



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I576352 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：099115937

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 05 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07H19/073 (2006.01)

C07H19/10 (2006.01)

A61K31/7072 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

(30)優先權：2009/05/20 美國

61/179,923

2010/03/31 美國

61/319,513

(71)申請人：基利法瑪席特有限責任公司(美國) GILEAD PHARMASSET LLC (US)

美國

(72)發明人：羅斯 布魯斯 S ROSS, BRUCE S. (US)；索菲亞 麥克 J SOFIA, MICHAEL JOSEPH (US)；帕穆拉佩堤 加那佩堤 R PAMULAPATI, GANAPATI REDDY (IN)；拉查肯達 蘇古納 RACHAKONDA, SUGUNA (IN)；張海仁 ZHANG, HAI-REN (US)；千炳權 CHUN, BYOUNG-KWON (KR)；王培源 WANG, PEIYUAN (CN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 200904453A

審查人員：俞樹生

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：20 共 141 頁

(54)名稱

核苷磷醯胺

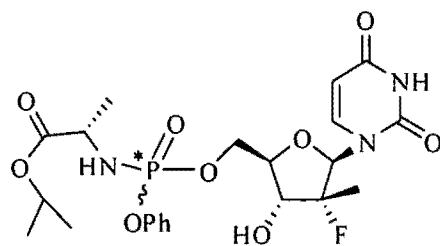
NUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDATES

(57)摘要

本文所揭露的為核苷胺基磷酸酯以及它們作為治療病毒疾病之用途。這些組成物為 RNA-依賴性 5 RNA 病毒複製的抑制劑，並且作為 HCV NS5B 聚合酶抑制劑、作為 HCV 複製之抑制劑與針對治療哺乳類動物之 C 型肝炎感染為有效的。

Disclosed herein are nucleoside phosphoramidates and their use as agents for treating viral diseases. These compounds are inhibitors of RNA-dependent 5 RNA viral replication and are useful as inhibitors of HCV NS5B polymerase, as inhibitors of HCV replication and for treatment of hepatitis C infection in mammals.

特徵化學式：



發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99115937

※ 申請日：99.5.19

※ IPC 分類：

C07H 19/073 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

核苷磷醯胺

NUCLEOSIDE PHOSPHORAMIDATES

二、中文發明摘要：

本文所揭露的為核苷胺基磷酸酯以及它們作為治療病毒疾病之用途。這些組成物為RNA-依賴性5' RNA病毒複製的抑制劑，並且作為HCV NS5B聚合酶抑制劑、作為HCV複製之抑制劑與針對治療哺乳類動物之C型肝炎感染為有效的。

三、英文發明摘要：

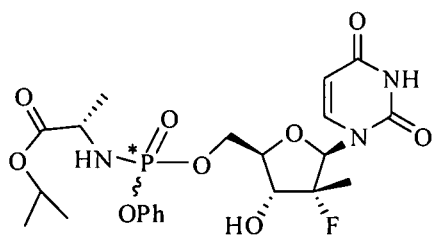
Disclosed herein are nucleoside phosphoramidates and their use as agents for treating viral diseases. These compounds are inhibitors of RNA-dependent 5' RNA viral replication and are useful as inhibitors of HCV NS5B polymerase, as inhibitors of HCV replication and for treatment of hepatitis C infection in mammals.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



4

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本申請案主張於2009年5月20日申請之美國臨時專利申請案第61/179,923號，以及於2010年3月31日申請之美國臨時專利申請案第61/319,513號的優先權，其全部內容被併入以作為參考。

本文所揭露者為核苷胺基磷酸酯以及它們作為治療病毒疾病之劑的用途。這些化合物為RNA-依賴性RNA病毒複製之抑制劑，並有效於作為HCV NS5B聚合酶之抑制劑、作為HCV複製之抑制劑，並且用以治療哺乳類動物中的C型肝炎感染。

【先前技術】

發明背景

C型肝炎病毒(HCV)感染是一個重大的健康問題，其在估計為2-15%的世界人口之大量受感染的個體中，導致例如肝硬化以及肝細胞癌的慢性肝病。根據美國疾病管制中心，單單在美國估計就有450萬受感染的人。根據世界衛生組織，世界上有超過2億受感染的個體，每年至少3至4百萬人受到感染。一旦被感染，大約20%的人會清除該病毒，但其餘的人在他們的餘生中可存有HCV。百分之十至二十的慢性感染個體最後會發展出破壞肝臟的肝硬化或癌症。該病毒疾病是由受到汙染的血液與血液產品而由腸胃道外傳染、受汙染的針頭、或性行為傳染以及由被感染的母親

或帶原者母親垂直傳染至她們的後代。目前對於HCV感染的治療僅限於單獨以重組干擾素 α 或結合核苷類似物利巴韋林(ribavirin)的免疫療法，該治療具有有限的臨床益處。此外，針對HCV沒有已經建立的疫苗。因此，對於有效地對抗慢性HCV感染之改良治療劑有急迫的需要。

HCV病毒粒子為一套膜之正股RNA病毒，具有約9600個鹼基的單股寡核糖核苷酸基因序列，該核苷酸序列編碼約3,010個胺基酸的多蛋白。HCV基因的蛋白質產物由結構蛋白質C、E1與E2以及非結構蛋白質NS2、NS3、NS4A與NS4B以及NS5A和NS5B所構成。非結構(NS)蛋白質被相信為提供用於病毒複製的催化機構。NS3蛋白酶釋放NS5B，其係來自該多蛋白鏈的RNA依賴性RNA聚合酶。HCV NS5B聚合酶對於從單股病毒RNA合成雙股RNA為必需的，該單股病毒RNA係做為HCV複製週期中的模板。因此，NS5B聚合酶被視為在HCV複製複合物中的必需成分(K. Ishi, et al, *Heptology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118)。HCV NS5B聚合酶的抑制防止了雙股HCV RNA的形成，因而對於HCV特異性抗病毒療法的發展構成了一個具吸引力之途徑。

HCV屬於一具有許多共同特徵的較大病毒科。

黃熱病毒科病毒(*Flaviviridae Viruses*)

黃熱病毒科病毒包括至少三個不同的屬：瘟疫病毒屬(*pestiviruses*)，其導致牛與豬的疾病；黃熱病毒屬(*flaviviruses*)，其為例如登革熱與黃熱病的主要致病因子；

以及肝炎病毒屬(*hepaciviruses*)，其主要成員是HCV。黃熱病毒屬包括多於68個成員，所述成員基於血清學的關聯而分為多組(Calisher et al., *J. Gen. Virol*, 1993, 70, 37-43)。臨床症狀不同，且包括發燒、腦炎以及出血熱(*Fields Virology*, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959)。與人類疾病有關之全球關注的黃熱病毒屬包括登革出血熱病毒(DHF)、黃熱病病毒、休克症候群以及日本腦炎病毒(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)。

瘟疫病毒屬包括牛病毒性下痢病毒(BVDV)、典型豬瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV，亦稱豬霍亂病毒)以及羊的邊界病病毒(border disease virus, BDV)(Moennig, V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98)。馴養家畜(牛、豬以及羊)的瘟疫病毒感染導致全世界的巨大經濟損失。BVDV導致牛的黏膜疾病，並且對於家畜產業具有顯著的經濟重要性(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)。人類瘟疫病毒不如動物瘟疫病毒具有廣泛的特徵。然而，血清學的調查指出有相當多的瘟疫病毒曝露於人類中。

在黃熱病毒科中，瘟疫病毒以及肝炎病毒為關係相近的病毒群組。在此科中其他關係相近的病毒包括GB病毒A、GB病毒A類似劑、GB病毒-B以及GB病毒-C(也稱為G型

肝炎病毒，HGV)。肝炎病毒群組(C型肝炎病毒；HCV)由一些關係相近但基因型上可區別的、感染人類的病毒所構成。有至少6種HCV基因型以及多於50種子型。由於瘟疫病毒以及肝炎病毒之間的相似性，加上肝炎病毒在細胞培養中有效生長的能力不佳，牛病毒性下痢病毒(BVDV)經常被用以做為研究HCV病毒的代用品。

瘟疫病毒以及肝炎病毒的基因結構非常相似。這些正股RNA病毒具有單一的大的開放讀框(open reading frame, ORF)，該開放讀框編碼所有病毒複製所需的病毒蛋白質。這些蛋白質以一種多蛋白表現，該多蛋白係由細胞以及病毒兩者編碼的蛋白酶進行共轉譯與後轉譯處理，以產出成熟的病毒蛋白質。負責病毒基因體RNA之複製的病毒蛋白質約位於羧端內。該ORF的三分之二稱為非結構(NS)蛋白質。瘟疫病毒以及肝炎病毒的ORF之非結構蛋白質部分的基因結構以及多蛋白處理非常相似。對於瘟疫病毒以及肝炎病毒兩者來說，成熟的非結構(NS)蛋白質，從非結構蛋白質編碼區的胺端到該ORF的羧端之序列順序，係由p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A以及NS5B所組成。

瘟疫病毒以及肝炎病毒的NS蛋白質共同具有特異蛋白質功能特徵的序列區域。例如，在兩者群組中病毒的NS3蛋白質都具有絲胺酸蛋白酶以及解旋酶的胺基酸序列模組(motif)特徵(Gorbalenya et al., *Nature*, 1988, 333, 22；Bazan 以及 Fletterick *Virology*, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya et al., *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3889-3897)。同樣地，瘟疫

病毒以及肝炎病毒的NS5B蛋白質具有RNA導引之RNA聚合酶的模組特徵(Koonin, E.V. and Dolja, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430)。

瘟疫病毒以及肝炎病毒的NS蛋白質在病毒生命週期中的實際角色與功能是直接類似的。在兩者例子中，該NS3絲胺酸蛋白酶負責在該ORF中其位置下游之多蛋白前驅物的所有蛋白質水解處理(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)。在兩者例子中，NS4A蛋白質作為一個對應NS3絲胺酸蛋白酶的輔助因子(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)。兩種病毒的NS3蛋白質也皆作用為解旋酶(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)。最後，瘟疫病毒以及肝炎病毒的NS5B蛋白質具有預測的RNA導引RNA聚合酶活性(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)。

