессованного в желательную форму и размер. Приемлемые носители включают, не ограничиваясь приведенным, карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактозу, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу, низкоплавкий воск, масло какао и т.п. Твердые лекарственные препараты могут содержать, дополнительно к активному компоненту, красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергирующие вещества, загустители, солиubilизаторы и т.п. Примеры твердых композиций проиллюстрированы в EP 0524579; US 2002/0142050; US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360; US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; US 6267985; US 6294192; US 6383471; US 6395300; US 6569463; US 6635278; US 6645528; US 6923988; US 6932983; US 7060294; и US 7462608, каждый из которых включен в качестве ссылки.

Жидкие композиции также являются приемлемыми для перорального введения и включают жидкие композиции, включая эмульсии, сиропы, эликсиры и водные суспензии. Они включают твердые лекарственные препараты, предназначенные для превращения в жидкие лекарственные препараты непосредственно перед применением. Примеры жидких композиций проиллюстрированы в патентах США №3994974; 5695784; и 6977257. Эмульсии могут быть получены в растворах, например в водных растворах пропиленгликоля или могут содержать эмульгаторы, например лецитин, сорбитан моноолеат или гуммиарабик. Водные суспензии могут быть получены путем диспергирования мелкодисперсного активного компонента в воде с вязким веществом, таким как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлозы, натрий карбоксиметилцеллюлоза и другие хорошо известные суспендирующие средства.

Соединения 4, R_p-4 или S_p-4 могут быть независимо составлены в композиции для введения в качестве суппозитория. Низкоплавкий воск, например в виде смеси глицеридов жирных кислот или масла какао, сначала плавят и активный компонент гомогенно диспергируют, например, путем перемешивания. Расплавленную гомогенную смесь затем заливают в формы стандартных размеров, позволяют охладиться

и отвердеть.

Соединения 4, R_p-4 или S_p-4 могут быть независимо составлены в композиции для вагинального введения. Вагинальные суппозитории, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или спреи, содержащие дополнительно к активному ингредиенту такие носители, являются подходящими, как известно из уровня техники. Некоторые из таких композиций могут быть также применены в сочетании с кондомом, со спермицидным агентом или без него.

Приемлемые композиции наряду с фармацевтическими носителями, разжижителями и эксципиентами, описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E.W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pennsylvania, который этим включен в данную заявку путем ссылки. Специалист в области композиций может модифицировать композиции в рамках доктрин данного описания, с обеспечением многочисленных композиций для конкретного маршрута введения, не придавая композициям, содержащим соединения, описанные в данной заявке, нестабильности или ставя под угрозу их терапевтическую активность.

Дополнительно, очищенные соединений 4, R_p-4 или S_p-4 могут быть независимо составлены в композиции в сочетании с липосомами или мицеллами. Что касается липосом, то описано, что очищенные соединения могут быть составлены в композиции таким образом, как описано в патентах США №4797285; 5013556; 5077056; 5077057; 5154930; 5192549; 5213804; 5225212; 5277914; 5316771; 5376380; 5549910; 5567434; 5736155; 5827533; 5882679; 5891468; 6060080; 6132763; 6143321; 6180134; 6200598; 6214375; 6224903; 6296870; 6653455; 6680068; 6726925; 7060689; и 7070801, каждый из которых включен в данную заявку в качестве ссылки. Что касается мицелл, то описано, что очищенные соединения что очищенные соединения могут быть составлены в композиции таким образом, как описано в патентах США №5145684 и 5091188, оба из которых включен в данную заявку в качестве ссылки.

Пятый вариант исполнения направлен на применение любого из соединений 4, R_p-4 или S_p-4 при получении лекарственного средства для лечения любого состояния, которое является результатом инфицирования любым из следующих вирусных агентов: вирусом гепатита С, вирусом Западного Нила, вирусом желтой лихорадки, вирусом Денге, риновирусом, полиовирусом, вирусом гепатита А, вирусом диареи крупного рогатого скота и вирусом японского энцефалита.

Термин "лекарственное средство" означает вещество, которое применяют в способе лечения и/или профилактики субъекта, который нуждается в этом, где вещество включает, не ограничиваясь приведенным, композицию, состав, лекарственную форму и т.п., содержащие любое из соединений 4, R_p-4 или S_p-4. Рассмотрено применение любого из соединений 4, R_p-4 или S_p-4 при получении лекарственного средства, для лечения любого из противовирусных состояний, описанных в данной заявке, отдельно или в комбинации с другим соединением, описанным в данной заявке. Лекарственное средство включает, не ограничиваясь приведенным, любую данную композицию, рассмотренную в четвертом варианте исполнения, описанном в данной заявке.

Шестой вариант исполнения направлен на способ лечения и/или профилактики у субъекта, который нуждается в этом, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества любого из соединений 4, R_p-4 или S_p-4 субъекту.

Рассмотрено, что субъект, который нуждается в этом, является субъектом, имеющим любое состояние, возникшее в результате инфицирования любым вирусным агентом, описанным в данной заявке, который включает, не ограничиваясь приведенным, вирус гепатита С, вирус Западного Нила, вирус желтой лихорадки, вирус Денге, риновирус, полиовирус, вирус гепатита А, вирус диареи крупного рогатого скота или вирус японского энцефалита, флавивirusы или пестивirusы или гепациvirusы или вирусный агент, вызывающий симптомы, эквивалентные или сравнимые с любым из вышеперечисленных вирусов.

Термин "субъект" означает млекопитающее, которое включает, не ограничиваясь приведенным, крупный рогатый скот, свиней, овец, цыплят, индюков, буйволов, лам, страусов, собак, котов и людей, преимущественно объектом является человек. Рассмотрено, что в способе лечения субъекта в соответствии с девятым вариантом исполнения могут быть применены любые из соединений, описанных в данной заявке, отдельно или в комбинации другим соединением, описанным в данной заявке.

Термин "терапевтически эффективное количество", как используют в данной заявке, означает количество, необходимое для уменьшения симптомов заболевания у особи. Доза будет отрегулирована в соответствии с индивидуальными потребностями в каждом конкретном случае. Такая дозировка может варьироваться в широких пределах, в зависимости от многочисленных факторов, таких как тяжесть заболевания, подлежащего лечению, возраст и общее состояние здоровья пациента, других лекарственных средств, которыми лечат пациента, маршрута и формы введения и предпочтений и опыта практикующего врача. Для перорального введения дневная дозировка составляет от приблизительно 0,001 до приблизительно 10 г, включая все значения между ними, например 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,050, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,175, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9 и 9,5, в день должны быть подходящими в монотерапии и/или в комбинационной терапии. Конкретная ежедневная дозировка составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 1 г в день, включая все приращения, составляющие 0,01 г (т.е. 10 мг) между ними, преимущественная ежедневная дозировка составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,8 г в день, более преимущественно от прибли-

тельно 0,01 до приблизительно 0,6 г в день и наиболее преимущественно от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,25 г в день, каждая из которых включает все приращения, составляющие 0,01 г, между ними. В общем, лечение начинают с большой изначальной "дозы нагрузки" для быстрого уменьшения или устранения вируса после уменьшения дозы до уровня, достаточного для профилактики возрождения активности инфекции. Средний специалист в лечении заболеваний, описанных в данной заявке, будет способен, без ненадлежащих экспериментов и полагаясь на знания, опыт и описание данной заявки выяснить терапевтически эффективное количество соединения в данной заявке, описанное для данного заболевания и пациента.

Терапевтическая эффективность может быть выяснена из анализов печеночной функции, включая, но не ограничиваясь приведенным, уровни белка, такие как сывороточные белки (например, альбумин, факторы свертывания крови, щелочная фосфатаза, аминотрансферазы (например, аланин трансаминаза, аспартат трансаминаза), 5'-нуклеозидаза, γ -глутаминилтранспептидаза и т.д.), синтез билирубина, синтез холестерина и синтез желчных кислот; печеночную метаболическую функцию, включая, но не ограничиваясь приведенным, углеводный обмен веществ, аминокислотный и аммониевый метаболизм. Альтернативно, терапевтическая эффективность может быть проконтролирована путем измерения вируса гепатита хл-РНК. Результаты данных тестов позволят оптимизировать дозу.

Первый аспект шестого варианта исполнения направлен на способ лечения и/или профилактики у субъекта, который нуждается в этом, где указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, представленного любым из соединений 4, R_p-4 или S_p-4 и терапевтически эффективного количества другого противовирусного агента, где введение является одновременным или альтернативным. Понятно, что период времени между введениями может находиться в диапазоне 1-24 ч, что включает любой поддиапазон между ними, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23 ч.

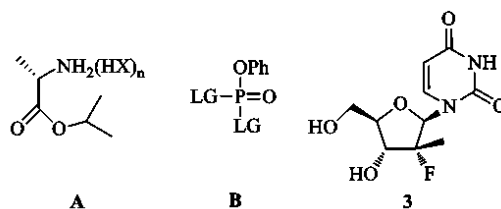
Примеры "другого противовирусного средства" включают, не ограничиваясь приведенным, ингибиторы протеаз вируса гепатита С NS3 (см. EP 1881001, US 2003187018, US 2005267018, WO 2003006490, WO 200364456, WO 2004094452, WO 2005028502, WO 2005037214, WO 2005095403, WO 2007014920, WO 2007014921, WO 2007014922, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007015824, WO 2008010921 и WO 2008010921); ингибиторы вируса гепатита С NS5B (см. US 2004229840, US 2005154056, US 2005-98125, US 20060194749, US 20060241064, US 20060293306, US 2006040890, US 2006040927, US 2006166964, US 2007275947, US 6784166, US 20072759300, WO 2002057287, WO 2002057425, WO 2003010141, WO 2003037895, WO 2003105770, WO 2004000858, WO 2004002940, WO 2004002944, WO 2004002977, WO 2004003138, WO 2004041201, WO 2004065367, WO 2004096210, WO 2005021568, WO 2005103045, WO 2005123087, WO 2006012078, WO 2006020082, WO 2006065335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO 2007039142, WO 2007039145, WO 2007076034, WO 2007088148, WO 2007092000 и WO 2007095269); ингибиторы вируса гепатита С NS4 (см. WO 2005067900 и WO 2007070556); ингибиторы вируса гепатита С NS5a (см. US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251 и WO 2006120252); агонисты Toll-подобных рецепторов (см. WO 2007093901); и другие ингибиторы (см. WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852 и WO 2004035571); и соединения, описанные в патентной заявке США №12/053015, поданной 21 марта 2008 г. (US 2010/0016251) (содержание которых включено путем ссылки), интерферон- α , интерферон- β , пегилированный интерферон- α , рибавирин, левовирин, вирамидин, другой нуклеозидный полимеразный ингибитор вируса гепатита С, не-нуклеозидный полимеразный ингибитор вируса гепатита С, протеазный ингибитор вируса гепатита С, геликазный ингибитор вируса гепатита С или ингибитор гибридизации вируса гепатита С.

Если любое из соединений 4, R_p-4 или S_p-4 вводят с другим противовирусным агентом, то активность может быть усилена по сравнению с родительским соединением. При лечении в виде комбинационной терапии такое введение может быть одновременным или последовательным в отношении введения нуклеозидных производных. "Одновременное введение", как используют в данной заявке, таким образом включает введение агентов одновременно или в различное время. Введение двух или более агентов одновременно может быть реализовано при помощи одной композиции, содержащей два или более активных ингредиента или путем существенно одновременного введения двух или более лекарственных форм с одним активным агентом.

Будет понятно, что ссылки в данной заявке на лечение распространяются на профилактику, а также на лечение существующих состояний. Дополнительно, термин "лечение" инфекции вируса гепатита С, как используют в данной заявке, также включает лечение или профилактику заболевания или состояния, связанного с или переносимого инфекцией вируса гепатита С или ее клиническими симптомами.

Получение.

Седьмой вариант исполнения направлен на способ получения любого из соединений 4, R_p-4 или S_p-4, включающий: а) реакцию изопропил-аланата, А, ди-LG-фенилфосфат, В, 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина, 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; b) 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 c) необязательно подвергание второй смеси кристаллизации, хроматографии или экстракции с получением 4, S_p-4 или R_p-4.

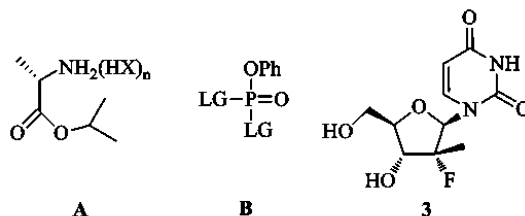
В первом аспекте седьмого варианта исполнения изопропил аланат присутствует в виде его соли соляной кислоты, которая, преимущественно, существенно безводная.

Во втором аспекте седьмого варианта исполнения основанием является Н-метилимидазола.

В третьем аспекте седьмого варианта исполнения молярное соотношение А-к-В-к-З составляет приблизительно 1,6---1,3-к-1.

В четвертом аспекте седьмого варианта исполнения защитное соединение представляет собой трет-бутил-диметил-силил-хлорид.

Восьмой вариант исполнения направлен на способ получения S_p-4 или R_p-4, включающий: а) реакцию изопропил-аланата, А, ди-LG-фенилфосфата, В, 2'-дезоксидефтор-2'-С-метилуридина, 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 b) необязательно подвергание второй смеси кристаллизацией, хроматографии или экстракции с получением очищенного S_p-4 или R_p-4.

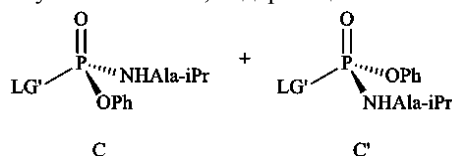
Второй аспект восьмого варианта исполнения получения S_p-4 дополнительно включает дополнительную очистку второй смеси или очищенного S_p-4 путем d) растворения или суспендирования второй смеси или очищенного S_p-4 в растворителе с последующим высеиванием кристаллического S_p-4 при приблизительно комнатной 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 антирастворителя с получением второго твердого вещества.