目前，針對感染C型肝炎病毒的個體有受限制的治療選擇。目前改進的醫療選擇為單獨使用重組干擾素 α 或使用結合核苷類似物利巴韋林一起使用的免疫療法。此療法受限於其臨床效力，並且只有50%受治療的病患對療法有反應。因此，對於更有效且嶄新的治療法有顯著的需要，以解決由HCV感染所造成之未被滿足的醫藥需求。

現在已確認了一些做為抗HCV療法的直接作用之抗病毒藥物發展的潛在分子標靶，其包括但不限於NS2-NS3自體蛋白酶(autoprotease)、N3蛋白酶、N3解旋酶以及NS5B聚合酶。RNA依賴性RNA聚合酶對於單股正向的RNA 基因體複製是絕對必需的，並且此酵素在藥物化學家間已引起了顯著的關注。

作為HCV感染之潛在療法的HCV NS5B抑制劑已被重新探討：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。出現抗藥性HCV病毒株的潛在可能以及以寬廣基因型涵蓋範圍來鑑定試劑的需求，支持了持續致力於鑑定出嶄新與更有效的核苷作為HCV NS5B抑制劑的需要。

NS5B聚合酶的核苷抑制劑可作用為一非天然的受質或作為一競爭性抑制劑之任一者，非天然的受質係導致連鎖終止，競爭抑制劑係與結合至該聚合酶的核苷酸競爭。為了作為一連鎖終止物而作用，該核苷類似物必須由細胞攝入並在活體中轉變成三磷酸鹽，以競爭該聚合酶核苷酸的結合處。此轉為三磷酸鹽之轉變一般係由細胞激酶為媒介，該細胞激酶在潛在的核苷聚合酶抑制劑上給予額外的結構需求。不幸地，這限制了核苷作為HCV複製之抑制劑對於可在原位磷酸化之以細胞為基礎之試驗的直接評估。

在一些例子中，核苷的生物活性受到其不佳的受質特徵而被牽制，該特徵為需要一或更多的激酶以將其轉變成活化的三磷酸鹽形式。藉由一核苷激酶形成單磷酸鹽通常被視為三個磷酸化事件的速率限制步驟。為了規避在初始磷酸化步驟中核苷代謝成該活化三磷酸鹽類似物的需要，穩定的磷酸鹽前驅藥物的製備已被發表。核苷胺基磷酸酯前驅藥已顯示為活化三磷酸核苷的前驅物，且當給藥至受病毒感染的整個細胞時抑制病毒的複製(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.,

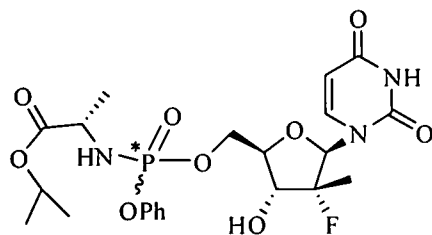
et al., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, 20, 1091-1098 ; Lee, W.A., et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49, 1898) ; US 2006/0241064以及WO 2007/095269。

有時核苷的不佳物理化學以及藥物動力學性質，也限制了它們作為可實行醫療劑的利用。這些不佳的性質可能限制藥劑的腸內吸收，並限制攝入至該標的組織或細胞。為了改善它們的性質，已使用核苷的前驅藥物。已證實核苷胺基磷酸酯的製備改善了核苷的系統吸收，並且這些「核苷酸前驅物」的胺基磷酸酯基元更以中性親油基遮蔽，以獲得一合適的分配係數，相較於單獨給藥該母核苷，該分配係數優化攝入以及運輸進入細胞，大大地提高該核苷單磷酸鹽類似物在細胞內的濃度。該磷酸酯基元的酵素媒介水解作用產生一單磷酸核苷，其中速率限制的初始磷酸化作用為非必要的。為此，美國專利申請案12/053,015，相當於WO 2008/121634以及US 2010/0016251，揭露了一些胺基磷酸酯核苷前驅藥物，其中有許多展示其在HCV分析法中的活性。為獲得FDA許可，數個揭露於US 2010/0016251的化合物已被測試作為一潛在臨床候選者。

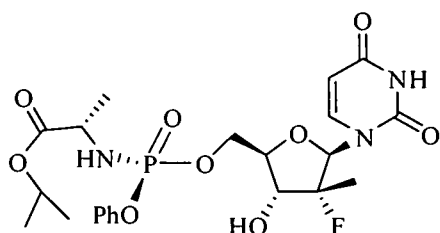
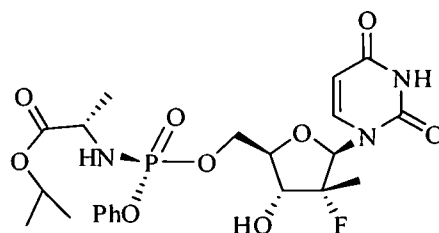
【發明內容】

發明概要

本文所揭露的為由結構式4所表示的一種化合物，以及其分別由結構式 S_p-4 以及 R_p-4 所表示的磷基非鏡像異構物。



4

*S_P-4**R_P-4*

圖式簡單說明

第1圖4的高解析度XRD繞射圖。

第2圖*R_P-4*的高解析度XRD繞射圖。

第3圖*S_P-4*(形式1)的高解析度XRD繞射圖。

第4圖*S_P-4*(形式1)的高解析度XRD繞射圖。

第5圖*S_P-4*·CH₂Cl₂(形式2)的高解析度XRD繞射圖。

第6圖*S_P-4*·CHCl₃(形式3)的高解析度XRD繞射圖。

第7圖*S_P-4*(形式4)的高解析度XRD繞射圖。

第8圖*S_P-4*(形式5)的高解析度XRD繞射圖。

第9圖*S_P-4*(非晶質)的高解析度XRD繞射圖。

第10圖針對*S_P-4*的X-射線晶體結構(形式1)。

第11圖針對*S_P-4*·CH₂Cl₂的X-射線晶體結構(等向性)
(形式2)。

第12圖針對*S_P-4*·CH₂Cl₂的X-射線晶體結構(異向性)
(形式2)。

第13圖針對 S_P -4·CHCl₃的X-射線晶體結構(形式3)。

第14圖4的FT-IR光譜。

第15圖 R_P -4的FT-IR光譜。

第16圖 S_P -4的FT-IR光譜。

第17圖4的TGA與DSC分析。

第18圖 R_P -4的TGA與DSC分析。

第19圖 S_P -4的TGA與DSC分析。

第20A圖針對8(S_P -異構物)的X-射線晶體結構(非對稱單位之1號分子)。

第20B圖針對8(S_P -異構物)的X-射線晶體結構(非對稱單位之2號分子)。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

定義

如本文所使用的，用語「一(a)」或「一(an)」實體意指一或更多的那個實體；例如，一化合物意指一或更多的化合物或至少一化合物。就其本身而論，用語「一(a或an)」、「一或更多的」以及「至少一」在本文中可交替使用。

如本文所使用的，用語「隨選的(optional)」或「隨選地(optionally)」意指一連續描述的事件或情況可以但並非必要發生，並且該描述包括其中該事件或情況發生的範例以及不發生的範例。舉例來說，「隨選的鍵結」意指該鍵結可以存在或可以不存在，並且該描述包括單、雙或三鍵。

用語「P*」意指磷原子是對掌性的，且其具有相應之

「R」或「S」的坎-殷高-普利洛(Cahn-Ingold-Prelog)名稱，其具有它們被接受的清楚意義。

如本文中所描述，用語「純化的」意指一給定化合物的純度。例如，當該給定的化合物為組成物的一主要成分時，該化合物為「純化的」，即，至少50% w/w純度。因此，「純化的」包括至少50% w/w的純度、至少60% w/w的純度、至少70%的純度、至少80%的純度、至少85%的純度、至少90%的純度、至少92%的純度、至少94%的純度、至少96%的純度、至少97%的純度、至少98%的純度、至少99%的純度、至少99.5%的純度以及至少99.9%的純度，其中「實質上純的」包括至少97%的純度、至少98%的純度、至少99%的純度、至少99.5%的純度以及至少99.9%的純度。

如本文中所描述的，用語「代謝物」意指在給藥至一需要它的個體後，於活體內產生的一化合物。

該用語「約」(也表示為 $\sim$)意指所敘述的數值為一範圍的一部分，該範圍在標準實驗誤差範圍內變化。

該表述「實質上如在...所顯示的」一特定XRPD圖樣意指在該XRPD圖中所顯示的波峰位置在視覺的檢查或憑藉所選擇的波峰列舉($\pm 0.2^\circ 2\theta$)內實質上為相同的。具有一般技藝之人員了解該強度可依樣本而變化。

該用語「實質上無水的」意指一物質包含至多10%重量的水，較佳地為至多1%重量的水，更佳地為至多0.5%重量的水，以及最佳地為至多0.1%重量的水。

溶劑或反溶劑(如在反應中所使用的、結晶等或晶格以

及/或吸附的溶劑)包括C₁至C₈的醇類、C₂至C₈的醚類、C₃至C₇的酮類、C₃至C₇的酯類、C₁至C₂的氯碳化合物、C₂至C₇的腈類、一混合溶劑、C₅至C₁₂的飽和碳氫化合物、C₆至C₁₂的芳香族碳氫化合物的至少其中之一。

該C₁至C₈的醇類意指直鏈/分枝的及/或環狀/非環狀的、具有這樣的數量之碳原子的醇類。該C₁至C₈的醇類包括但不限於，甲醇、乙醇、正丙醇、異丙醇、異丁醇、己醇以及環己醇。

該C₂至C₈的醚類意指直鏈/分枝的及/或環狀/非環狀的、具有這樣的數量之碳原子的醚類。該C₂至C₈的醚類包括但不限於，二甲醚、二乙醚、二-異丙醚、二-正丁醚、甲基叔丁基醚(MTBE)、四氫呋喃以及二氧雜環己烷。

該C₃至C₇的酮類意指直鏈/分枝的及/或環狀/非環狀的、具有這樣的數量之碳原子的酮類。該C₃至C₇的酮類包括但不限於，二甲基酮、甲基乙基酮、丙酮(propanone)、丁酮(butanone)、甲基異丁基酮、甲基丁基酮以及環己酮。

該C₃至C₇的酯類意指直鏈/分枝的及/或環狀/非環狀的、具有這樣的數量之碳原子的酯類。該C₃至C₇的酯類包括但不限於乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸正丁酯等等。

該C₁至C₂的氯碳化合物意指具有這樣的數量之碳原子的氯碳化合物。該C₁至C₂的氯碳化合物包括但不限於，氯仿、二氯甲烷(DCM)、四氯化碳、1,2-二氯乙烷以及四氯乙烷。

一C₂至C₇的腈類意指具有這樣的數量之碳原子的腈類。該C₂至C₇的腈類包括但不限於乙腈、丙腈等等。

各式各樣的溶劑意指普遍地應用於有機化學之溶劑，其包括但不限於，二甘醇、二甘二甲醚(diethylene glycol dimethyl ether)、1,2-二甲氧基乙烷、二甲基甲醯胺、二甲基亞楓、乙二醇、甘油、六甲基磷醯胺、六甲基磷triamine、N-甲基-2-吡咯烷酮、硝基甲烷、吡啶、三乙胺以及醋酸。

該用語C₅至C₁₂的飽和碳氫化合物意指直鏈/分枝的及/或環狀/非環狀之碳氫化合物。該C₅至C₁₂的飽和碳氫化合物包括但不限於，正戊烷、石油醚(ligroin)、正己烷、正庚烷、環己烷以及環庚烷。

該用語C₆至C₁₂的芳香族意指被取代以及未被取代之碳氫化合物，該碳氫化合物具有苯基團作為它們的骨架。較佳的碳氫化合物包括苯、二甲苯、甲苯、氯苯、鄰二甲苯、間二甲苯、對二甲苯、二甲苯(s)，其中較佳地為甲苯。

如本文中所使用的，該用語「鹵(halo)」或「鹵素(halogen)」包括氯、溴、碘以及氟。

該用語「阻隔基」意指展現下列特徵之化學基團。該「基團」係源自於「保護化合物」。選自一級羥基至二級羥基的基團可於符合胺基磷酸酯的穩定性的情況(pH 2-8)下被置放，並給予所生成之產物實質上不同的物理特性，使該3'-胺基磷酸酯-5'-新的基團產物容易與未反應之所需化合物分離。該基團必定以好的產率而選擇性地反應，以提供被保護的受質，該受質對於所預計的反應是穩定的(參見Protective Groups in Organic Synthesis, 3nd ed. T. W. Greene以及P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, New York, N.Y.,

1999)。所述基團的範例包括但不限於：苯甲醯基、乙醯基、被苯基取代的苯甲醯基、四氫吡喃、三苯甲基、DMT(4,4'-二甲氧基三苯甲基)、MMT(4-單甲氧基三苯甲基)、三甲氧基三苯甲基、pixyl(9-苯基吡啶-9-基)基團、硫基pixyl(9-苯基硫吡啶-9-基)或9-(p-甲氧基苯基)黃嘌呤-9-基(MOX)等；C(O)-烷基、C(O)Ph、C(O)芳基、CH₂O-烷基、CH₂O-芳基、SO₂-烷基、SO₂-芳基、叔丁基二甲基矽基、叔丁基二苯基矽基。乙縮醛，例如MOM或THP以及諸如此類被認為是可能的基團。含氟化合物亦被考量在內，以至於它們可被連接至化合物並且可經由通過氟之固相萃取媒介(FluoroFlash[®])而被選擇性地移除。具體的範例包括含氟之三苯甲基類似物、三苯甲基類似物1-[4-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-全氟癸基)苯基]-1,1-二苯基甲醇。其他三苯甲基的含氟類似物、BOC、FMOC、CBz等等亦被考慮。像是對甲苯磺醯氯的磺醯氯可選擇性地於5'位置反應。酯類可選擇性地形成例如為醋酸鹽和苯甲酸。可使用二羧酸酐，例如琥珀酸酐與其衍生物，以生成酯類與自由羧酸的連結，這類範例包括但不限於草醯基、丙二醯基、丁二醯基、戊二醯基、己二醯基、庚二醯基、辛二醯基、壬二醯基、癸二醯基、苯二甲醯基、異酞醯基、對酞醯基等等。該自由羧酸戲劇性地增加極性，並且也可被用來作為處理萃取該反應產物進入例如碳酸氫鈉溶液的弱鹼性水相中。該胺基磷酸酯基團在酸性媒介中為相對穩定的，因此基團需要酸性反應條件，例如四氫吡喃基亦可被使用。

該用語「保護基」係衍生自「保護化合物」，具有其清楚且一般的意義，即，至少一個保護或阻隔基結合到至少一個功能基(例如： $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 等)上，其允許至少一個其他功能基的化學修飾。保護基的範例包括但不限於，苯甲醯基、乙醯基、被苯基取代的苯甲醯基、四氫吡喃、三苯甲基、DMT(4,4'-二甲氧基三苯甲基)、MMT(4-單甲氧基三苯甲基)、三甲氧基三苯甲基、pixyl(9-苯基吡啶-9-基)基團、硫基pixyl(9-苯基硫吡啶-9-基)或9-(p-甲氧基苯基)黃嘌呤-9-基(MOX)等； $\text{C}(\text{O})$ -烷基、 $\text{C}(\text{O})\text{Ph}$ 、 $\text{C}(\text{O})$ 芳基、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ (較低級的烷基)、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ (較低級的亞烷基)芳基(例如， $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{Ph}$)、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ -芳基、 CH_2O -烷基、 CH_2O -芳基、 SO_2 -烷基、 SO_2 -芳基，包含至少一個矽原子的保護基，例如，叔丁基二甲基矽基、叔丁基二苯基矽基、 Si (較低級的烷基) $_2\text{OSi}$ (較低級的烷基) $_2\text{OH}$ (例如， $-\text{Si}(\textit{i}\text{Pr})_2\text{OSi}(\textit{i}\text{Pr})_2\text{OH}$)。

如本文中所使用的且除非另外定義，該用語「保護化合物」意指包含一「保護基」的化合物，且該化合物能夠與一包含能被保護之功能基團的化合物反應。

如本文中所使用的，該用語「脫離基」具有對於熟知技術人員相同的意義(Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure-Fourth Edition by Jerry March, John Wiley以及Sons Ed.; 1992頁351-357)，且代表為一受質分子之一部分且附接至該受質分子的基團；在該受質分子經歷取代反應(例如以親核劑)的反應中，該脫離基是接著被取代的。脫離基的範例包括但不限於：鹵素(F、Cl、

Br以及I)，較佳為Cl、Br或I；甲苯磺酸鹽、甲磺酸鹽、三氟甲磺酸鹽、醋酸鹽、樟腦磺酸鈉、芳基氧化物以及被至少一個拉電子基取代的芳基氧化物(例如，對硝基酚、2-氯酚、4-氯酚、2,4-二硝基酚、五氟酚等)，以及諸如此類。該用語「拉電子基」在此被給予其清楚的含義。拉電子基的範例包括但不限於，鹵素、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})$ (較低級的烷基)、 $-\text{C}(\text{O})(\text{芳基})$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ (較低級的烷基)、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{芳基})$ 等等。

如本文中所使用的，該用語「鹼性試劑」意指能夠去質子化一羥基的化合物。鹼性試劑的範例包括但不限於，(較低級的烷)氧化物((較低級烷基)OM)與酒精溶劑的組合，其中(較低級的烷)氧化物包括但不限於， MeO^- 、 EtO^- 、 $^n\text{PrO}^-$ 、 $^i\text{PrO}^-$ 、 $^t\text{BuO}^-$ 、 $^i\text{AmO}^-$ (異戊氧化物)等等，以及其中M是鹼金族金屬陽離子，例如 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 等等。酒精溶劑包括(較低級烷基)OH，像是舉例來說， MeOH 、 EtOH 、 $^n\text{PrOH}$ 、 $^i\text{PrOH}$ 、 $^t\text{BuOH}$ 、 $^i\text{AmOH}$ 等等。也可使用非烷氧基鹼，例如氫化鈉、六甲基二矽氮烷鈉、六甲基二矽氮烷鋰、二異丙胺鋰、氫化鈣、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鈹、DBU、DBN、格氏試劑(Grignard reagents)，例如(較低級的烷基) Mg (鹵素)，其包括但不限於 MeMgCl 、 MeMgBr 、 $^t\text{BuMgCl}$ 、 $^t\text{BuMgBr}$ 等等。

該用語「鹼類」包含該用語「鹼性試劑」並意指為有能力將含有質子之化合物去質子化的化合物，即，布忍斯特鹼。除了列舉於前文的範例外，進一步的鹼類之範例係包括但不限於，吡啶、柯林鹼、2,6-(較低級的烷類)-吡啶、

二甲基苯胺、咪唑、N-甲基咪唑、吡唑、N-甲基吡唑、三乙胺、二異丙基乙胺等等。

該用語「拉電子基」在此被給予其清楚的含義。拉電子基的範例包括但不限於，鹵素(F、Cl、Br或I)、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})$ (較低級的烷基)、 $-\text{C}(\text{O})$ (芳基)、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ (較低級的烷基)、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ (芳基)等等。

該用語「共結晶物」包括4、 R_P -4或 S_P -4與鹽類結合的共結晶物，其包括藥學上可接受的鹽類。

如本文中所描述的，用語「鹽類」意指包含一陽離子及一陰離子的一化合物，其可藉由質子接受基元的質子化作用及/或質子供給基元的去質子化作用而產生。應注意的是，質子接受基元的質子化作用導致陽離子種類的形成，其中電荷是由生理陰離子的存在而平衡，而該質子供給基元的去質子化作用導致陰離子種類的形成，其中電荷是由生理陽離子的存在而平衡。