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

В четвертом аспекте восьмого варианта исполнения получения S_p-4, S_p-4 дополнительно очищают при помощи второй смеси либо очищают S_p-4 путем d) добавления силикагеля ко второй смеси или очищают S_p-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

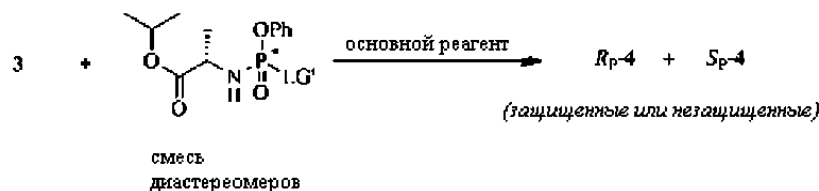
необязательно подвергание полученного защищенного или незащищенного S_p -4 хроматографии, экстракции или кристаллизации с получением очищенного защищенного или незащищенного S_p -4. В подварианте исполнения LG' представляет собой тозилат, камфоросульфат или арилоксид, замещенный как минимум одной электроноакцепторной 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 C_2 - C_7 нитрилом, например ацетонитрилом.

Способ в соответствии с девятым вариантом исполнения дополнительно включает: 1) реакцию $(LG')P(O)(LG)_2$, где LG независимо от LG' представляет собой отходящую группу, с (i) изопропилаланатом 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 C и C' , (ii) фенолом и первым основанием с получением $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ с последующей реакцией $(LG')P(O)(LM)(OPh)$ с изопропилаланатом и вторым основанием с получением смеси, содержащей C и C' или (iii) комбинирования изопропилаланата, фенола и как минимум одним основанием с получением смеси, содержащей C и C' ; или 2) реакции $(PhO)P(O)(LG)_2$, где LG' , независимо от LG , представляет собой отходящую группу, с (i) изопропилаланатом 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 C и C'

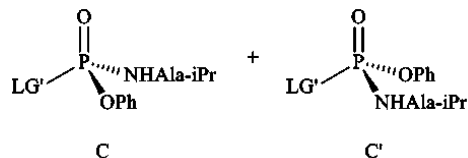


и подвергание смеси хроматографии или кристаллизации смеси с получением C . В одном аспекте девятого варианта исполнения, изопропил аланат присутствует в виде его соли соляной кислоты, которая, преимущественно, существенно безводная.

Десятый вариант исполнения направлен на способ получения R_p -4, который включает: а) реакцию изопропилаланил-фосфорамидата с 3'-О-защищенным или незащищенным 3 и основным реагентом с получением композиции, содержащей защищенное или незащищенное R_p -4



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



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

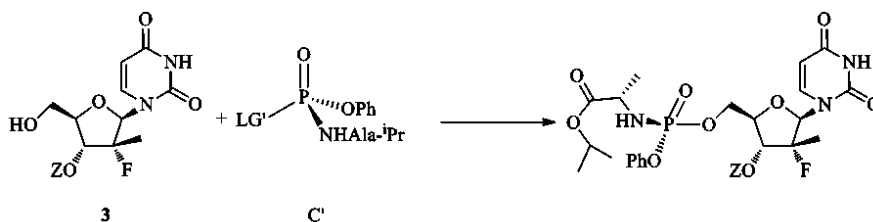
В первом аспекте основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение $C':C$ превышает или равно приблизительно 1:1.

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

В третьем аспекте 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.

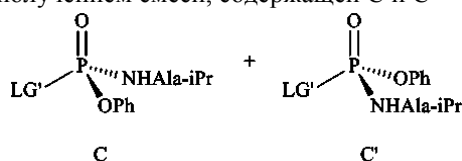
В четвертом аспекте LG' представляет собой п-нитрофеноксид, основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение $C':C$ составляет как минимум приблизительно 1,5:1, приблизительно 2,3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5,7:1, приблизительно 9:1, приблизительно 19:1, приблизительно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

Пятый аспект получения R_p -4 включает: а) реакцию изопропилаланил-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 b) необязательно подвержение полученного защищенного или незащищенного R_p-4 хроматографии, экстракции или кристаллизации с получением очищенного защищенного или незащищенного R_p-4. В подварианте исполнения LG' представляет собой тозилат, камфоросульфонат или арилоксид, замещенный как минимум одной электроакцепторной группой; более преимущественно LG' выбирают из п-нитрофеноксида, 2,4-динитрофеноксида и пентафторфеноксида. В дополнительном подварианте 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 подварианте исполнения реакцию проводят в полярном апротонном 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.

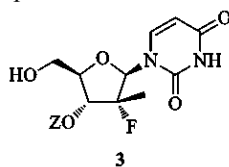
Способ в соответствии с десятым вариантом исполнения дополнительно включает: 1) реакцию (LG')P(O)(LG)₂, где LG, независимо от LG', представляет собой отходящую группу, с (i) изопропил-аланатом и первым основанием с получением (LG')P(O)(LG)(Ala-¹Pr) с последующей реакцией (LG')P(O)(LG)(Ala-¹Pr) с фенолом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



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

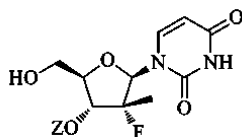
Одиннадцатый вариант исполнения направлен на композицию, полученную способами, указанными в седьмом варианте исполнения, восьмого варианта исполнения, девятого варианта исполнения или десятого варианта исполнения, а также их соответствующих аспектах. Аспект одиннадцатого варианта исполнения направлен на композицию, полученную любым из проиллюстрированных вариантов исполнения, описанных ниже. Таким образом полученная композиция может быть кристаллической, кристаллоподобной, аморфной или их комбинациями.

Двенадцатый вариант исполнения направлен на соединение 3



где Z является защитной группой или водородом; которое является полезным для получения R_p-4 или S_p-4.

Первый аспект двенадцатого варианта исполнения выбирают из соединения, имеющего следующую структуру



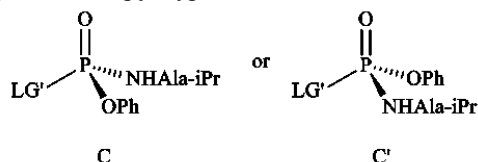
3a: Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃

3b: Z = -C(O)OCH₂Ph

3c: Z = -Si(Me)₂^tBu

3d: Z = -Si(^tPr)₂OSi(^tPr)₂OH

Тринадцатый вариант исполнения направлен на соединение, его соль, гидрат, сольват или их комбинацию, представленные следующими структурами

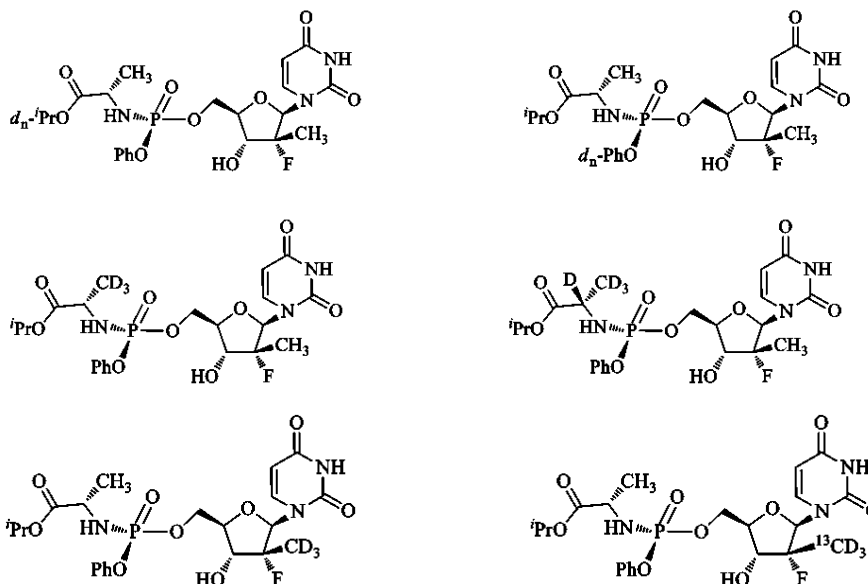


где LG' представляет собой отходящую группу, которое является полезным для получения R_p-4 или S_p-4.

В первом аспекте тринадцатого варианта исполнения LG' представляет собой тозилат, камфорсульфонат, арилоксид или арилоксид, замещенный как минимум одной электроноакцепторной группой.

Во втором аспекте тринадцатого варианта исполнения LG' выбирают из п-нитрофеноксида, 2,4-динитрофеноксида и пентафторфеноксида.

Четырнадцатый вариант исполнения направлен на изотопно-меченый аналог R_p-4 или S_p-4, Термин "изотопно-меченый" аналог относится к аналогу R_p-4 или S_p-4, который является "дейтерированным аналогом", "¹³C-меченым аналогом," или "дейтерированным/¹³C-меченым аналогом". Термин "дейтерированный аналог" означает соединение, описанное в данной заявке, в котором ¹H-изотоп, т.е. водород (H), замещен на ²H-изотоп, т.е. дейтерий (D). Замещение дейтерия может быть частичным или полным. Частичное замещение дейтерия означает, что как минимум один атом водорода замещен как минимум одним дейтерием. Например, для R_p-4 или S_p-4 средний специалист может предусмотреть как минимум следующие частичные дейтерированные аналоги (где "d_n" представляет собой n-количество атомов дейтерия, например для изопропильной группы n = 1-7, в то время как для фенильной группы, n = 1-5), также как те, что обозначены ниже



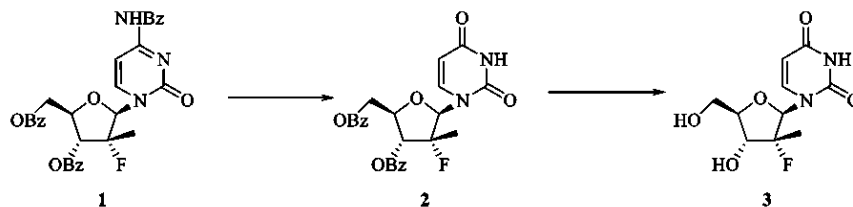
Хотя метильные группы, обозначенные выше, показаны как полностью дейтерированные, будет признано, что частично-дейтерированные вариации являются также возможными, например -CDH₂ и -CD₂H. Также рассмотрены изотопные метки фуранозы и основания. Аналогично, термины "¹³C-меченый аналог" и "дейтерированный/¹³C-меченый аналог" относятся к соединению, описанному в данной заявке, где атом углерода обогащен ¹³C-изотопом, обозначая, что степень обогащения превышает обычное природное распространение, составляющее приблизительно 1,1%.

Примеры

Не для того чтобы быть ограниченными примерами, следующие примеры служат для того, чтобы способствовать лучшему пониманию данного описания.

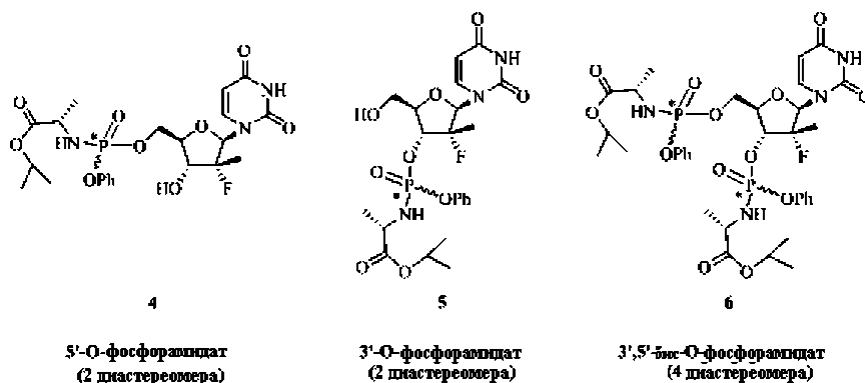
Синтетические аспекты.

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'-О-добензоил-2'-дезоксид-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'-О-добензоил-2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метил-уридина (2). Бензоиловые сложные эфиры могут быть подвергнуты гидролизу при помощи ряда способов, а также, например, алкоксидами в спиртовом растворителе, например метоксидом натрия в метаноле, карбонатом калия в метаноле или аналогами этанола, алкиламинами, например метиламином в метаноле, бутиламино 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'-гидроксиде, а не при 3'-гидроксиде по сравнению с литературной ссылкой, посредством использования более низких температур и медленного добавления нуклеозида.



Используя процедуры Lehsten для соединения, описанного в данной заявке, обеспечено от приблизительно 1-5% монозамещенных 3'-О-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-граммовом 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'-О-фосфорамидатных диастереомеров (5) с более легким хроматографическим разделением, таким образом, получая целевые 5'-О-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. Наблюдала, что первичный 5'-гидроксил реагирует с более высокой скоростью, чем вторичный 3'-гидроксил. Это создает конкурирующую ситуацию между ходом реакции с расходом всего исходного нуклеозида и превращения 5'- и 3'-монозамещенных 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 образование 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.