該措辭「藥學上可接受的鹽類」意指一鹽類為藥學上可接受的。藥學上可接受的鹽類之範例包括但不限於：(1) 以例如氫氯酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸以及諸如此類的無機酸形成的酸加成鹽；或以例如乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、蘋果酸、馬來酸、延胡索酸、酒石酸、檸檬酸、3-(4-羥苯甲醯基)苯甲酸、肉桂酸、杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羥基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟腦磺酸、月桂硫酸、葡萄糖酸、麩胺酸、水楊酸、黏康酸以及諸如此類的有機酸形成

的酸加成鹽，或(2)以上文列出之任何無機酸的共軛鹼所形成的鹼加成鹽，其中該共軛鹼包含陽離子成分，該陽離子成分選自 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 $\text{NH}_g\text{R}^{4-g+}$ ，其中 R^{4-g+} 是 C_{1-3} 烷基以及 g 是選自0、1、2、3或4的數字。應了解的是，如本文中所定義，所有提及的藥學上可接受鹽類包括相同酸加成鹽的溶劑加成形式(溶劑化物)或晶體形式(多形體)。

該用語「烷基」意指未分支的或分支鏈、飽和的單價碳氫殘基，該殘基包含1至30個碳原子。該用語「 C_{1-M} 烷基」意指包含1至 M 個碳原子的烷基，其中 M 是具有下述值的整數：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或30。該用語「 C_{1-4} 烷基」意指包含1至4個碳原子的烷基。該用語「較低級烷基」指的是包含1至6個碳原子的直鏈或支鏈碳氫殘基。如本文中所使用的，「 C_{1-20} 烷基」意指包含1至20個碳原子的烷基。如本文中所使用的，「 C_{1-10} 烷基」意指包含1至10個碳原子的烷基。烷基的範例包括但不限於較低級的烷基，包括甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、叔丁基或戊基、異戊基、新戊基、己基、庚基和辛基。該用語(芳)烷基或(雜芳基)烷基意指該烷基是分別由芳基或雜芳基隨選地取代。

該用語「烯基」意指未取代的碳氫鏈自由基，該碳氫鏈自由基具有2至10個碳原子，並具有一或二個烯烴的雙鍵，較佳是一個烯烴的雙鍵。該用語「 C_{2-N} 烯基」意指包含2至 N 個碳原子的烯基，其中 N 是具有下述值的整數：3、4、

5、6、7、8、9或10。該用語「C₂₋₁₀烯基」意指包含2至10個碳原子的烯基。該用語「C₂₋₄烯基」意指包含2至4個碳原子的烯基。範例包括但不限於，乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)或2-丁烯基(巴豆基)。

如本文中所使用的且除非另外具體說明，該用語「芳基」意指取代的或未取代的苯基(Ph)、聯苯或萘基，較佳地，該用語芳基意指取代的或未取代的苯基。該芳基基團可被一或更多的基元取代，該一或更多的基元選自羥基、F、Cl、Br、I、胺基、烷基胺基、芳基胺基、烷氧基、芳基氧基、硝基、氰基、磺酸、硫酸鹽、膦酸、磷酸鹽以及膦酸鹽，如同本領域的技術人員所知的，當必要時可為未被保護的或被保護的，例如，如同T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999中所教示的。

如本文中所使用的且除非另外說明，該用語「芳基氧化物」意指被取代的或未被取代的酚鹽(PhO-)、對苯基酚鹽(p-Ph-PhO-)或萘鹽，較佳地該用語芳基氧化物意指被取代的或未被取代的酚鹽。該芳基氧化物基團可被一或更多基元取代，該一或更多的基元選自羥基、F、Cl、Br、I、-C(O)(較低級的烷基)、-C(O)O(較低級的烷基)、胺基、烷基胺基、芳基胺基、烷氧基、芳基氧基、硝基、氰基、磺酸、硫酸鹽、膦酸、磷酸鹽以及膦酸鹽，如同本領域的技術人員所知的，當必要時可為未被保護的或被保護的，例如，如同T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Groups

in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999 中所教示的。

用語「製劑」或「劑量形式」意欲包含活性化合物的固體以及液體配方兩者，且本領域中具有一般技藝之技術人員將了解到活性成分可依照其所想要的劑量以及藥物動力學參數而存在於不同的製劑中。

如本文中所使用之該用語「賦形劑」意指用以製備藥學組成物的一化合物，該化合物通常是安全的、無毒的且既非生物上也非其他方面不良的，並且包含獸醫用途以及人類藥學用途上可接受的賦形劑。

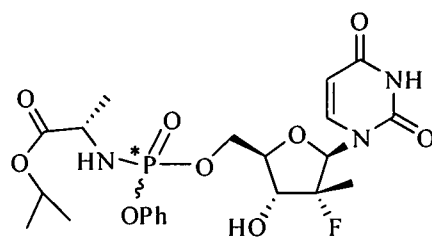
該用語「結晶」意指 S_p-4 或 R_p-4 之任一固態樣品當經由X光粉末繞射或一單晶X光技術測定時而具有結晶特徵的情況。

該用語「晶體般的」意指一種情況，其中當以一種方法(例如視覺或藉由光學或偏光顯微鏡)測定時， S_p-4 或 R_p-4 的固體樣本具有結晶特徵，但當以另一種方法(例如X光粉末繞射)測定時，則不具有結晶特徵。藉由視覺或藉由光學或偏光顯微鏡來視學測定固體樣本之結晶度的方法揭露於USP<695>以及<776>中，其兩者都併入以作為參考。「晶體般的」 S_p-4 或 R_p-4 之固體樣本可在特定的條件下結晶，但當於其他條件下時可能變成非結晶。

該用語「非晶質的」意指 S_p-4 或 R_p-4 之任一固態樣品既非結晶亦非晶體般的情況。

具體實施例

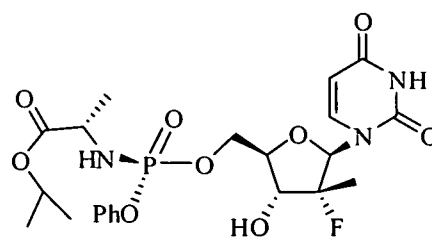
第一具體實施例係針對由結構式4所表示之一化合物：



4

其中P*代表一掌性磷原子。由於該掌性磷原子，由結構式4表示之該化合物包含兩個被標示為 R_P-4 以及 S_P-4 之非鏡像異構物。由結構式4所表示之化合物也可為溶劑、水合物或一混合之溶劑/水合物的一部分。該溶劑被標示為 $4 \cdot nS$ ，而該水合物被標示為 $4 \cdot mH_2O$ ，其中 S 為一晶格溶劑， n 由約0至約3的整數或非整數量變化，並且 m 由約0至約5的整數或非整數量變化。最後，以結構式4所表示之一化合物可能不以溶劑或水合物存在，但具有一特定有利的量之吸附溶劑(S)或水。在該情況中，該 S 或水的量可根據以結構式4所表示之該化合物的重量而由約0wt.%至約10wt.%變化。以結構式4所表示之該化合物以及其溶劑和其水合物為結晶、晶體般的或非晶質的。

第二具體實施例係針對由結構式 R_P-4 所表示之一化合物：



R_P-4

由結構式 R_P-4 所表示之化合物也可為溶劑、水合物或

一混合之溶劑/水合物的一部分。該溶劑被標示為 $R_p-4 \cdot nS$ ，而該水合物被標示為 $S_p-4 \cdot mH_2O$ ，其中 S 為一晶格溶劑， n 由約0至約3的整數或非整數量變化，並且 m 由約0至約5的整數或非整數量變化。最後，以結構式 R_p-4 所表示的該化合物可能不以溶劑、水合物或混合之溶劑/水合物存在，但具有一特定有利的量之吸附溶劑(S)、水或 S 與水兩者。在該情況中，該 S 或水的量可根據以結構式 R_p-4 所表示之該化合物的重量而由約0wt.%至約10wt.%變化。以結構式 R_p-4 所表示之該化合物以及其溶劑和其水合物為結晶、晶體般的或非晶質的。

第二具體實施例之第一方面係針對結晶 R_p-4 。

第二具體實施例之第二方面係針對具有XRPD 2 θ -反射角($^\circ$)於約6.6、7.1、9.0、11.6、17.9、20.7、24.1、24.4以及26.2之結晶 R_p-4 。

第二具體實施例之第三方面係針對具有XRPD 2 θ -反射角($^\circ$)於約6.6、7.1、9.0、11.0、11.6、12.0、16.0、17.9、19.6、20.7、21.0、21.7、21.9、22.2、23.1、24.1、24.4、26.1、27.3、27.7以及28.2之結晶 R_p-4 。

第二具體實施例之第四方面係針對具有XRPD繞射模式、實質上如同第2圖所示之結晶 R_p-4 。

第二具體實施例之第五方面係針對具有以下FT-IR波峰(cm^{-1})：1742、1713、1679、1460、1377、1259、1157以及1079之 R_p-4 。

第二具體實施例之第六方面係針對具有FT-IR光譜、實

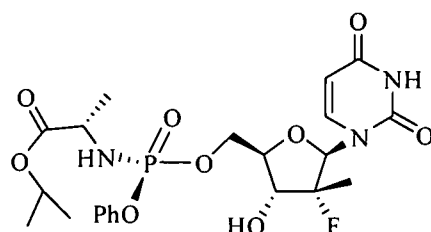
質上如同第15圖所示之 R_P-4 。

第二具體實施例之第七方面係針對實質上純化之 R_P-4 。

第二具體實施例之第八方面係針對實質上純化之結晶 R_P-4 。

第二具體實施例之第九方面係針對實質上純化之非晶質 R_P-4 。

第三具體實施例係針對以結構式 S_P-4 所表示之一化合物：



S_P-4

由結構式 S_P-4 所表示之化合物也可為溶劑、水合物或一混合之溶劑/水合物的一部分。該溶劑被標示為 $S_P-4 \cdot nS$ ，而該水合物被標示為 $S_P-4 \cdot mH_2O$ ，其中 S 為一晶格溶劑， n 由約0至約3的整數或非整數量變化，並且 m 由約0至約5的整數或非整數量變化。最後，以結構式 S_P-4 所表示的該化合物可能不以溶劑或水合物存在，但具有一特定有利的量之吸附溶劑(S)或水。在該情況中，該 S 或水的量可根據以結構式 S_P-4 所表示之該化合物的重量而由約0wt.%至約10wt.%變化。以結構式 S_P-4 所表示之該化合物以及其溶劑和其水合物為結晶、晶體般的或非晶質的。

第三具體實施例之第一方面係針對結晶 S_P-4 。

第三具體實施例之第二方面係針對單斜結晶 S_P-4 ，較佳

地具有下列單位晶格參數 $a \sim 12.88 \text{ \AA}$ 、 $b \sim 6.17 \text{ \AA}$ 、 $c \sim 17.73 \text{ \AA}$ 以及 $\beta \sim 92.05^\circ$ 。

第三具體實施例之第三方面係針對單斜結晶 S_{p-4} ，較佳地具有下列單位晶格參數 $a \sim 20.09 \text{ \AA}$ 、 $b \sim 6.10 \text{ \AA}$ 、 $c \sim 23.01 \text{ \AA}$ 以及 $\beta \sim 112.29^\circ$ 。

第三具體實施例之第四方面係針對單斜結晶 S_{p-4} ，較佳地具有下列單位晶格參數 $a \sim 12.83 \text{ \AA}$ 、 $b \sim 6.15 \text{ \AA}$ 、 $c \sim 17.63 \text{ \AA}$ 以及 $\beta \sim 91.75^\circ$ 。

第三具體實施例之第五方面係針對單斜結晶 S_{p-4} ，較佳地具有下列單位晶格參數 $a \sim 12.93 \text{ \AA}$ 、 $b \sim 6.18 \text{ \AA}$ 、 $c \sim 18.01 \text{ \AA}$ 以及 $\beta \sim 96.40^\circ$ 。

第三具體實施例之第六方面係針對具有 XRPD 2 θ -反射角 ($^\circ$) 於約 5.2、7.5、9.6、16.7、18.3、22.2 之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第七方面係針對具有 XRPD 2 θ -反射角 ($^\circ$) 於約 5.0、7.3、9.4 以及 18.1 之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第八方面係針對具有 XRPD 2 θ -反射角 ($^\circ$) 於約 4.9、6.9、9.8、19.8、20.6、24.7 以及 26.1 之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第九方面係針對具有 XRPD 2 θ -反射角 ($^\circ$) 於約 6.9、9.8、19.7、20.6 以及 24.6 之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第九方面係針對具有 XRPD 2 θ -反射角 ($^\circ$) 於約 5.0、6.8、19.9、20.6、20.9 以及 24.9 之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第十方面係針對具有 XRPD 2 θ -反射角 ($^\circ$) 於約 5.2、6.6、7.1、15.7、19.1 以及 25.0 之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第十一方面係針對具有具有XRPD繞射模式、實質上如同第3、4、5、6、7圖以及第8圖任一者所示之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第十二方面係針對具有下列FT-IR波峰(cm^{-1})於約：1743、1713、1688、1454、1378、1208以及1082之 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第十三方面係針對具有FT-IR光譜、實質上如同第7圖所示之 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第十四方面係針對實質上純化之 S_{p-4} 。

第三具體實施例之第十五方面係針對實質上純化之結晶 S_{p-4} 。

第三具體實施例的第十六方面係針對實質上純化之非晶質 S_{p-4} 。

劑量、給藥以及用途

第四具體實施例係針對一種組成物，該組成物使用化合物4、 R_{p-4} 或 S_{p-4} 中的任一者作為治療及/或預防任何病毒物。可能的病毒物係包括但不限於：C型肝炎病毒、B型肝炎病毒、A型肝炎病毒、西尼羅病毒、黃熱病病毒、登革熱病毒、鼻病毒、小兒麻痺病毒、牛病毒性下痢病毒、日本腦炎病毒，或那些隸屬於瘟疫病毒、肝炎病毒或黃熱病毒群組的病毒。

此具體實施例的一方面係針對用於治療本文所揭露之任一病毒物的組成物，該組成物包含選自賦形劑、載體、

稀釋劑之藥學上可接受的媒介、同等之媒介，以及化合物4、 R_p -4或 S_p -4中的任一者，其意欲包括其水合物、溶劑以及化合物4、 R_p -4或 S_p -4任一者之任何結晶形式，或其水合物與其溶劑。

化合物4、 R_p -4或 S_p -4可以廣泛類型的口服給藥劑量形式以及載體獨立進行配置。口服給藥可為錠劑、膜衣錠、硬與軟明膠膠囊、溶液、乳化液、糖漿或懸浮液的形式。在其他給藥途徑中，當藉由栓劑給藥而給藥時，化合物4、 R_p -4或 S_p -4是有效的。最方便的給藥方式通常是使用方便的每日劑量療法來口服，每日劑量療法可根據疾病的嚴重度以及病患對於抗病毒藥物的反應而調整。

化合物4、 R_p -4或 S_p -4與一或更多的傳統賦形劑、載體或稀釋劑可共同置入於藥學組成物以及單位劑量的形式。該藥學組成物以及單位劑量形式可與額外的活性化合物或不與額外的活性化合物，以慣用的比例組成慣用的成分，且單位劑量形式可包含任何適合有效量的活性成分，該有效量的活性成分與將使用的預期每日劑量範圍相稱。該藥學組成物可做為固體或液體而被使用，固體例如錠劑或填充膠囊、半固體、粉末、持續釋放配方，液體例如懸浮液、乳化液、或口服用的填充膠囊；或用於直腸或陰道給藥的栓劑形式。典型的製劑將包含從約5%至約95%的一或多個活性化合物(w/w)。

化合物4、 R_p -4或 S_p -4可被單獨地給藥，但通常與一或更多適合的藥學賦形劑、稀釋劑或載體以混合物的形式進

行給藥，該藥學賦形劑、稀釋液或載體依據預期的給藥途徑以及標準藥學慣例而被選擇。

固體形式製劑包括例如粉末、錠劑、丸劑、膠囊、栓劑以及可分散的顆粒。固體載體可以是一或更多的物質，其也可用作稀釋液、調味劑、助溶劑、潤滑劑、懸浮劑、黏結劑、防腐劑、錠劑崩解劑或封裝材料。在粉末中，載體通常是細微地被分離的固體，其是與細微地分離的活性成分的混合物。在錠劑中，活性成分通常與具有必要結合能力的載體以適當比例混合，並且以想要的形狀以及尺寸壓縮。適合的載體包括但不限於碳酸鎂、硬脂酸鎂、滑石、糖、乳糖、果膠、糊精、澱粉、明膠、黃耆膠、甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、低熔點蠟、可可油以及諸如此類。除了活性成分外，固體形式的製劑可包含著色劑、香料、安定劑、緩衝液、人工與天然甜味劑、分散劑、增稠劑、助溶劑以及諸如此類。固體配方的範例被例舉於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 6,267,985；US 6,294,192；US 6,383,471；US 6,395,300；US 6,569,463；US 6,635,278；US 6,645,528；US 6,923,988；US 6,932,983；US 7,060,294 以及 US 7,462,608 中，其每一篇被併入以作為參考。

液體配方也適合用於含有液體配方之口服給藥，液體

配方包括乳化液、糖漿、醃劑以及懸浮水溶液。這些包括預期在使用前迅速地被轉變成液體形式製劑的固體形式製劑。液體製劑的範例被舉例於美國專利號3,994,974；5,695,784以及6,977,257。乳化液可製備於溶液中，例如，在聚丙二醇水溶液中，或可包含例如磷脂、山梨醇單油酸酯或阿拉伯膠的乳化劑。可將細微地分離的活性組成物與黏性材料分散於水中而製備出懸浮水溶液，該黏性材料例如天然或合成的膠、樹脂、甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉以及其他熟知的懸浮劑。

該化合物4、 R_P -4或 S_P -4可被獨立配製成栓劑而給藥。先將例如脂肪酸甘油酯或可可油的一混合物之一低熔點蠟熔化，並藉由例如攪拌而將該活性組成物均質地分散。然後將已熔化的均質混合物倒入便利尺寸的模具中，讓其冷卻並固化。

該化合物4、 R_P -4或 S_P -4可獨立配製用於陰道給藥。除了該活性成分外，子宮托(pessary)、棉條、乳霜、凝膠、膏狀物、泡沫或噴霧此類載體為本技術領域已知為適當的。這些配方的某些亦可與伴隨或不伴隨殺精子劑的保險套結合使用。

適合的配方與藥學載體、稀釋液以及賦形劑被描述於 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 1995, E. W. Martin, Mack Publishing Company, 第19版, Easton, Pennsylvania中，其於此併入以作為參考。熟知配製技術的科學家可在本說明書的教示中修飾該配方，以提供用於特

定給藥途徑的眾多配方，而不使包含本文考量之化合物的組成物不穩定或犧牲它們的醫療活性。

額外地，純化的化合物4、 R_p -4或 S_p -4也可與微脂體或微膠粒結合而獨立配製。關於微脂體，考量到的是該純化的化合物可利用美國專利編號4,797,285；5,013,556；5,077,056；5,077,057；5,154,930；5,192,549；5,213,804；5,225,212；5,277,914；5,316,771；5,376,380；5,549,910；5,567,434；5,736,155；5,827,533；5,882,679；5,891,468；6,060,080；6,132,763；6,143,321；6,180,134；6,200,598；6,214,375；6,224,903；6,296,870；6,653,455；6,680,068；6,726,925；7,060,689以及7,070,801中所揭露的方式配製，其每一篇於此併入以作為參考。關於微膠粒，考量到的是該純化的化合物可利用美國專利編號5,145,684以及5,091,188中所揭露的方式配製，兩專利皆於此併入以作為參考。