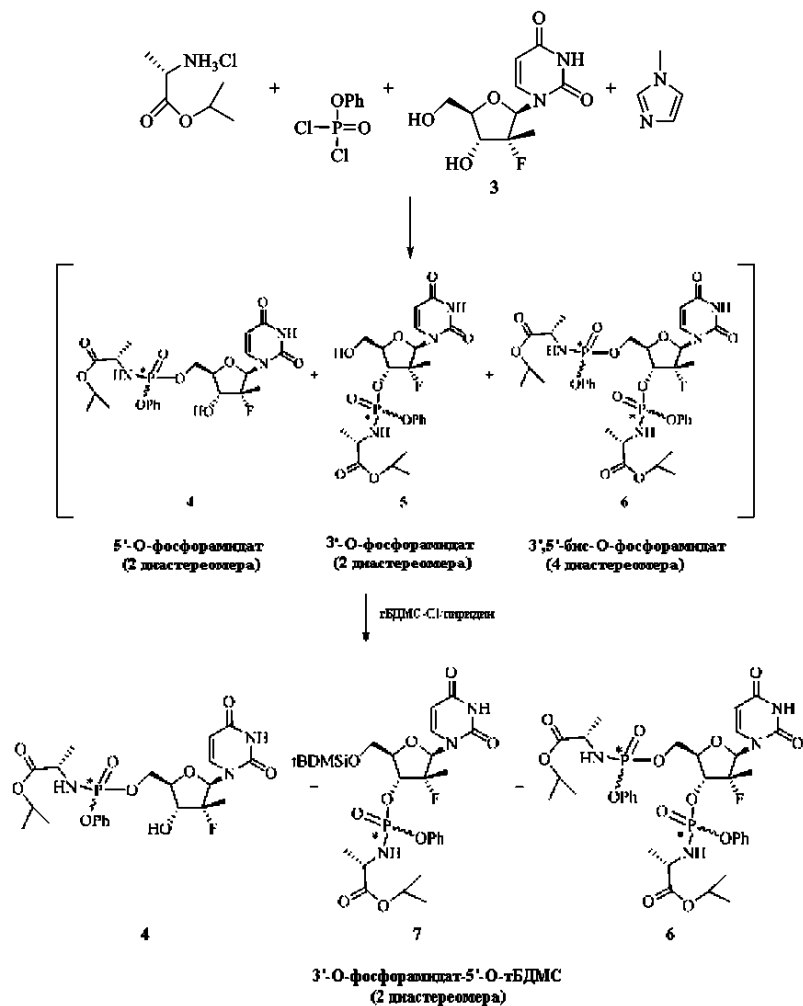
В одной альтернативной процедуре 3'-гидроксидоблокированное производное 3 получали с использованием трет-бутилдиметилсилил блокирующей группы, в две стадии. Затем его превращали в его 5'-фосфорамидатное производное. Целью являлось, чтобы силильная группа могла быть затем удалена и не существовало 3' изомеров (5) или 3',5'-бис фосфорамидатов (6). Аналогичный подход был продемонстрирован Borch and Fries (патент США 5233031) 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 гидроксидом 3'-О-фосфорамидатной примеси 5 по сравнению с вторичным гидроксидом 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 многокилограммовом 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 (NMH) в качестве основания. В присутствии NMH силилирование является менее селективным. Преимущественно, количество NMH должно быть уменьшено. Этого можно легко достигнуть после фосфорамидатной реакции путем промывания реакционного раствора 1N соляной кислотой. NMH 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 силилированного 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 силильной обработки. Аналогично, обработка диметокситрифенилметилхлоридом (ДМТ-Cl) 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'-гидроксидом. 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 изо-пропил L-аланатфенилфосфорамидата 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина 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 визуализации тонкослойной хроматографии (ТСХ). Также СЭЖХ/МС 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 силильная группа преимущественно реагировала со свободным 5'-гидроксидом 3'-О-фосфорамидатом с образованием 7. Реакцию продолжали, пока 3'-О-фосфорамидат больше не был детектирован при помощи СЭЖХ/МС.



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'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина (3).

В 10-литровую колбу добавляли 3',5'-О-дibenзоил-2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метил-N4-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 дибензоилуридиновое промежуточное вещество использовали непосредственно в следующей стадии путем добавления его всего к свежеполученному метанольному аммоний (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 целитную

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 (ДМСО-*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'-Ha, C-3'H, C-4'H), 3,63-3,60 (т, 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-2H-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (4).

Синоним: диастереоизомерная смесь 5'-O-(изопропил-L-аланат, фенилфосфорамидил)-2'-дезоксид-2'-фтор-2'-C-метил-уридина.

3-горлую 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 полч. Раствору позволяли перемешиваться в течение 1 ч в данном температурном диапазоне. 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-C-метил-уридин (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. ТСХ (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. ТСХ через 3 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 (³¹P и ¹H). ³¹P-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/МС. 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 Rp 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 Rp и главным образом Sp 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 ММНг) в течение 1 ч с получением 42 г партии примесей (4:1 высшего изомера относительно низшего, исходя из ³¹P-ЯМР) и 38 г партии чистого продукта (1:3 высшего изомера относительно низшего). Партию примесей снова пропускали через колонку аналогич-

ным 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 сниженном давлении и сушили (50°C, 0,2 ММНг, 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-бутилметилловым 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 ММНг, 24 ч) с получением белого аморфного порошка (64 г) с широким интервалом температур плавления, составляющим прибрл. 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 сушке при аналогичных условиях пока содержание остаточного дихлорметана не падало ниже 400 ppm согласно измерениям при помощи парофазной газовой хроматографии. Полученный в результате мелкодисперсный серовато-белый и белый аморфный порошок имел диапазон температур стеклования, составляющий 53,7-63,5°C.

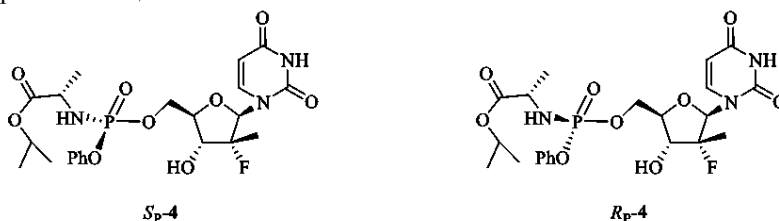
Характеристика смеси изомеров (4): ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 10,05 (br s, 1H, NH, S_P), 10,00 (br s, 1H, NH, R_P), 7,49 (d, 1H, C6-H, S_P), 7,36 (m, 5H, C6-H, R_P , ароматика), 7,23-7,14 (m, 6H, $\text{R}_\text{P}/\text{S}_\text{P}$, ароматика), 6,18 (br d, 2H, C1'-H, $\text{R}_\text{P}/\text{S}_\text{P}$),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

^{31}P -ЯМР (CDCl_3) δ 3,60 (R_P), 3,20 S_P относительно трифенилфосфата при -17,80 ppm. ES-MS $\text{M}+1$ 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 изопропанол (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°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, o-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 (т, 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 высушенный, дважды, 50 мл толуола каждый раз) в дихлорметане (100 мл) добавляли фенилдихлорфосфат (7,5 мл, 50 ммоль) при комнатной температуре. Смесь охлаждали до -10°C и затем добавляли раствор NMH (30,5 мл, 384,3 ммоль) 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'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридин (3) (10 г, 38,4 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 (200 мл). EtOAc слой промывали водой (100

мл), 1N HCl (3×75 мл), 2% водным раствором NaHCO₃ (50 мл) и соевым 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 ³¹P 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 S_p-4, температура плавления 93,9-104,7°C, ВЭЖХ чистоты 99,74% (3,11 г, 15,2 % из уридинового нуклеозида).

S_p-4 ¹H-ЯМР (CDCl₃) 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, Cl'-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'-OH, 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 (20,6 г, 123 ммоль, азеотропно высушенный, 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 NMI (61,3 мл, 769 ммоль) в 60 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'-дезоксид-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 соевым раствором (50 мл). 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 двугорлой круглодонной колбе, оснащенной механической мешалкой. При перемешивании, медленно добавляли 100 мл гептана и перемешивали суспензию в течение 1 ч. Верхний слой декантировали и остаток снова перемешивали с 50 мл 2:3 EtOAc/гептанового растворов в течение 10 мин и затем декантировали. Остаток высушивали в высоком вакууме с получением белой пены (31 г).

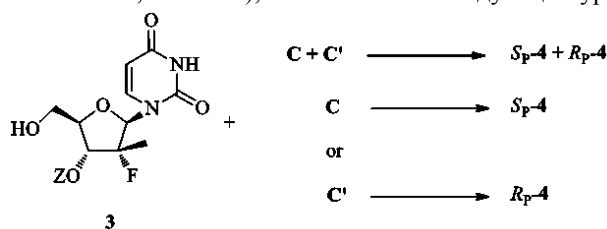
Указанную выше пену растворяли в 46 мл ДХМ и затем добавляли 95 мл ИПЭ с получением насыщенного раствора. Раствор фильтровали через небольшой слой целита и фильтрат перемешивали с затравкой S_p-4 в течение 72 ч при температуре окружающей среды. Белое твердое вещество фильтровали, промывали ИПЭ (30 мл) и сушили с получением 7,33 г (~85:15 смесь S_p-4 : R_p-4 соответственно, как определено при помощи ³¹P 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 S_p-4, (4,78г, 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'-дезоксид-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 S_p-4 затравкой при температуре окружающей среды. Белое твердое вещество фильтровали и промывали ИПЭ (5 мл) с получением 1,28 г продукта. ³¹P ЯМР выявил, что указанный выше продукт содержал 77:23 смесь S_p-4 : R_p-4 соответственно. Ее повторно кристаллизовали из 20 мл ДХМ с получением 0,75 г >99% чистого S_p-4 (приблизительно 12% из уридинового нуклеозида). Такое получение S_p-4 не требует стадии силилирования, которое производили для смеси, так что выше показана вся реакционная процедура. Аспекты для монокристаллической и полиморфной форм S_p-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 диизопропи-

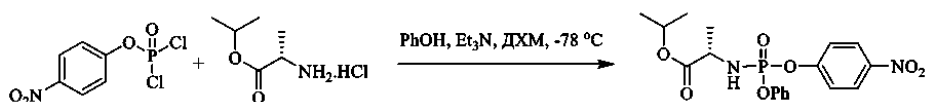
лового простого эфира может варьироваться в зависимости от чистоты продукта.). В раствор вводили затравку неочищенного S_p-4 (> 99%) и смесь осторожно перемешивали мешалкой при комнатной температуре в течение 20 ч (образование твердого вещества наблюдали через 2 ч). Твердое вещество фильтровали, промывали 40 мл смеси диизопропилового простого эфира/дихлорметана (1:1) и сушили с получением белого твердого вещества (16,6 г, 89,35% чистого S_p-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 10 мл холодного ДХМ. Твердое вещество высушивали в вакууме с получением S_p-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 S_p-4 (99,74 % по данным ВЭЖХ).

Соединения S_p-4 и R_p-4 могут быть получены альтернативно в соответствии с девятым или десятым вариантом воплощения путем реакции нуклеозида (защищенного или незащищенного) 3 с изопропилаланилфосфорамидатом (смесь С и С', С или С'), как показано в следующем уравнении:



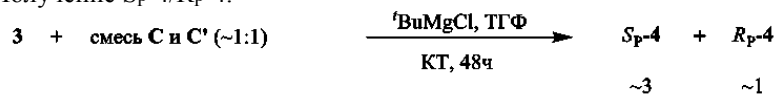
P.D. Howes et al. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2003, Vol. 22, Nos. 5-8, pp. 687-689 ("Howes") описывает 2'- и 5'-фосфорамидаты, полученные реакцией с трет-бутилмагний хлоридом. В данной статье Howes описывает, что если 3'-дезокситидиновый нуклеозид реагирует с метиловым эфиром (S)-2-[хлорфеноксифосфориламино]пропионовой 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-нитрофеноксифосфориламино]пропионовой кислоты



В перемешанный раствор 4-нитрофенил фосфордихлорида (12,8 г, 50 ммоль) в дихлорметане (100 мл) добавляли раствор фенола и третиламина (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 третиламина (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, ДМСО-d₆): δ -0,31, -0,47; ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-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 = 9,2 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 Гц, 3H), 1,22 (dd, J = 6,2 & 3,0 Гц, 6H); Масс-спектрометрия (электроспрей ионизация) m/z 407 (M-1)⁺.

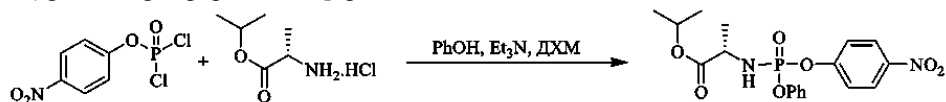
Пример 5-2. Получение S_p-4/R_p-4.



В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (130 мг, 0,5 ммоль) в сухом ТГФ (1,5 мл) 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-нитрофеноксифосфориламино]пропионовой кислоты (1:1 смесь изомеров, 408 мг, 1 ммоль) в ТГФ (1,5 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 5 мин. Смеси позволяли перемеши-

ваться при комнатной температуре в течение 48 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH_4Cl (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 -4/ R_P -4 в соотношении приблизительно 3,05:1,0).

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



Гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира с то (330 г, 1,97 моль) предварительно высушивали путем совместного испарения толуолом (2×400 мл) при сниженном давлении и затем высушивали в вакуумной печи (50°C , 0,2 ММНг, 17 ч). В перемешанный раствор 4-нитрофенил фосфордихлорида (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 температуры 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 $-5\sim 0^\circ\text{C}$ в атмосфере азота в течение 10 мин. Остаток соли аминокислотного эфира 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 $0\sim 10^\circ\text{C}$ 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 сниженном давлении с получением прозрачного светло-коричневого масла. Остаток совместно испаряли с гексаном (2×140 мл) для удаления любого остаточного МТБЭ и подвергали дополнительной сушке в вакууме при 40°C в течение 2 ч. Сухой остаток смешивали с диизопропиловым 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 Нг) 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, DMCO-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 Нг) 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 P -ЯМР. Температура плавления $62\sim 66^\circ\text{C}$.

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

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

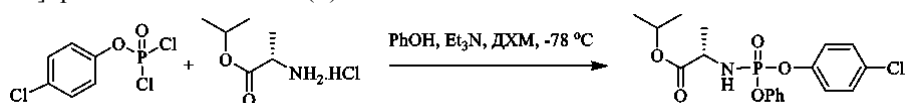
Стереохимия 8 (S_P -изомера) была подтверждена рентгеновской кристаллографией монокристалла, см. подробное описание, представленное ниже.

Пример 7. Разделение диастереоизомерной смеси изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфиламино]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)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты. Соответствующие фракции многократных пропусков соединяли и концентрировали при сниженном давлении с получением 2,9 г R_p-изомера изопропилового эфира [(S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты в виде светло-желтого вязкого масла и 1,9 г S_p-изомера изопропилового эфира [(S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]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)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, R_p-изомер): ³¹P ЯМР (162 МГц, DMSO-d₆): δ -0,47; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 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 Гц, 1H), 4,86-4,77 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,20 (d, J=7,2 Гц, 3H), 1,10 (dd, J=6,2, 2,2 Гц, 6H); MS (электроспрей ионизация) m/z 407 (M-1)⁺.

Пример 8-1. Получение рацемического изопропилового эфира 2-[(4-хлорфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (±)

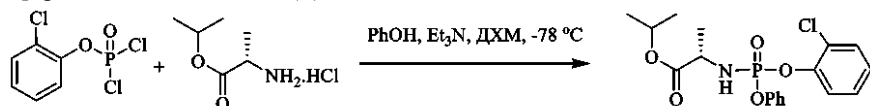


В перемешанный раствор 4-хлорфенил фосфордихлоридата (2,45 г, 10,0 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли раствор фенола (0,94 г, 10 ммоль) и третиламина (1,56 мл, 11 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорида L-аланин изопропилового сложного эфира (1,67 г, 10 ммоль) в дихлорметане (50 мл) при 0°C. В смесь добавляли вторую порцию третиламина (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 сниженном 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(феноксифосфориламино)пропаноата (4).