該第五具體實施例係針對化合物4、 R_p -4或 S_p -4之任一於藥劑製造中的用途，該用途為治療下列病毒物中的任一者之感染所導致的任何症狀：C型肝炎病毒、西尼羅病毒、黃熱病病毒、登革熱病毒、鼻病毒、小兒麻痺病毒、A型肝炎病毒、牛病毒性下痢病毒以及日本腦炎病毒。

該用語「藥劑」意指在對其有需要的個體進行治療及/或預防的方法中使用的物質，其中該物質包括但不限於包含任一化合物4、 R_p -4或 S_p -4之組成物、配方、劑量形式以及諸如此類。考量到的是，化合物4、 R_p -4或 S_p -4在製造用

以治療本文所揭露之任何抗病毒症狀的藥劑上的使用為單獨使用或與另一個本文揭露之化合物結合使用。藥劑包括但不限於由本文揭露之第四具體實施例所考量之組成物中的任何一個。

第六具體實施例係針對對其有需要的個體進行治療及/或預防的方法，該方法包含以一治療上有效之量的化合物4、 R_p -4或 S_p -4中的任一者給藥至該個體。

預期對其有需要的個體為一個具有由本文所揭露之任何病毒物的感染所導致之任何症狀的個體，該病毒物包括但不限於C型肝炎病毒、西尼羅病毒、黃熱病病毒、登革熱病毒、鼻病毒、小兒麻痺病毒、A型肝炎病毒、牛病毒性下痢病毒或日本腦炎病毒，黃熱病毒科病毒或瘟疫病毒或肝炎病毒或導致病症相等於或可相比於任何上列病毒的病毒物。

該用語「個體」意指哺乳動物，其包括但不限於牛、豬、羊、雞、火雞、水牛、美洲駝、駝鳥、狗、貓以及人類，較佳地該個體為人類。考量到的是，在第九具體實施例中治療其個體的方法中可為本文中所考量的任何化合物，該化合物為單獨的或與另一個本文所揭露的化合物結合。

如本文中所使用的，該用語「醫療有效量」意指減輕在一個體中疾病症狀所需的量。該劑量將被調整至每個特定案例中的該個體需求。該劑量可依據眾多因素在寬的限制內變化，該因素例如所治療疾病的嚴重度、病患的年齡與一般健康狀況、病患正用以治療的其他藥劑、給藥的途徑與形式、以及涉及的醫學從事者的喜好與經驗。對於口

服給藥，在單一療法及/或合併療法中，每天介於約0.001g以及約10g之間(包括這之間的所有值)之每日劑量應為適當的，例如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以及9.5。特定的每日劑量是每天介於約0.01g以及約1g之間，包括這之間所有0.01g(即10mg)的遞增值，較佳的每日劑量是每天約0.01g以及約0.8g之間，更佳的是每天約0.01g以及約0.6g之間，以及最佳是每天約0.01g以及約0.25g之間，其中每個之間包括所有0.01g的遞增值。一般而言，治療是以較大的初始「載入劑量」開始，以快速地減少或消除病毒，接著將該劑量減低至足以預防感染復發的程度。具有治療本文所描述之疾病的一般技藝之技術人員將能夠不經過度的實驗並依靠個人知識、經驗以及此申請案中的揭露內容而確定用於給定疾病以及病患之本發明化合物的醫療有效量。

可從肝功能測試而確認醫療功效，該肝功能測試包括但不限於蛋白質量，例如血清蛋白質[例如：白蛋白、凝血因子、鹼性磷酸酶、轉胺酶(例如，丙胺酸轉胺酶、天門冬胺酸酯轉胺酶)、5'-核苷酶、 γ -麩醯胺醯基轉肽酶以及諸如此類]、膽紅素的合成、膽固醇的合成以及膽酸的合成；肝代謝功能，其包括但不限於碳水化合物的代謝、胺基酸與氨的代謝。或者，該醫療功效可藉由測量HCV-RNA而監控。這些測試的結果將使該劑量被最佳化。

第六具體實施例的第一方面係針對有其需要之個體的治療及/或預防方法，所述方法包含將一醫療有效量之由化合物4、 R_p -4或 S_p -4所表示之任何化合物以及一醫療有效量之另一抗病毒劑給藥至該個體，其中該給藥為同時或替換的。要了解的是，替換給藥之間的時間範圍可介於1-24小時之間，其包括其間的任何子範圍，包括：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22以及23小時。

「另一個抗病毒劑」的範例包括但不限於：HCV NS3蛋白酶抑制物(參見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以及WO 2008010921)；HCV NS5B抑制劑(參見US 2004229840、US 2005154056、US 2005-98125、US 20060194749、US 20060241064、US 20060293306、US 2006040890、US 2006040927、US 2006166964、US 2007275947、US 6784166、US20072759300、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以及WO2007095269)；HCV NS4抑制劑(參見WO 2005067900以及WO 2007070556)；HCV NS5a抑制劑(參見US 2006276511、WO 2006035061、WO 2006100310、WO 2006120251以及WO 2006120252)；類鐸受體(Toll-like receptor)拮抗劑(參見WO 2007093901)；以及其他抑制劑(參見WO 2000006529、WO 2003101993、WO 2004009020、WO 2004014313、WO 2004014852以及WO 2004035571)；以及於2008年3月21日申請之美國專利申請案號12/053,015(US 2010/0016251)中所揭露的化合物(其內容併入以作為參考)、干擾素- α 、干擾素- β 、聚乙二醇化干擾素- α 、利巴韋林、左旋韋林(levovirin)、韋拉米定(viramidine)、另一核苷HCV聚合酶抑制劑、HCV非核苷聚合酶抑制劑、HCV蛋白酶抑制劑、HCV解旋酶抑制劑或HCV融合抑制劑。

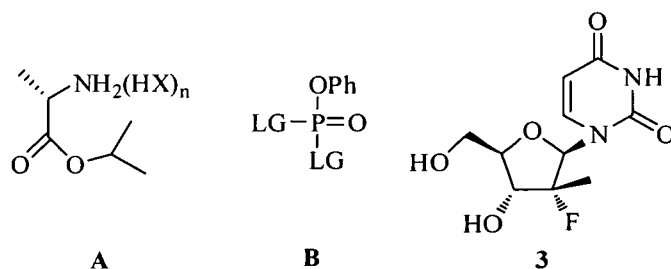
當化合物4、 R_p -4或 S_p -4之任一者與另一個抗病毒劑結合而給藥時，該活性可增加而超過該母化合物。當該治療是合併療法時，此種關於該核苷衍生物的給藥可為同時的或連續的。因此，如本文中所使用的，「同時給藥」包括在同時間或在不同時間給藥該藥劑。同時給藥兩種或更多的藥劑可藉由包含兩種或更多活性成分的單一配方而達成，或藉由連續地同時以單一活性劑而給藥兩種或更多的劑量。

形式而達成。

將了解到的是，本文所提及之治療延伸至預防法以及對現有症狀的治療。此外，如本文中所使用的，該用語對HCV之感染的「治療」，也包括由HCV感染所關聯或媒介之疾病或症狀或其臨床症候的治療或預防。

製備

第七具體實施例係針對製備化合物**4**、 R_P -**4**或 S_P -**4**之任一者的製程，其包含：a)將異丙基-氫化鋁(A)、二-LG-苯基磷酸鹽(B)、2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(**3**)以及一鹼類反應以獲得包含 S_P -**4**以及 R_P -**4**的至少其中之一的第一混合物，



其中X為一酸之共軛鹼，n為0或1，以及LG為一脫離基；b)該第一混合物與一保護化合物反應，以獲得包含受保護之 S_P -**4**以及受保護之 R_P -**4**的至少其中之一第二混合物；以及c)隨選地依序將第二混合物結晶化、層析或萃取，以獲得**4**、 S_P -**4**或 R_P -**4**。

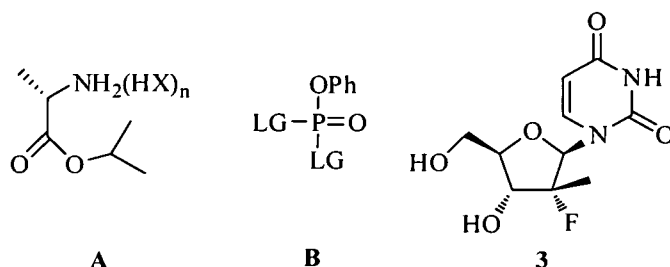
在第七具體實施例的第一方面，該異丙基氫化鋁以其氫氯酸鹽存在，其較佳為實質上無水的。

在第七具體實施例的第二方面，該鹼類為N-甲基咪唑。

在第七具體實施例的第三方面，該A比B比**3**之莫耳分率為約1.6比1.3比1。

在第七具體實施例的第四方面，該保護化合物為叔丁基二甲基氯矽烷。

第八具體實施例係針對製備 S_P-4 或 R_P-4 的製程，其包含：a) 將異丙基-氫化鋁(A)、二-LG-苯基磷酸鹽(B)、2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(3)以及一鹼類反應，以獲得包含 S_P-4 以及 R_P-4 的至少其中之一的第一混合物，



其中X為一酸之共軛鹼，n為0或1，以及LG為一脫離基；以及b) 隨選地依序將第二混合物結晶化、層析或萃取，以獲得純化之 S_P-4 或 R_P-4 。

第八具體實施例的第一方面用於額外地製備 R_P-4 ，包括藉由溶解或懸浮該第二混合物或經純化之 R_P-4 混合物於一溶劑中以進一步的純化該第二混合物或該經純化之 R_P-4 ；隨選地接著以結晶之 R_P-4 種晶；並且加入足夠的反溶劑以獲得結晶 R_P-4 。