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (3, 2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7М 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-хлорфенокси)феноксифосфориламино]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-хлорфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (±)



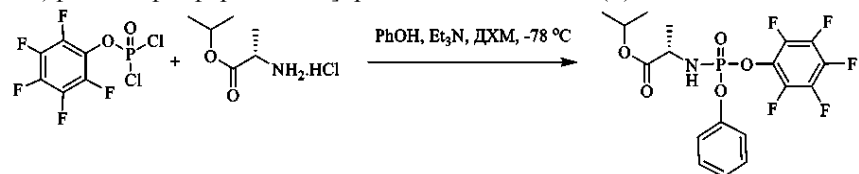
В перемешанный раствор 2-хлорфенил фосфордихлоридата (9,8 г, 40 ммоль) в дихлорметане (80 мл) добавляли раствор фенола (3,76 г, 40 ммоль) и третиламина (6,16 мл, 44 ммоль) в дихлорметане (80 мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 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 третиламина (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 этил-

ацетатом (100 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженном 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. ^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -1,58, -1,61; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): 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 ($\text{M}-1$) $^+$. 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)фосфориламинопропаноата.

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (3, 2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7М 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-хлорфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (рацемический, 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 5-10% целевого продукта были образованы по сравнению с исходным нуклеозидом.

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

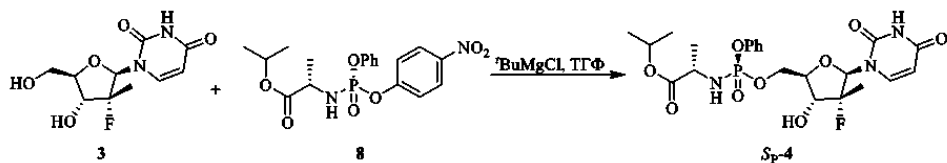


В перемешанный раствор пентафторфенил фосфордихлорида (6,0 г, 20 ммоль) в дихлорметане (40 мл) добавляли раствор фенола и триэтиламина (3,08 мл, 22 ммоль) в дихлорметане (40 мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили 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 порцию 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-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфориламинопропаноата.

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (3, 2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7М раствора трет-бутилмагний хлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 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)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (4,08 г, 10 ммоль) в ТГФ (15мл) 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 40-50% целевого продукта были образованы по сравнению с исходным нуклеозидом.

Получение и очистка С или С' обеспечивает непосредственный доступ к $\text{S}_\text{P}-4$ или $\text{R}_\text{P}-4$, что проиллюстрировано следующими примерами.



Пример 11. Получение $\text{S}_\text{P}-4$ (32 мг-шкала).

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-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

ние периода, составляющего 3 мин. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфиламино]пропионовой кислоты (8, S_p-изомер) в ТГФ (0,5 мл) 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 NH₄Cl (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 ³¹P 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-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7М 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)феноксифосфиламино]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 NH₄Cl (20 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (150 мл) и последовательно 10% водным раствором 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 (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 NaНМДС.

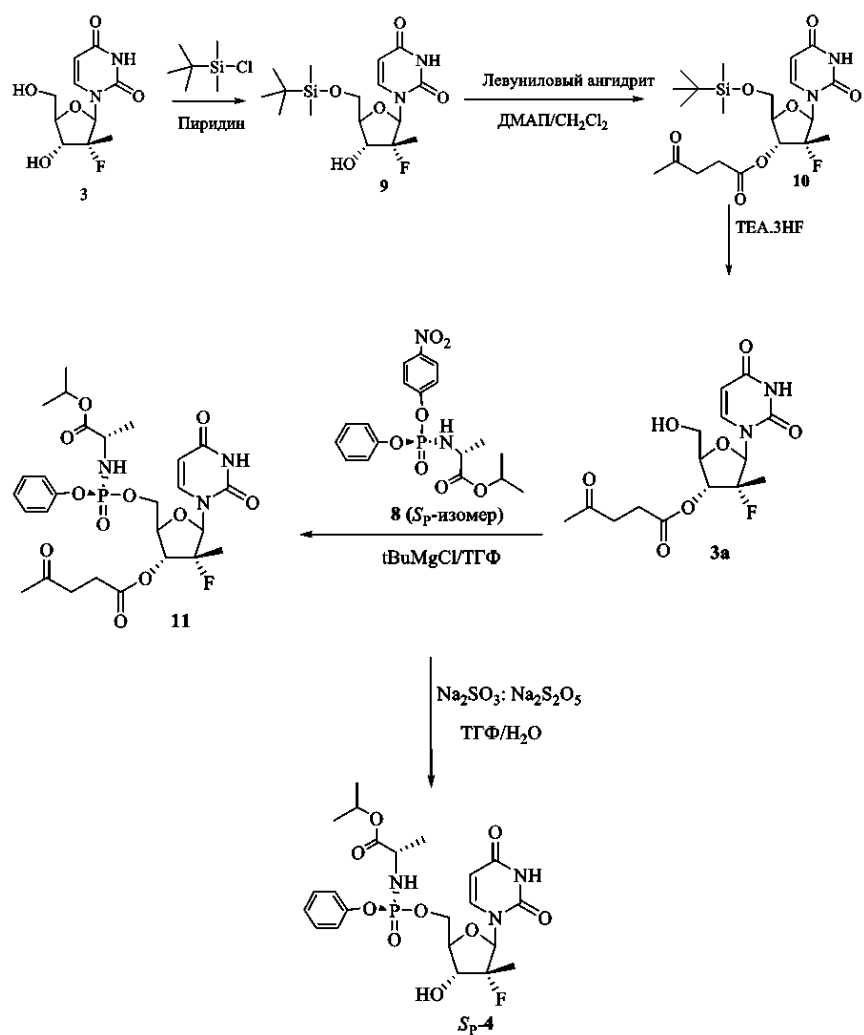
В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (71 мг, 0,27 ммоль) в сухом ТГФ (2,0 мл) добавляли 2,0М раствор натрий бис(триметилсилил)амида (NaНМДС) в ТГФ (270 мкл, 0,54 ммоль) при -78°C в течение периода, составляющего 2 мин. Через 30 мин в смесь добавляли раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфиламино]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% метанол/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-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (260 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (6 мл) добавляли 1,7М 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)феноксифосфиламино]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 NH₄Cl (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-иммдметилсилил-2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина (9).

В перемешанный раствор 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина (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'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина (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 сниженном 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'-дезоксид-2'-фтор 2'-С-метил-уридина (3a).

Неочищенный 10 (197,6 г, ~312,1 ммоль) растворяли в ДХМ (1 л), в который добавляли ТЭА.3НФ (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.3НФ (50,3 г, 312,1 ммоль) и реакционной смеси позволяли перемешиваться в течение 6 ч. ТСХ в данный момент указывала на приблизительно 10% непрореагировавшего исходного материала. Добавляли еще один эквивалент 0,25 ТЭА.3НФ (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'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина). 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-оксепентаноил)-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]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 (1,7М в ТГФ, 2 экв.) и позволяли нагреваться до температуры окружающей среды и перемешивали в течение получ. В данную смесь добавляли реагент (прибл. 97% хиральной чистоты) изопропиловый эфир (S)-2-[(S)-(4-нитрофеноксифеноксифосфориламино)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 органический слой промывали соевым 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 метилхлориде 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%. ³¹P ЯМР (CDCl₃, 162 МГц): 3,7 ppm; ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,22 (dd, 6H, J = 6,4 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 Гц), 4,2-4,33 (m, 1H), 4,57 (d, 1H, J = 8 Гц), 4,96-5,00 (sept, 1H), 5,2 (dd, 1H, J = 9 Гц), 5,42 (d, 1H, J = 8 Гц), 6,19 (d, 1H, J = 18 Гц), 7,15-7,35 (m, 5H), 7,5 (d, 1H, J = 5,6 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-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]феноксифосфорил-амино}пропионовой кислоты.

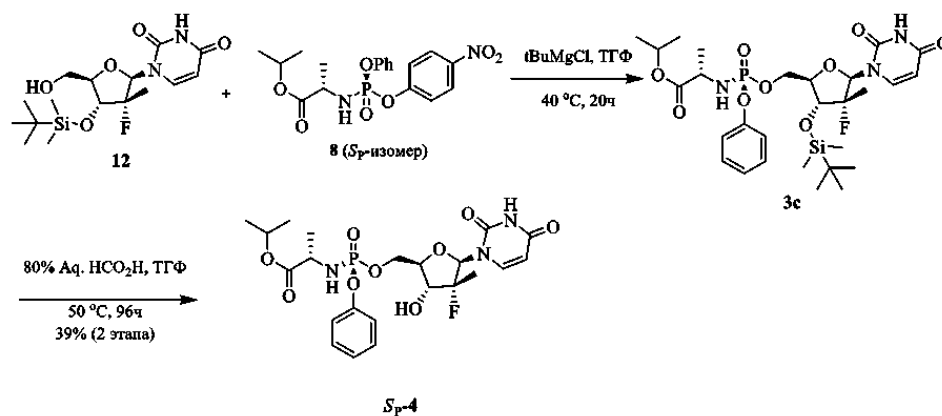
Раствор сульфита натрия получали путем добавления Na₂S₂O₃ (1,51 г) та Na₂S₂O₅ (0,57 г) в воде (25 мл). В раствор леулината (11, 250 мг, 0,40 ммоль) в безводном ТГФ (2,5 мл) добавляли 1,0 мл раствора сульфита натрия. Раствору позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную 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 5_p-4 из 3а.

В перемешанный раствор эфира 4-оксепентановой кислоты (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиримидин-1-ил)-4-фтор-2-гидроксиметил-4-метилтетрагидрофуран-3-ила (3а, 210 мг, 0,59 ммоль) в сухом ТГФ (1,5 мл) добавляли 1,7М 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-нитрофеноксифеноксифосфориламино)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 Na₂CO₃ (3 × 10 мл), а затем водой. Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка (410 мг). Неочищенный 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% Me-OH/ДХМ градиента приводила к получению непрореагировавшего исходного материала (89 мг) и Sp-4 (57 мг, 18% выход, 24% исходя из восстановленного исходного материала).

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



Пример 17-1. Получение 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона, 12.

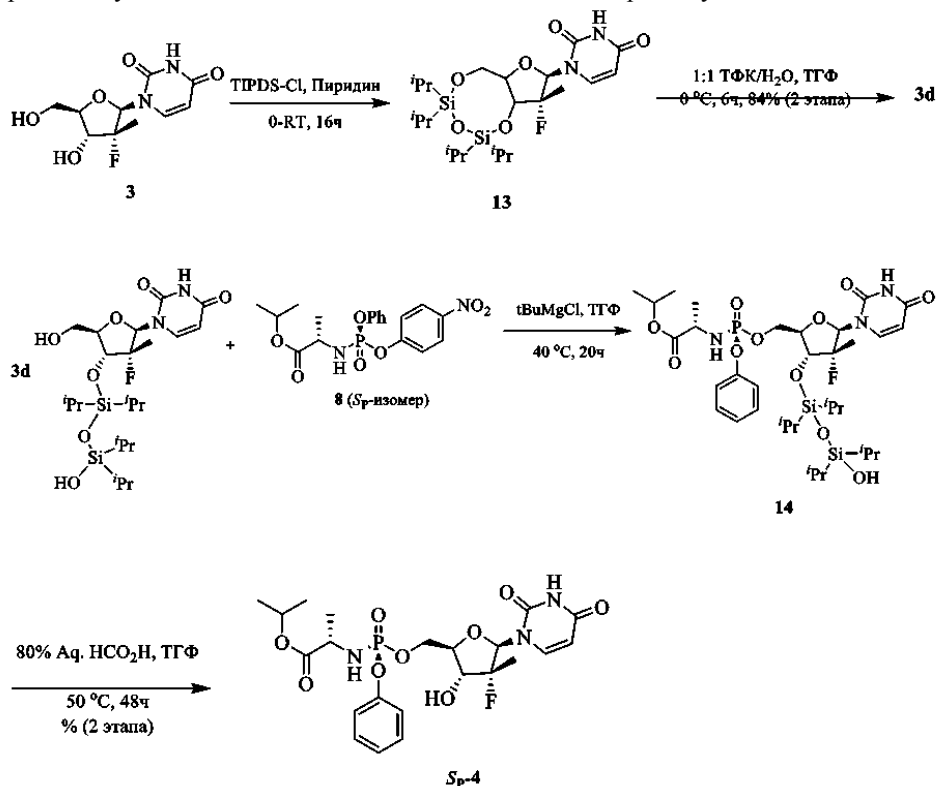
В раствор 3 (10,0 г, 38,43 ммоль) в пиридине (50 мл) добавляли дихлорметан (50 мл). Раствор охлаждали до 0 °C. В раствор добавляли 4,4'-диметокситритил хлорид (14,32 г, 42,27 ммоль) раствор перемешивали при 0 °C в течение 5 ч. Метанол (5 мл) добавляли для погашения реакции. Раствор концентрировали до сухого остатка при сниженном давлении и остаток разделяли на фракции между этилацетатом (500 мл) и водой (50 мл). Органический раствор промывали соевым 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'-O-ДМТ-3'-O-tБДМС продукта промежуточного вещества. Его в свою очередь обрабатывали 1% трифторуксусной 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 раствор 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 (ДМСО-d₆) 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 Sp-4 при помощи 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (3с).

В перемешанный раствор 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (12, 374 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл) добавляли 1,7M 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)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, Sp-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), а затем водой (20 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка, содержавшего 3с (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% Ме-ОН/ДХМ градиента привела к получению непрореагировавшего исходного материала (21 мг) и Sp-4 (77 мг, 35% выход, 39% выход, исходя из восстановленного исходного материала).

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



Пример 18-1. Получение 3d.