第八具體實施例的第二方面用於額外地製備 S_P-4 ，包括進一步的純化該第二混合物或該經純化之 S_P-4 ，其藉由d) 溶解或懸浮該第二混合物或該經純化之 S_P-4 於溶劑中，接著於約室溫下以結晶之 S_P-4 種晶；收集包含多數 S_P-4 之第一固體物；於其回流的溫度下溶解該第一固體物於溶劑中；並冷卻或加入反溶劑以獲得第二固體物。

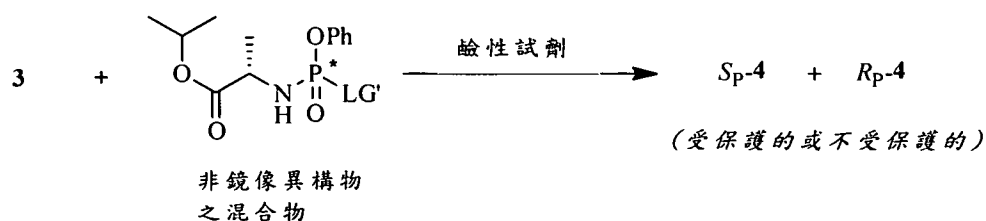
第八具體實施例的第三方面用於額外地製備 S_{p-4} ，包括進一步純化 S_{p-4} ，其藉由d)溶解或懸浮該第二混合物或經純化之 S_{p-4} 混合物於第一溶劑中，接著加入反溶劑以得到第一組成物，將其中的殘餘溶劑/反溶劑以倒出移除而得到殘餘物；以包含第一溶劑與反溶劑之溶液處理該殘餘物，以生成第二組成物，藉由減壓而提供第一固體物；使用第二溶劑以溶解或懸浮該第一固體物以獲得第三組成物；加入 S_{p-4} 之種晶至第三組成物；收集第二固體物；溶解或懸浮該第二固體物於第三溶劑，隨選地加熱至第三溶劑的回流溫度，以獲得第四組成物，並且，如有需要，冷卻該第四組成物以獲得包含 S_{p-4} 的第三固體物，該第三固體物以過濾收集。

第八具體實施例的第四方面用於製備 S_{p-4} ， S_{p-4} 藉由該第二混合物或經純化之 S_{p-4} 而被進一步的純化，其經由d)加入矽膠至該第二混合物或該經純化之 S_{p-4} ，接著經由蒸發溶劑以提供一乾燥泥漿物；於第一溶劑/反溶劑結合物中攪拌該乾燥泥漿物以獲得第一溼潤泥漿物；自該第一溼潤泥漿物中將該第一溶劑/反溶劑結合物移除，以獲得第二溼潤泥漿物與第一組成物；將第二溶劑/反溶劑結合物加入該第二溼潤泥漿物接著攪拌；自該第二溼潤泥漿物中將該第二溶劑/反溶劑結合物移除，以獲得第三溼潤泥漿物與第二組成物；隨選地重覆步驟g)-h)於該三溼潤泥漿物或額外的溼潤泥漿物；自該第二組成物蒸發溶劑；並且由隨選的步驟i)獲得隨選地任何額外的組成物，以獲得第一固體物；溶解

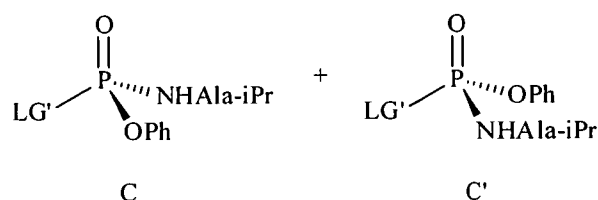
或懸浮該第一固體物於包含第三溶劑和隨選地包含第四溶劑之溶液中，以獲得第三組成物；隨選地加入 S_{p-4} 之種晶至第三組成物；自該第三組成物中獲得包含 S_{p-4} 的第二固體物；並使用第三溶劑隨選地再結晶該第二固體物，以得到包含 S_{p-4} 的第三固體物。

具有一般技藝之技術人員將領會所述化合物可藉由傳統的萃取、傳統的結晶作用或傳統的層析技術加以分離。傳統的層析技術係包括但不限於，矽膠層析(使用例如3-5%於DCM中之甲醇或4-6%於DCM中之異丙醇)以生產加強程度之一異構物(50-100%)並且再將之結晶化。替代地，人們可使用反相層析(使用例如1-30%乙腈水溶液移動相)。再者，所述化合物可藉由超臨界流體層析法SFC而被分離，該層析法以二氧化碳作為主要溶劑，以及以醇類例如甲醇作為修飾劑，較佳地為使用合適的對掌性媒介，例如Daicel Chiralpack IA。替代地，可採用SMB層析法，使用合適的對掌性媒介例如Daicel ChiralPack IA，使用溶劑混合物例如己烷/異丙醇或單一溶劑例如乙酸乙酯。

第九具體實施例係針對製備 S_{p-4} 的製程，其包含：a)將異丙基-丙胺鹽基-胺基磷酸酯與3'-O-受保護的或不受保護的3以及一鹼性試劑反應，以獲得包含受保護或不受保護的 S_{p-4} 之組成物。



其中該異丙基-丙胺鹽基-胺基磷酸酯包含以下列結構式所表示之非鏡像異構物的混合物：



其中C：C'之比率為約1：1。

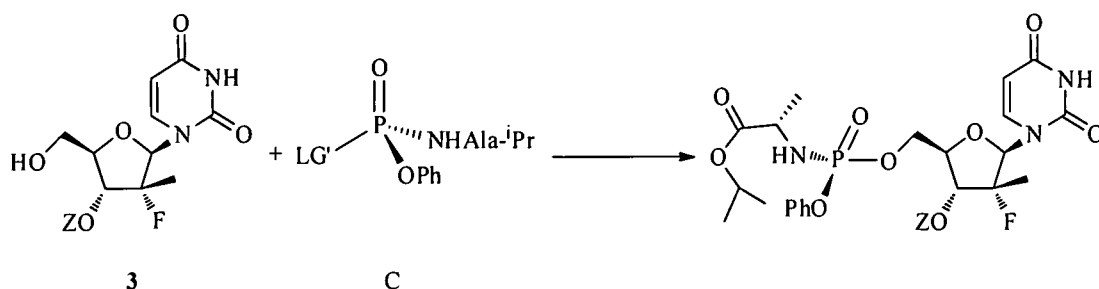
在第一方面，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C：C'之比率為大於或等於約1：1。

在第二方面，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C：C'之比率為大於約1：1。

在第三方面，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C：C'之比率為至少約1.5：1、約2.3：1、約4：1、約5.7：1、約9：1、約19：1、約32.3：1、約49：1或約99：1。

第四方面，LG'為對硝基酚，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C：C'之比率為至少約1.5：1、約2.3：1、約4：1、約5.7：1、約9：1、約19：1、約32.3：1、約49：1或約99：1。

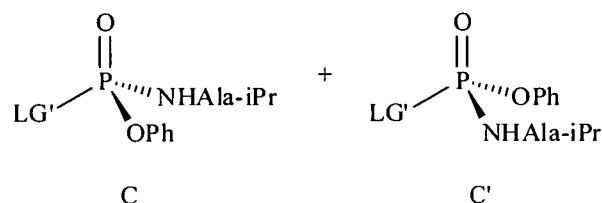
第五方面用於製備S_P-4，其包含：a) 將異丙基-丙胺鹽基-胺基磷酸酯(C)與3'-O-受保護的或不受保護的3以及一鹼性試劑反應，以獲得包含受保護或不受保護的S_P-4之組成物。



其中Z為保護基或氫；LG'為脫離基；以及b)隨選地將所獲得的受保護或不受保護之 S_P -4進行層析、萃取或結晶反應，以獲得經純化之受保護或不受保護之 S_P -4。在子具體實施例中，LG'為甲苯磺酸、樟腦磺酸鈉或被以至少一個拉電子基所取代之芳基氧化物；較佳地，LG'為選自對硝基酚、2,4-二硝基酚以及五氟酚。在進一步的子具體實施例中，當 S_P -4為受保護的，即Z非為氫，該第九具體實施例之製程為進一步將受保護之 S_P -4去保護。在進一步之子具體實施例中，該反應在極性非質子溶劑中進行，例如，四氫呋喃或另一醚溶劑，其可以單獨一者或與彼此結合，或伴隨 C_2 至 C_7 的腈類，例如乙腈。

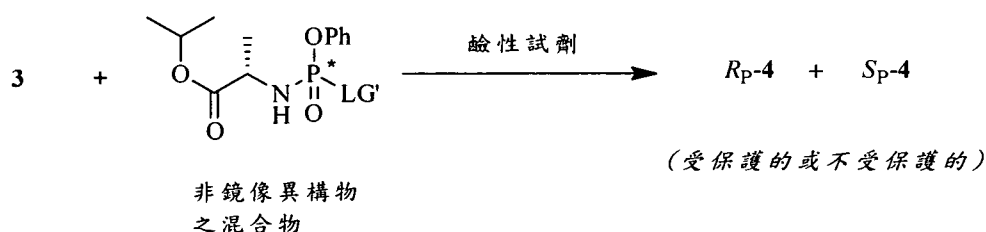
該第九具體實施例的製程進一步包含1) 使 $(LG')P(O)(LG)_2$ (其中LG係為獨立於LG'的一脫離基)與(i)異丙基-氫化鋁與一第一鹼類反應以獲得 $(LG')P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ ，接著使 $(LG')P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ 與苯酚及一第二鹼類反應，以獲得包含C與C'之混合物；與(ii)苯酚與一第一鹼類反應以獲得 $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ ，接著使 $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ 與異丙基-氫化鋁和一第二鹼類反應，以獲得包含C與C'之混合物；或(iii)結合異丙基-氫化鋁、苯酚以及至少一個鹼類，以獲得包含C與C'之混合物；或2)

使 $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})_2$ (其中 LG' 係為獨立於 LG 之一脫離基) 和 (i) 異丙基-氫化鋁以及第一鹼類反應以獲得 $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{Ala-}^i\text{Pr})$ ，接著使 $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{Ala-}^i\text{Pr})$ 與一脫離基先質以及一第二鹼類反應，以獲得包含 C 與 C' 之混合物，