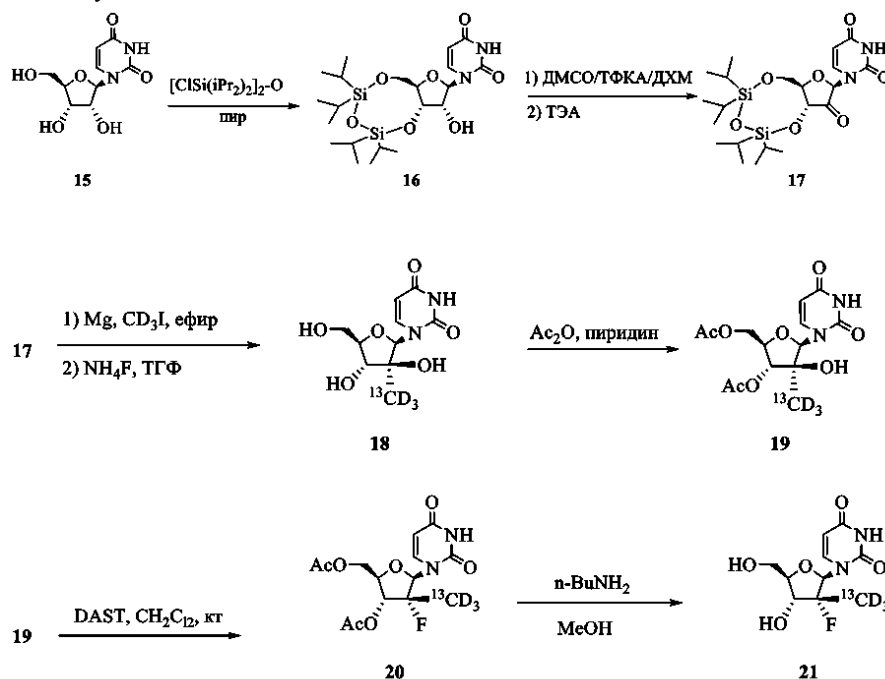
В перемешанный раствор 3 в пиридине (20 мл) при 0°C добавляли TIPDS-Cl по каплям в течение периода, составляющего 15 мин. Смеси медленно позволяли нагреваться до комнатной температуры при такой температуре ее перемешивали в течение 16 ч. Пиридин испаряли и остаток совместно испаряли с толуолом (50 мл). Остаток затем растирали в порошок с гексаном и белый осадок отфильтровывали, используя целитную подложку. Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением пенного твердого вещества (12,97 г). Неочищенный продукт (13) повторно растворяли в тетрагидрофуране (75мл) 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. ТСХ 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 растирание 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 г, 84 % выход в течение 2 стадий). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,83 (bs, 1H), 7,94 (bd, J=6,0Гц, 1H), 6,10 (bd, J=18,4Гц, 1H), 5,71 (d, J=8,2Гц, 1H), 4,43 (bs, 1H), 4,36 (dd, J=22,6, 9,0Гц, 1H), 4,27 (bs, 1H), 4,10 (d, J=13,2Гц, 1H), 4,03 (d, J=9,2Гц, 1H), 3,92 (d, J=13,2Гц, 1H), 1,39 (d, J=22,0Гц, 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 непрореагировавшего 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-6H-фуоро[3,2-f][1,3,5,2,4]триоксадисилоцин-8-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, 16.

Уридин (15, 100,0 г, 409,5 ммоль) совместно испаряли до сухого остатка с безводным пиридином (600 мл) и повторно сублимировали в безводном пиридине (700 мл). К данной перемешанной мелкодисперсной суспензии добавляли 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисулкан (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), соевым раствором (500 мл), высушивали над твердым сульфатом натрия (50 г), фильтровали и концентрировали при сниженном 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 ТСХ (фактор ретенции 0,55 в 1:1 гексан-этилацетате) и соединяли и концентрировали при сниженном давлении и сушили (40°C, 0,2 мм Нг, 24 ч) с получением 145,5 г (76%) 16 в виде белого пенного твердого вещества. Также собирали дополнительную фракцию (35 г) слегка загрязненного 16. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆) 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'-OH), 5,50-5,49 (m, 2H, 1'-H и H-5), 4,14-4,18 (m, 3H, 2',3',4'-H), 3,97-3,87 (m, 2H, 5'-H и Hb), 1,02-0,95 (m, 28H, CH(CH₃)₂).

Пример 19-2. Получение 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-тетраизопропил-9-оксотетрагидро-6H-фуоро[3,2-f][1,3,5,2,4]триоксадисилоцин-8-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, 17.

В сухую трехгорлую круглодонную колбу добавляли безводный ДХМ (600 мл) и ДМСО (30,82 г, 394,5 ммоль). Раствор охлаждали до -78°C на бане сухой лед/ацетон в атмосфере азота. Ангидрид трифторуксусной 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 ДХМ (600 мл) в течение 75 мин при -78°C при помощи дополнительной воронки. Гетерогенную смесь перемешивали в течение 2 ч при -78-65°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 ТСХ (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 NH₄Cl (180 мл). Добавляли воду (200 мл) и отделяли органический слой. Водный слой экстрагировали снова ДХМ (300 мл). Соединенный органический слой промывали водой (3× 400 мл), соевым раствором (150 мл) и сушили над Na₂SO₄. Удаление растворителя приводило к получению вязкого коричневого остатка.

Остаток в виде неочищенного масла (содержал следы ДХМ) хранили всю ночь в камере заморажи-

вания. 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% ДХМ 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 °С 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-пердейтерио-метилтетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-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 эфиром (80 мл) добавляли. К магнию в простом эфире медленно добавляли пердейтерио-¹³C метилиодид (15,06 г, 110,3 ммоль), который выделялся в экзотермической реакции. Затем реакционную смесь охлаждали, супернатант переносили в раствор высушенного соединения 17 (50°C, 0,2 мм Hg, 15 ч) (10,0 г, 20,63 ммоль) в безводном ТГФ (1л) при -50°C в течение 20 мин. Температуру позволяли повышаться до -40°C и смесь перемешивали при от -40 до -25°C в течение 4 ч. После завершения реакции смесь разбавляли EtOAc (1 л) 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 флэш-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 (DMCO-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-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-гидрокси-4-¹³C-метилтетрагидрофуран-2-ил)метил ацетат, 19.

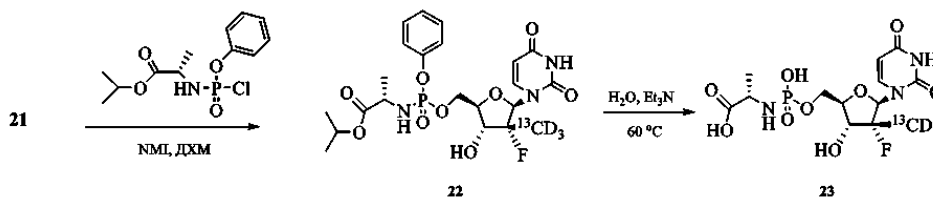
К раствору соединения 18 (5,00 г, 19,1 ммоль) в безводном пиридине (100 мл) добавляли уксусный ангидрид (3 мл) при температуре окружающей среды. Полученную в результате смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 15 ч, разбавляли EtOAc (250 мл), промывали водой (50 мл × 3) и сушили сульфатом натрия. После фильтрования и концентрирования остаток очищали флэш-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-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-4-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метилацетата, 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 флэш-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)пиримидин-2,4(1H,3H)-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 флэш-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-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фос-фориламино)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 (1,0М, 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 фосфорамидата, 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(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(гидрокси)фосфорил)амино)пропановой кислоты, 23.

Фосфорамидат 22 (147 мг, 0,276 ммоль) суспендировали в триэтилаmine (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, спектроскопии 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, и 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 SiKα излучения (40 кВ, 40 мА), θ-θ гониометр, дивергенция V20 и принимающие щели, графитовый вторичный монохроматор и сцинтилляционный счетчик. Эксплуатационные характеристики устройства проверяли при помощи сертифицированного корундового стандарта (NIST 1976). Для сбора данных использовали программное 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°2θ; размер шага: 0,05°2θ; 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 CuKα излучения (40 кВ, 40 мА), автоматизированная XYZ стадия, лазер-

ный видеомикроскоп 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 проба - детектор, составляющим 20 см, что дает эффективный 2θ диапазон, составляющий $3,2-29,7^\circ$. Типично проба будет подвергнута воздействию рентгеновского луча в течение 120 с. Программным обеспечением, которое использовали для сбора данных, было GADDS для WNT 4,1,16 и данные анализировали и представляли при помощи Diffra 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 и S_p -4 показана в табл. 1, где все пики проявляют интенсивность, составляющую $\leq 5\%$ (R_p -4) и не учитывая $\leq 3\%$ (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 $^\circ$	Интенсивность %	Угол 2-тета $^\circ$	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 фильтрации 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, содержавшего 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 рентгеног 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.

Таблица 2

Угол	Интенсивность
2-Тета°	%
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. S_p-4, форма 2.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции S_p-4, форма 2, показана на фиг. 5.

Перечень пиков S_p-4, форма 2, представлен в табл. 3.

Таблица 3

Угол	Интенсивность %
2-Тета°	%
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. S_p-4, форма 3.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции S_p-4, форма 3, показана на фиг. 6.

Перечень пиков S_p-4, форма 3, представлен в табл. 4.

Таблица 4

Угол	Интенсивность %
2-Тета °	%
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. S_p-5, форма 4.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции S_p-4, форма 4, представлена на фиг. 7.

Перечень пиков S_p-4, форма 4, представлен в табл. 5.

Таблица 5

Угол	Интенсивность %
2-Тета °	%
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. S_p-4, форма 5.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции S_p-4, форма 5, представлена на фиг. 8.

Перечень пиков S_p-4, форма 5, представлен в табл. 6.

Таблица 6

Угол	Интенсивность %
2-Тета °	%
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. S_p-4 (аморфный).

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

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

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

Фиг. 10 показывает рентгеновскую кристаллическую структуру для S_p-4 форма 1. На данной фигуре показан вид молекул формы 1 из кристаллической структуры, где показана использованная схема нуме-

рации. 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 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 $\Delta/\sigma(\text{макс})$ 0,001, $\Delta/\sigma(\text{среднее})$, 0,000. Конечная разностная карта от +0,534 до -0,36 е \AA^{-3} .

Таблица 7. Параметры монокристаллов формы 1

Молекулярная формула	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁					
Молекулярная масса	529,45					
Кристаллическая система	Моноклинная					
Пространственная группа	P2 ₁	a	20,0898(5)Å,	α	90°,	
		b	6,10290(10)Å,	β	112,290(3)°,	
		c	23,0138(6)Å,	γ	90°	
V	2610,79(10)Å ³					
Z	4					
D _c	1,347 г.см ⁻¹					
μ	1,475 мм ⁻¹					
Источник, λ	Cu Kα, 1,54178Å					
F(000)	1112					
T	100(1)K					
Кристалл	Бесцветная пластина, 0,12 x 0,09 x 0,03мм					
Данные усечены до	0,80 Å					
θ _{макс}	74,48°					
Полнота	99,4%					
Отражения	14854					
Уникальные отражения	7513					
R _{внутр}	0,0217					

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

Фиг. 11 показывает рентгеновскую кристаллическую структуру для S_P-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 F² 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 $\Delta/\sigma(\text{макс.})$ 0,000, $\Delta/\sigma(\text{среднее})$, 0,000. Конечная разностная карта от +1,388 до -0,967 е \AA^{-3} .

Таблица 8. Параметры монокристаллов формы 2

Молекулярная формула	C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ FN ₃ O ₉ P					
Молекулярная масса	614,38					
Кристаллическая система	Моноклинная					
Пространственная группа	P2 ₁	a	12,8315(3)Å,	α	90°,	
		b	6,14530(10)Å,	β	91,752(2)°,	
		c	17,6250(4)Å,	γ	90°	
V	1389,14(5)Å ³					
Z	2					
D _c	1,469 г.см ⁻¹					
μ	3,196 мм ⁻¹					
Источник, λ	Cu-K, 1,54178Å					
F(000)	640					
T	293(2)K					
Данные усечены до	0,80 Å					
θ _{макс}	62,23°					
Полнота	91,1%					
Отражения	3528					
Уникальные отражения	2562					
R _{внутр}	0,0227					

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

Фиг. 12 отображает рентгеновскую кристаллическую структуру (ORTEP - анизотропный) Sp-4 (форма 2). Кристаллическая структура метилхлоридного сольвата Sp-4 (форма 2), $C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$, приводит к получению моноклинной пространственной группы $P2_1$ (систематические отсутствия $0k0$: $k=\text{odd}$) с $a=12,8822(14)$ Å, $b=6,1690(7)$ Å, $c=17,733(2)$ Å, $\beta=92,045(3)^\circ$, $V=1408,4(3)$ Å³, $Z=2$ и $d_{\text{расч}}=1,449$ г/см³, интенсивность кристаллографических данных зарегистрирована на площадном детекторе Rigaku Mercury CCD с использованием графит-монокроматированного Mo-K α излучения ($\lambda=0,71073$ Å) при температуре 143К. Предварительное индексирование выполняли в серии из двенадцати $0,5^\circ$ изображений вращения с воздействиями, составляющими 30 с. Всего было собрано 648 изображений вращения с состоянием кристалл - детектор, составляющим 35 мм, 290° углом отклонения, составляющим -12° , шириной вращений, составляющими $0,5^\circ$, и воздействиями, составляющими 30 с: скан №1 представлял собой ϕ -скан от 315 до 525° при $\omega = 10^\circ$ и $\chi = 20^\circ$; скан №2 представлял собой ω -скан от -20 до 5° при $\chi = -90^\circ$ и $\phi = 315^\circ$; скан №3 представлял собой ω -скан от -20 до 4° при $\chi = -90^\circ$ и $\phi = 135^\circ$; скан №4 представлял собой ω -скан от -20 до 5° при $\chi = -90^\circ$ и $\phi = 225^\circ$; скан №5 представлял собой ω -скан от -20 до 20° при $\chi = -90^\circ$ и $\phi = 45^\circ$. Изображения вращения обрабатывали при помощи CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), получая перечень неусредненных F^2 и $\sigma(F^2)$ значений, которые затем передавали в программный пакет CrystalStructure (CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigaku/MS (2002)) для дополнительной обработки и решения структуры на компьютере Dell Pentium III. Всего было измерено 7707 отражений в диапазонах $5,48 \leq 2\theta \leq 50,04^\circ$, $-14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$, приводя к получению 4253 уникальных отражений ($R_{\text{внутр}} = 0,0180$). 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. Cascarano, 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 SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) ActCryst., A64, 112-122). Все отражения использовали во время оптимизации. Использовали схему весовых коэффициентов использовали

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

где $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Неводородные атомы оптимизировали анизотропно и атомы водорода оптимизировали с использованием модели "райдинга". Оптимизацию сводили в $R_1=0,0328$ и $wR_2=0,0817$ для 4046 отражений, в которых $F > 4\sigma(F)$ и $R_1=0,0348$, $wR_2=0,0838$ 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 $-0,389$ е/Å³. Flack абсолютный структурный параметр 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 Sp. 4-CH₂Cl₂

Формула:	$C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$
Молекулярная масса:	614,38
Кристаллический класс:	моноклинный
Пространственная группа	$P2_1$ (#4)
Z	2
Постоянные ячейки:	
a	12,8822(14) Å
b	6,1690(7) Å
c	17,733(2) Å
β	$92,045(3)^\circ$
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 ($\lambda=0,71073\text{\AA}$)
2θ диапазон	5,48 – 50,04 °
hkl собранные:	$-14 \leq h \leq 15$; $-7 \leq k \leq 6$; $-19 \leq l \leq 21$
№ 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 Sp-4 (форма 3).

Фиг. 13 показывает рентгеновскую кристаллическую структуру для Sp-4, форма 3. На данной фигуре показан вид молекул формы 3 из кристаллической структуры, где показана использованная схема нумерации. Эллипсоиды анизотропного смещения атомов для неводородных 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 $wR^2 = \{\Sigma[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\Sigma[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0,0796$ 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	C ₂₃ H ₃₀ Cl ₃ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Молекулярная масса	648,82				
Кристаллическая система	Моноклинная				
Пространственная группа	P2 ₁	<i>a</i>	12,9257(4)Å	α	90°
		<i>b</i>	6,18080(10)Å	β	96,399(2)°
		<i>c</i>	18,0134(4)Å	γ	90°
V	1430,15(6)Å ³				
Z	2				
D_c	1,507 г.см ⁻³				
μ	3,977 мм ⁻¹				
Источник, λ	Cu K α , 1,54178Å				
$F(000)$	672				
<i>T</i>	100(1)K				
Кристалл	Бесцветная игла, 0,22 x 0,03 x 0,02 мм				
Данные усечены до	0,80 Å				
$\theta_{\text{макс}}$	74,41°				
Полнота	69,1%				
Отражения	3062				
Уникальные отражения	2607				
$R_{\text{внутр}}$	0,0198				

Пример 23. Стабильность при повышенных температурах и относительная влажность.

Пробу Rp-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 дифрактограмма, полученная для Rp-4, не показывала существенных изменений 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 пропустили 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 вре-

мени. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 11. Стабильность 4 к повышенной относительной влажности

Условия	t = 1,5 часа	t = 4,5 часа	t = 6,5 часа	t = 8,5 часа	t = 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 Sp-4 разжижалась изнутри в течение 16 ч. Например, пробу Sp-4 измельчали при помощи ступки и пестика и затем последовательно пропускали через 500 и 250 мкм сита с получением пробыв в 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 Sp-4 к повышенной относительной влажности

Условия	t = 1,5 часа	t = 4,5 часа	t = 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 ч показал отсутствие значительных изменений в полученных дифрактограммах, что указывало на отсутствие изменение 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 программного обеспечения Spectrum v. 5.0.1.

ИК спектры получали для 4, Rp-4 и Sp-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); Rp-4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (фиг. 15); и Sp-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 теплоемкости 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 $\pm 0,2^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ и 40 с. Над пробой поддерживали поток сухого азота при скорости 50 мл·мин⁻¹.

Программным обеспечением для контроля прибора было Advantage для Q Series v. 2.8.0.392 и Thermal Advantage v. 4.8.3 и данные анализировали при помощи Universal Analysis v. 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°C до 250°C. Над пробой поддерживали поток сухого азота при скорости 50 мл·мин⁻¹. Программным обеспечением для контроля прибора и анализа данных было STARe v. 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. Программным обеспечением для контроля прибора и анализа данных было STARe v. 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 рентгеновской 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 программного 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 $\pm 0,005$ 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 (°C 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 негигроскопичным, 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 ≥ 10 мг·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 стекловолна C на планшету на 96 ячеек. Фильтрат затем разбавляли на множитель 101, количественное определение проводили при помощи ВЭЖХ, где репером 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 интегриро-

вания 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 волны, 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 HP1100, оснащенной диодно-матричным детектором и при помощи программного обеспечения ChemStation в. В.02.01-SR1.

Таблица 15. Результат растворимости в воде для R_p-4, 4 и S_p-4

Идентификационный номер пробы	рН неотфильтрованной смеси	Растворимость / мг.мл ⁻¹	Комментарии
R _p -4	7,12	1,58	Суспензия
4	7,03	6,11	Остаточное твердое вещество
S _p -4	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 LunC18(2); 4,6 x 50 мм; 3мкм		
Скорость потока:	1,2 мл/мин		
Объем впрыскивания:	10 мкл		
Подвижная фаза:	Растворитель А: 95% вода с 5% метанола и 10м М ацетата аммония; рН~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	
	102		
	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 составляющую ~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 диастереоизомера 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 (S_p-изомер).

Соединение 8 (S_p-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-монохроматизированного Mo-K_α излучения (λ=0,71073 Å) при температуре 100(1)K. Фиг. 20А и 20В показывают молекулы, пронумерованные 1 и 2, соответственно, асимметричного 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 F^2 и $\sigma(F^2)$ значений, которые затем пропускали в SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. 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 $1,58 \leq \theta \leq 25,09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$ с получением 6909 уникальных отражений ($R_{\text{внутр}} = 0,0581$). 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 F^2 с использованием SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) ActCryst. A64, 112-122). Во время оптимизации использовали все отражения. Использовали схему весовых коэффициентов

$$w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0000P)^2 + 14,0738P],$$

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 $F > 4\sigma(F)$ 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 Δ/σ 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 $e/\text{\AA}^3$.

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

Эмпирическая формула	$C_{18}H_{21}N_2PO_7$
Молекулярная масса	408,34
Температура	100(1) K
Длина волны	0,71073 \AA
Кристаллическая система	моноклинная
Пространственная группа	$P2_1$
Константы ячеек:	
a	5,3312(4) \AA
b	15,3388(8) \AA
c	23,7807(13) \AA
β	92,891(3) $^\circ$
Объем	1942,2(2) \AA^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 2θ для сбора данных	1,58 - 25,09 $^\circ$
Диапазоны индексов	$-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$
Собранные отражения	6909
Независимые отражения	6909 [$R_{\text{внутр}} = 0,0581$]
Полнота по $2\theta = 25,09^\circ$	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 [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0847$, $wR2 = 0,1899$
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 $e/\text{\AA}^3$

Пример 31. Биологическая активность.

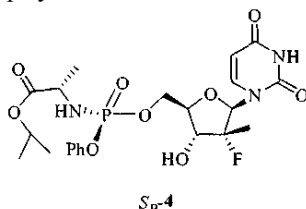
Клетки, содержащие репликоны, высевали на 3,000 клеток/ячейка (50 мкл) в белые/непрозрачные планшеты на 96 ячеек или 1,500 клеток/ячейка (25 мкл) в белые/непрозрачные планшеты на 384 ячеек. 50 мкл 2х соединения добавляли в планшеты на 96 ячеек или 25 мкл 2х соединения добавляли в планшеты на 384 ячеек. 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 ингибирования рассчитывали на фоне лекарственного контроля.

Соединение	активность репликонов вируса гепатита С (мкМ)
4	0,58
<i>R_p</i> - 4	2,87
<i>S_p</i> - 4	0,13

R_p-4 и *S_p*-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 №12/053015 и предварительных патентных заявок США №61/179923, поданной 20 мая 2009 г. и 61/319513, 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. Соединение, представленное формулой *S_p*-4

причем указанное соединение является кристаллическим и обладает 2θ-отражениями ($\pm 0,2^\circ$) порошковой рентгеновской дифракции при 5,0, 7,3, 9.4 и 18,1.

2. Соединение по п.1, где указанное соединение является кристаллическим и обладает дифрактограммой порошковой рентгеновской дифракции, по существу, как представлено на фиг. 4.

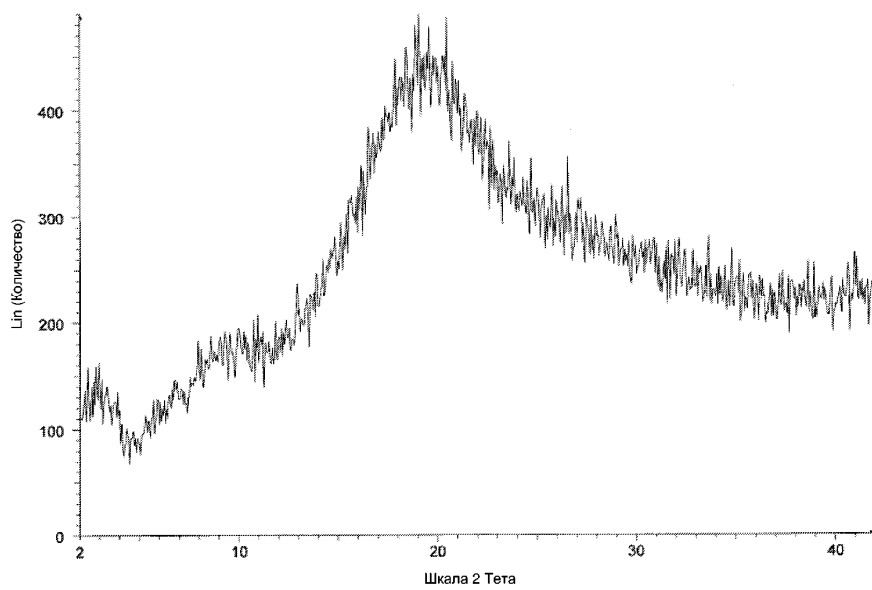
3. Фармацевтическая композиция для лечения вирусной инфекции гепатита С, содержащая соединение по п.1 или 2 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

4. Применение терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или 2 для лечения вирусной инфекции гепатита С.

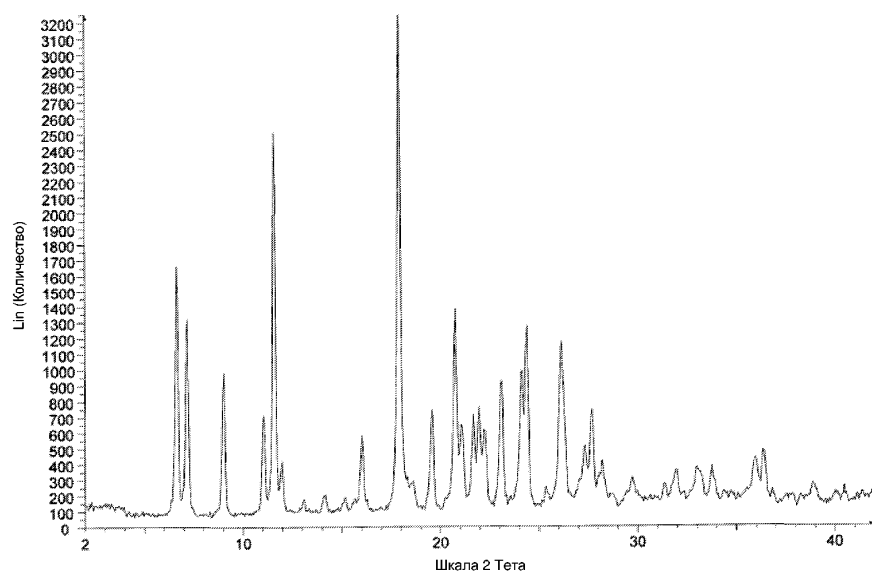
5. Применение терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для лечения вирусной инфекции гепатита С.

6. Способ лечения вирусной инфекции гепатита С у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или 2.

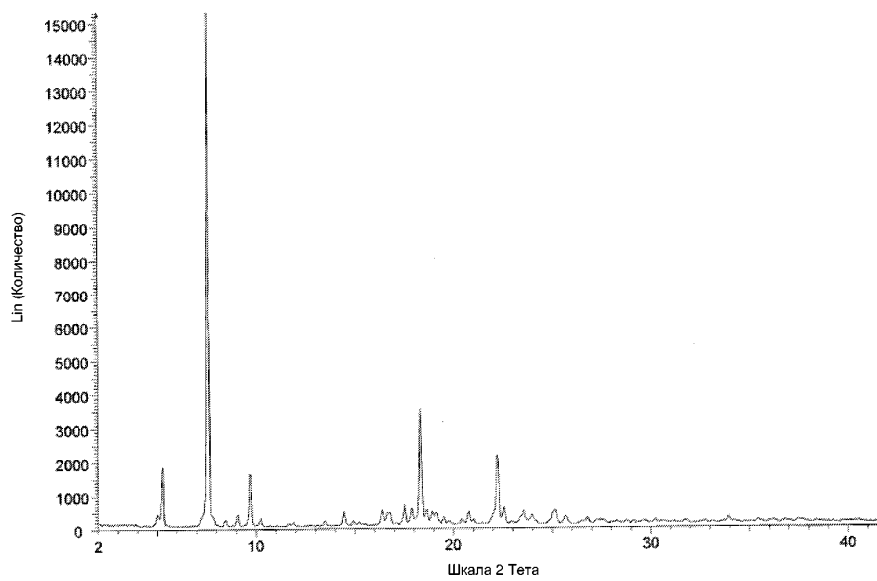
026731



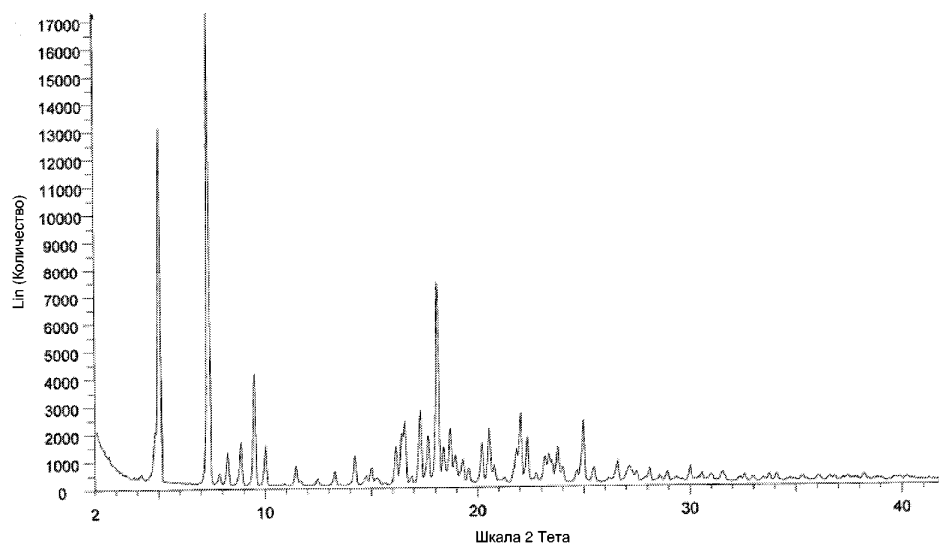
Фиг. 1



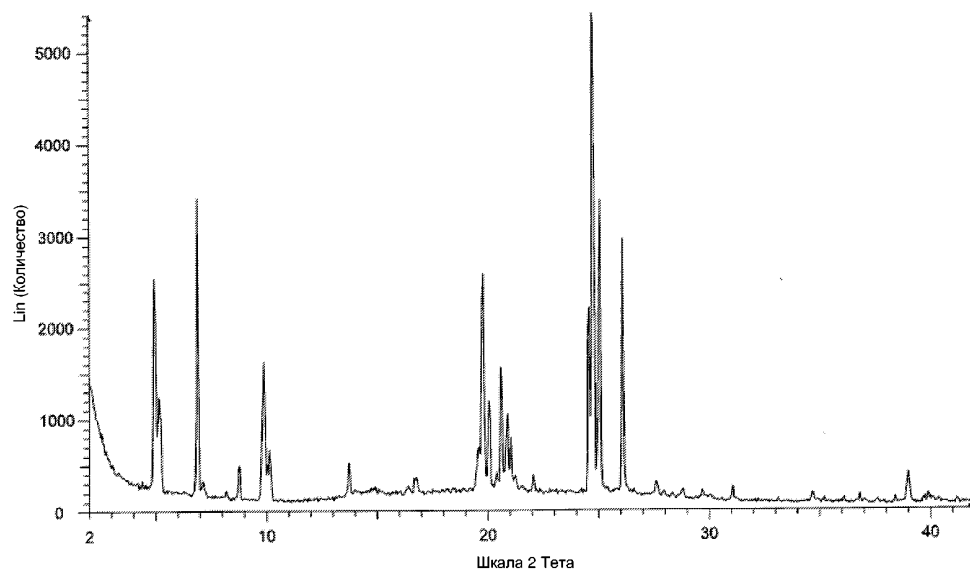
Фиг. 2



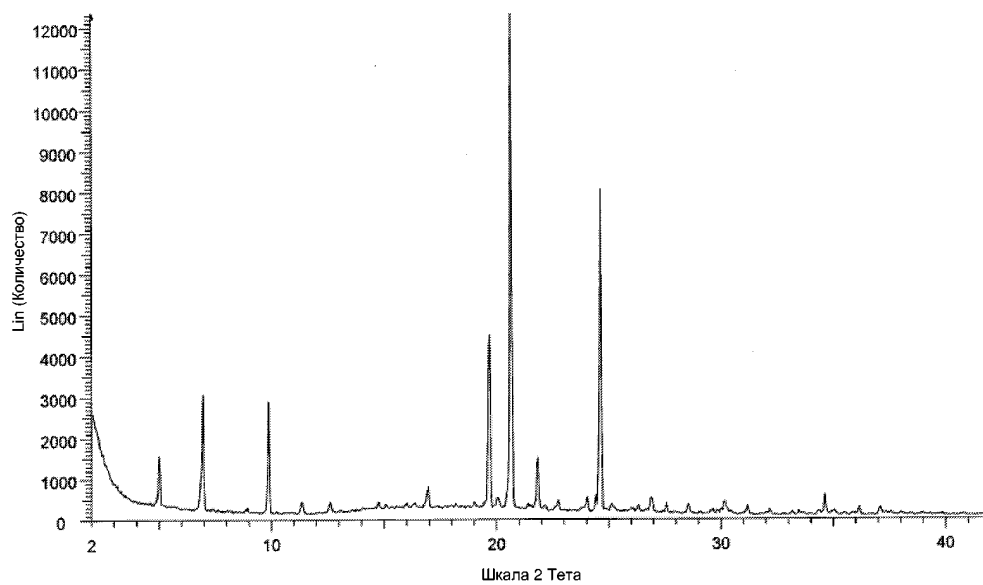
Фиг. 3



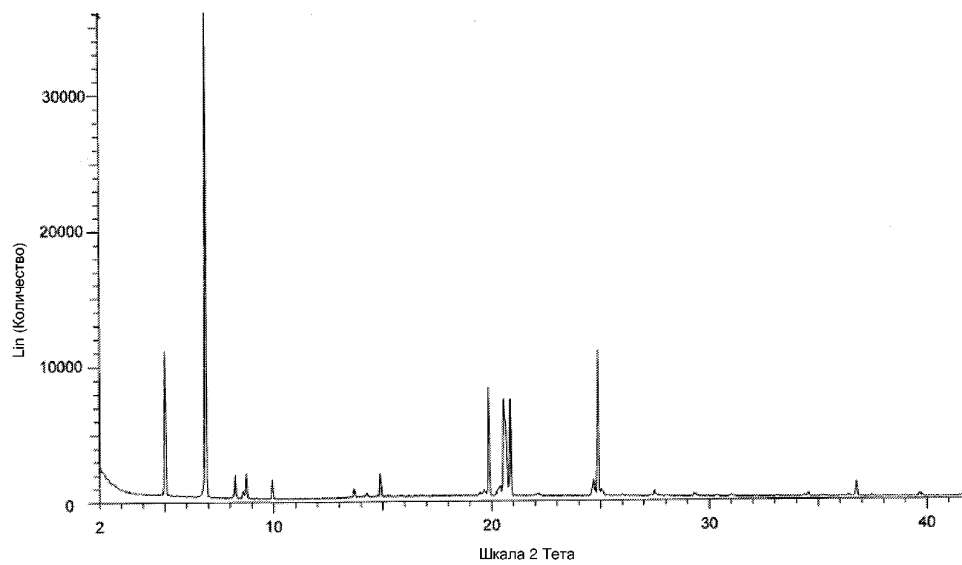
Фиг. 4



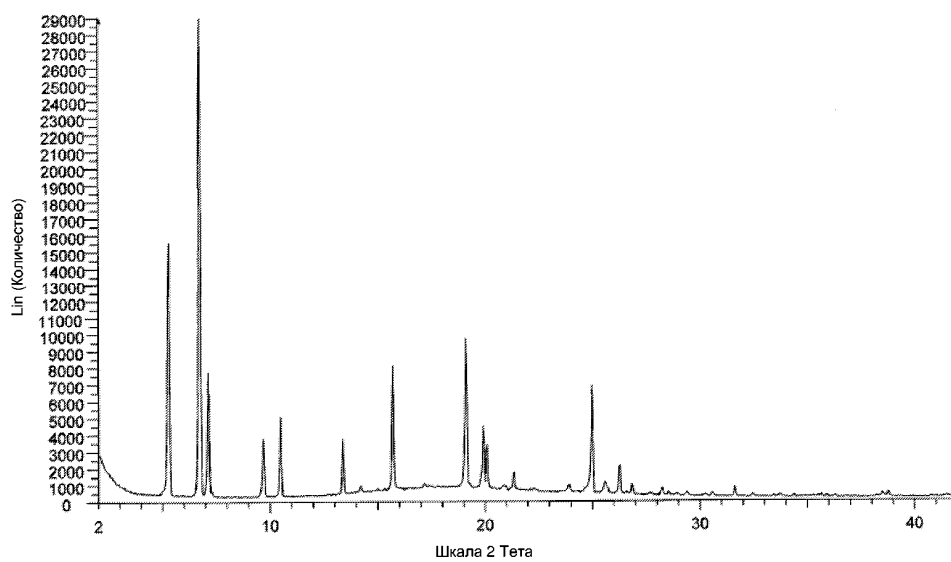
Фиг. 5



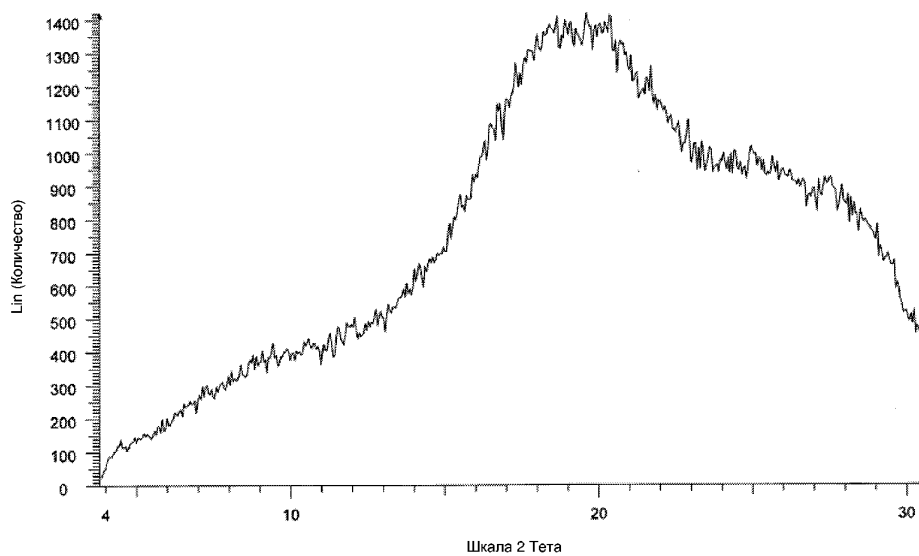
Фиг. 6



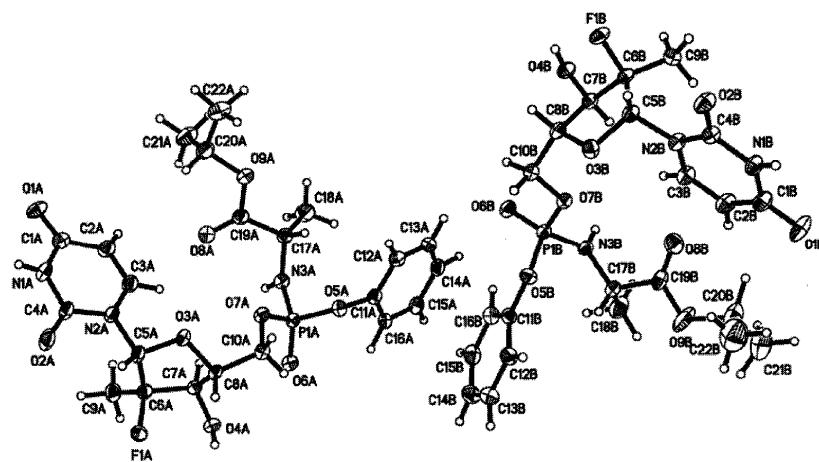
Фиг. 7



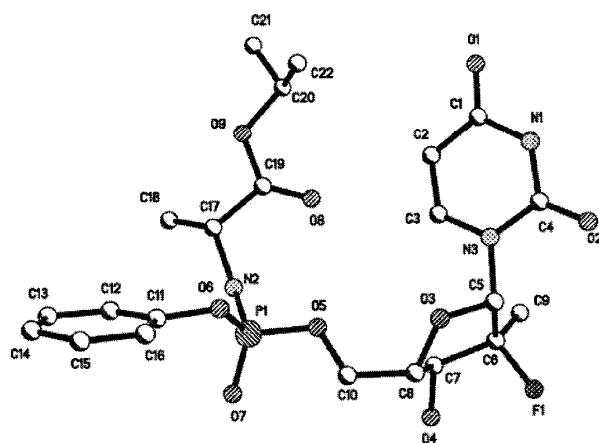
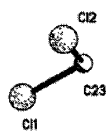
Фиг. 8



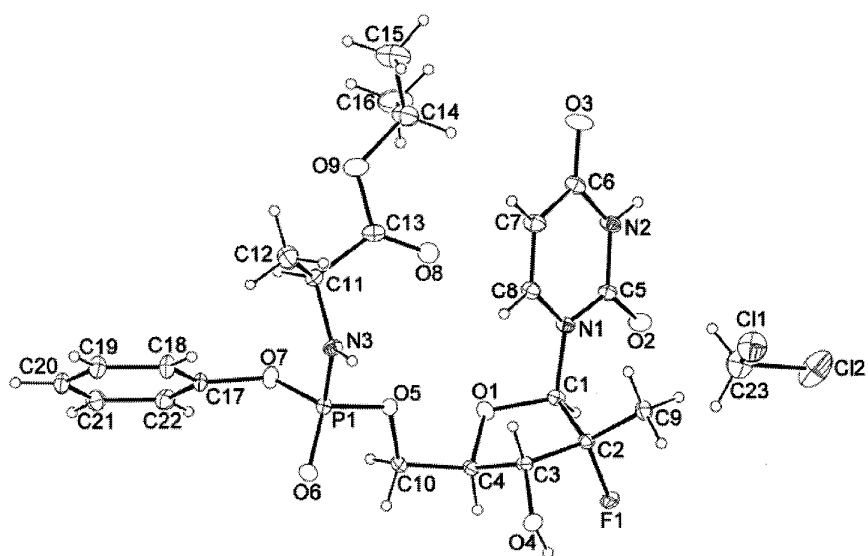
Фиг. 9



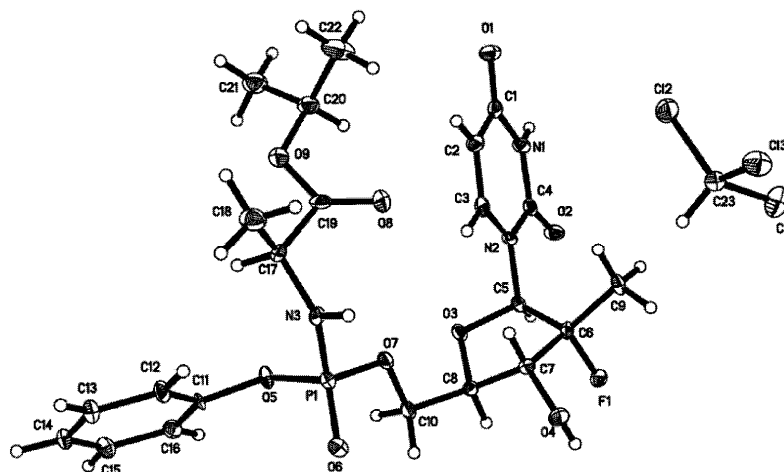
Фиг. 10



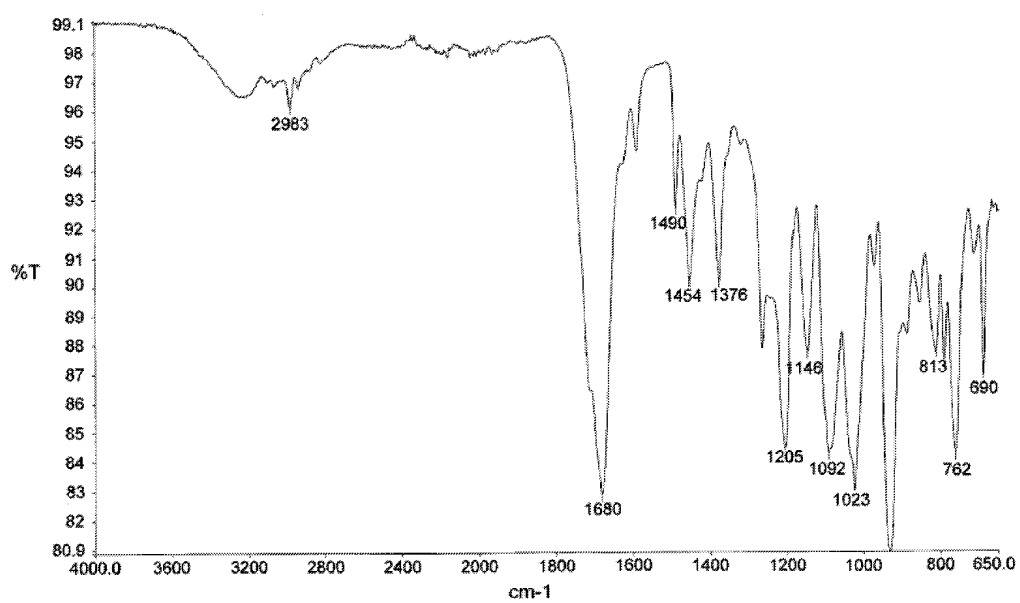
Фиг. 11



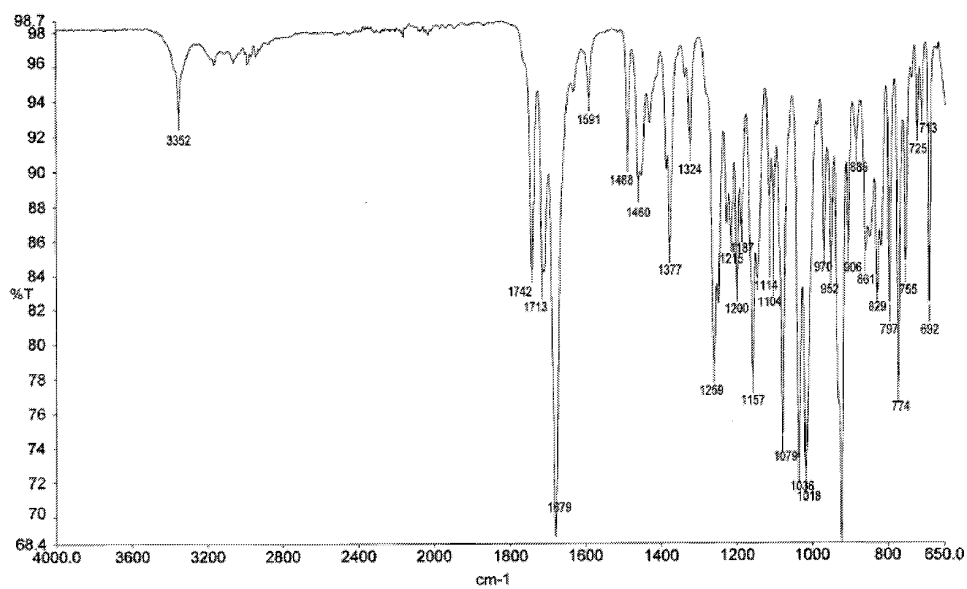
Фиг. 12



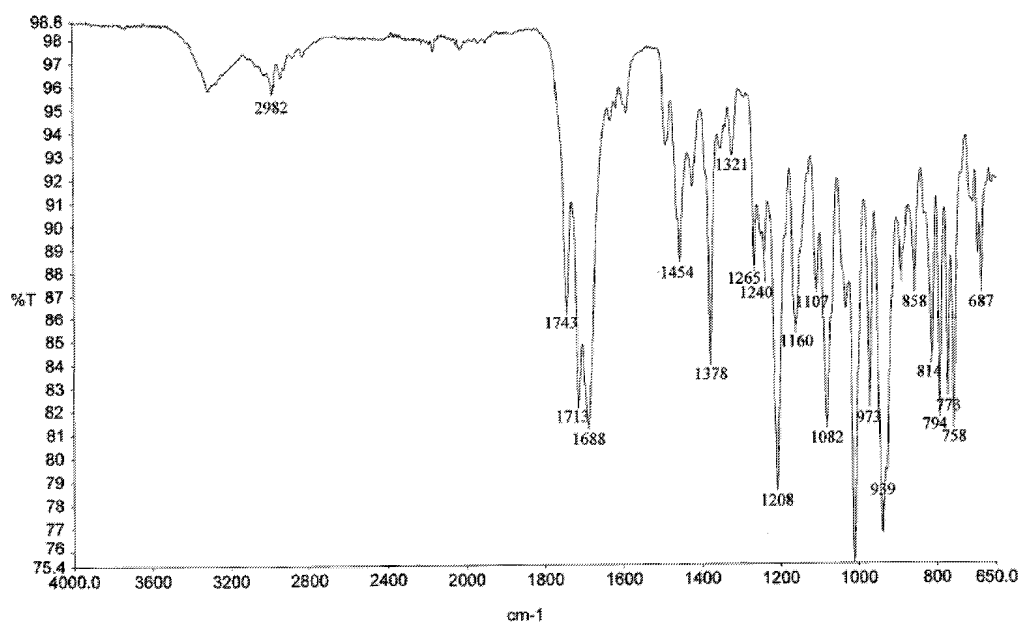
Фиг. 13



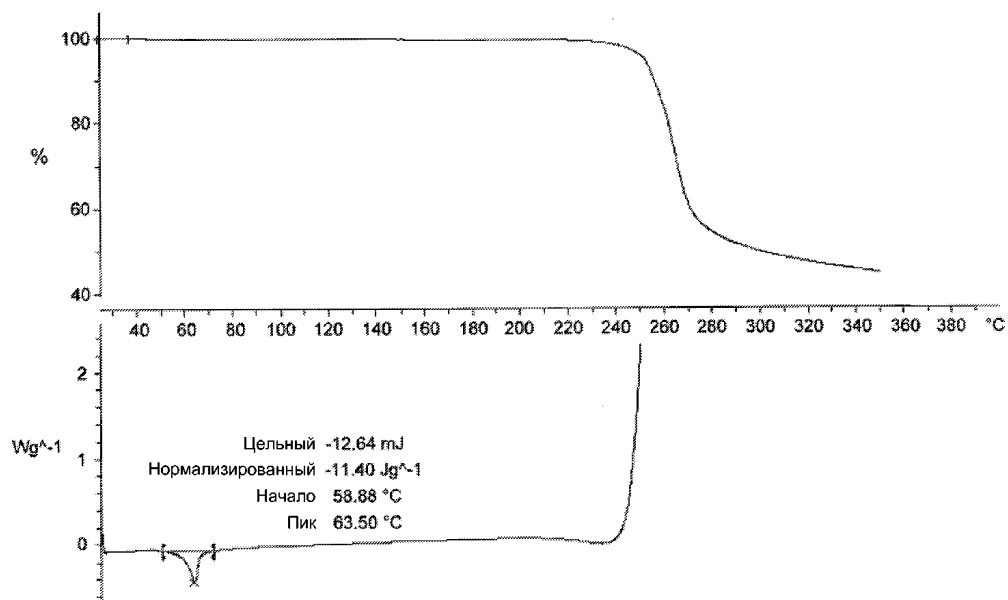
Фиг. 14



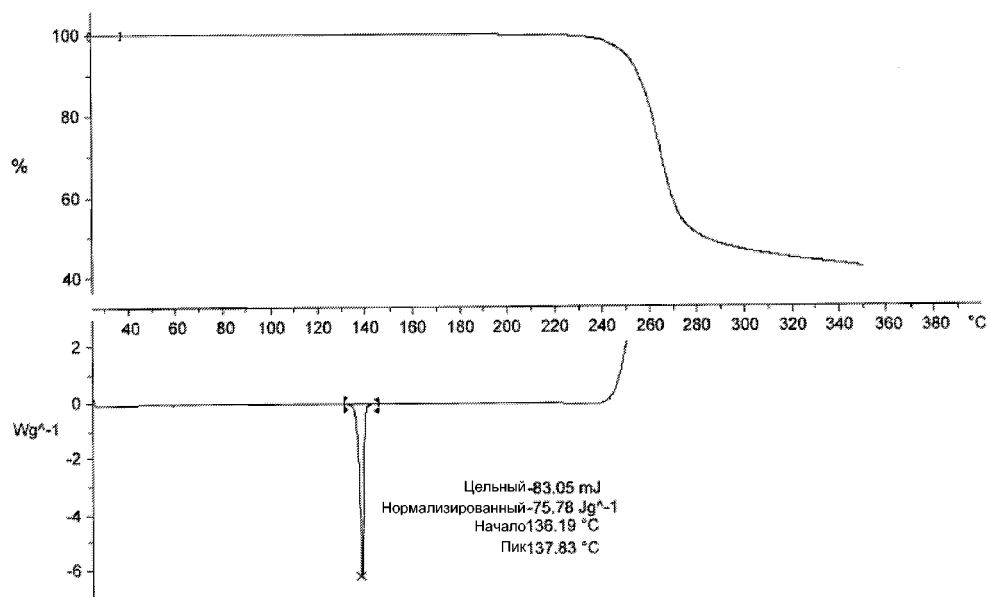
Фиг. 15



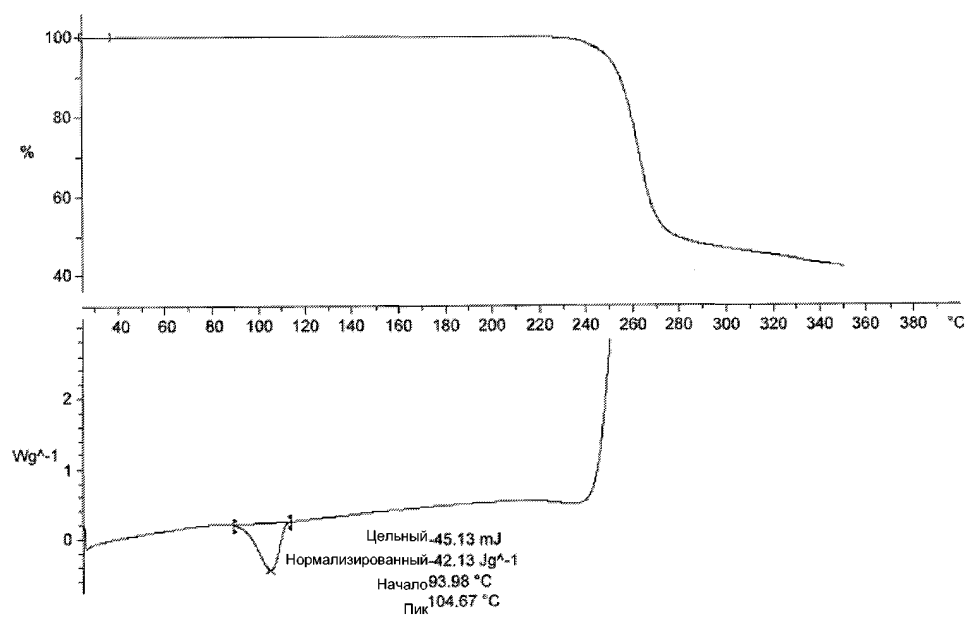
Фиг. 16



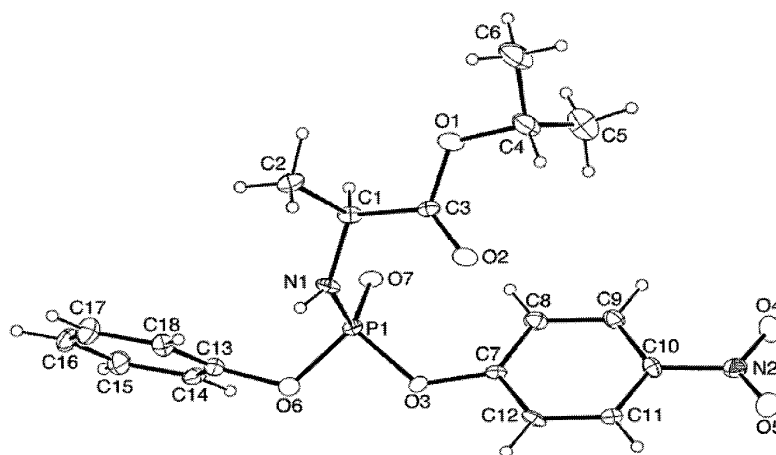
Фиг. 17



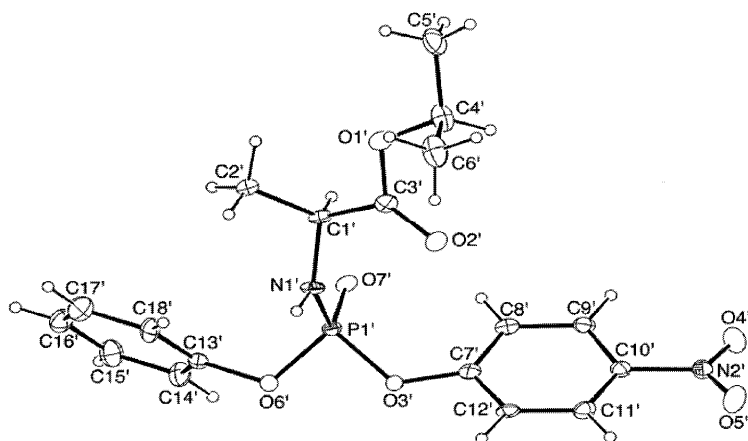
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20A



Фиг. 20В