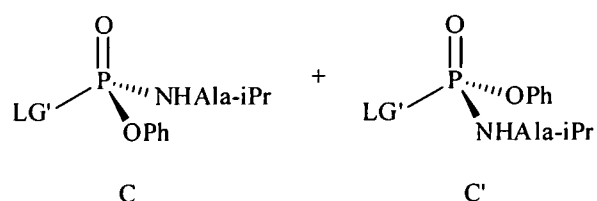


並將該混合物進行層析或將該混合物行結晶作用以獲得 C 。在第九具體實施例的一方面，該異丙基-氫化鋁以其鹽酸鹽存在，其中較佳為實質上無水的。

第十具體實施例係針對製備 $R_P\text{-4}$ 的製程，其包含：a) 將異丙基-丙胺鹽基-胺基磷酸酯與 3'-O-受保護的或不受保護的 3 以及一鹼性試劑反應，以獲得包含受保護的或不受保護的 $R_P\text{-4}$ 之組成物，



其中該異丙基-丙胺鹽基-胺基磷酸酯為由以下列結構式所表示之非鏡像異構物之混合物組成：



其中 C' : C 之比率為約 1 : 1。

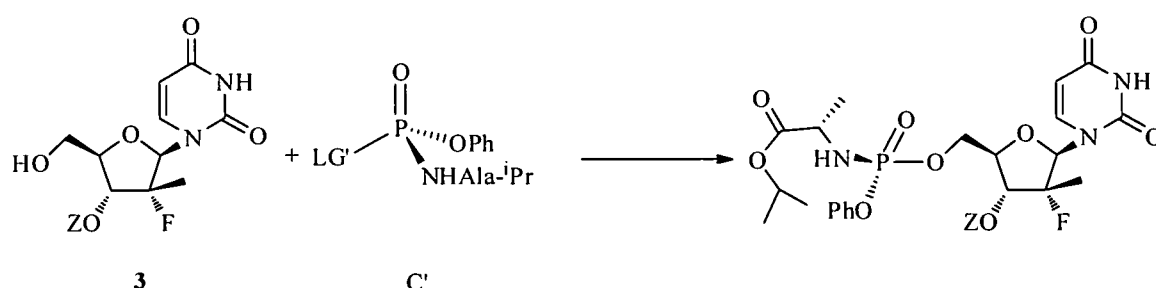
在第一方面，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C'：C之比率為大於或等於約1：1。

在第二方面，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C'：C之比率為大於約1：1。

在第三方面，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C'：C之比率為至少約1.5：1、約2.3：1、約4：1、約5.7：1、約9：1、約19：1、約32.3：1、約49：1或約99：1。

第四方面，LG'為對硝基酚，該鹼性試劑為叔丁基氯化鎂，並且該C'：C之比率為至少約1.5：1、約2.3：1、約4：1、約5.7：1、約9：1、約19：1、約32.3：1、約49：1或約99：1。

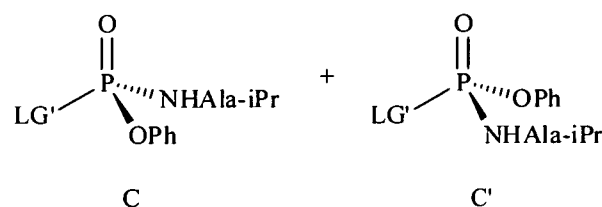
第五方面作為製備 R_P -4係包含：a)將異丙基-丙胺鹽基-胺基磷酸酯(C')與3'-O-受保護的或不受保護的3以及一鹼性試劑反應，以獲得包含受保護的或不受保護的 R_P -4之組成物。



其中Z為保護基或氫；LG'為脫離基；以及b)隨選地將所獲得的受保護或不受保護之 R_P -4進行層析、萃取或結晶反應，以獲得經純化之受保護的或不受保護之 R_P -4。在子具體實施例中，LG'為甲苯磺酸、樟腦磺酸鈉或被以至少一個拉電子基所取代之芳基氧化物；更佳地，LG'為選自對硝基

酚、2,4-二硝基酚以及五氟酚。在另一子具體實施例中，當 R_p-4 為受保護的，即，Z 非為氫時，該第九具體實施例之製程為進一步將受保護之 R_p-4 去保護。在另一子具體實施例中，該反應在極性非質子溶劑中進行，例如，四氫呋喃或另一醚溶劑，其可以單獨一者或與彼此結合，或伴隨 C_2 至 C_7 的腈類，例如乙腈。

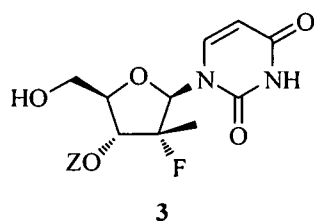
該第十具體實施例的製程進一步包含 1) 使 $(LG')P(O)(LG)_2$ (其中 LG 係為獨立於 LG' 的一脫離基) 與 (i) 異丙基-氫化鋁以及一第一鹼類反應以獲得 $(LG')P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ ，接著使 $(LG')P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ 與苯酚及一第二鹼類反應，以獲得包含 C 與 C' 之混合物；與 (ii) 苯酚與第一鹼類反應，以獲得 $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ ，接著使 $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ 伴隨異丙基-氫化鋁與一第二鹼類反應，以獲得包含 C 與 C' 之混合物；或 (iii) 結合異丙基-氫化鋁、苯酚以及至少一個鹼類，以獲得包含 C 與 C' 之混合物；或 2) 使 $(PhO)P(O)(LG)_2$ (其中 LG' 係為獨立於 LG 的一脫離基) 與 (i) 異丙基-氫化鋁以及一第一鹼類反應以獲得 $(PhO)P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ ，接著使 $(PhO)P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ 伴隨一脫離基先質以及一第二鹼類反應，以獲得包含 C 與 C' 之混合物，



並將該混合物進行層析或將該混合物行結晶作用以獲得C'。在第九具體實施例的一方面，該異丙基-氫化鋁以其鹽酸鹽存在，其中較佳地為實質上無水的。

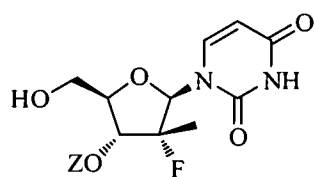
第十一具體實施例係針對經由第七具體實施例、第八具體實施例、第九具體實施例或第十具體實施例以及它們各別的方面所敘述之製程而獲得之組成物。第十一具體實施例的一方面係針對經由下文所揭露之例舉的具體實施例之任一者所獲得之組成物。如此而獲得之組成物可為結晶、晶體般的、非晶質的或上述之結合。

第十二具體實施例係針對化合物3



，其中Z為保護基或氫，其對於製備 R_p -4或 S_p -4為有用的。

第十二具體實施例的第一方面為選自具有下列結構式的化合物



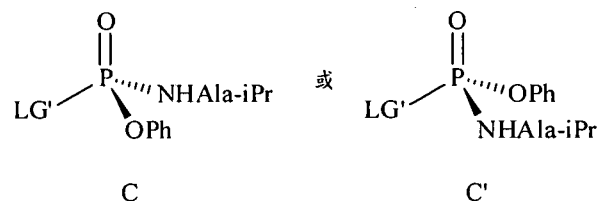
3a: Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃

3b: Z = -C(O)OCH₂Ph

3c: Z = -Si(Me)₂^tBu

3d: Z = -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH

第十三具體實施例係針對一化合物、其鹽類、水合物、溶劑或上述之結合，以下列結構式表示

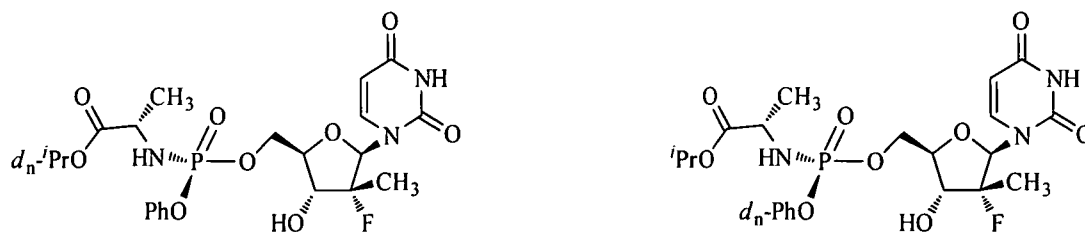


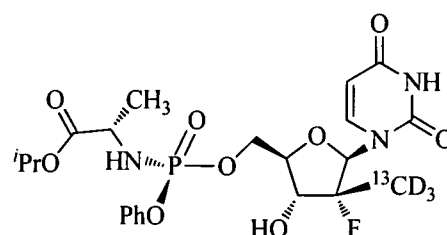
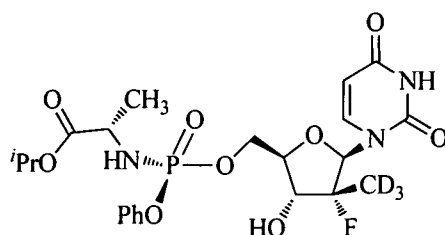
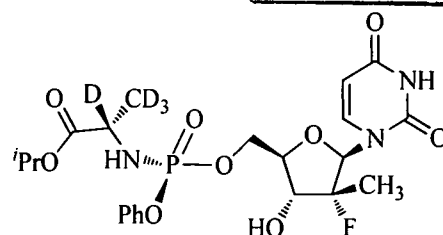
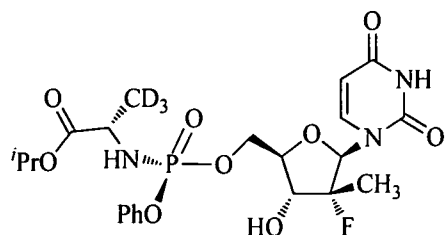
其中LG'為脫離基，其對於製備 R_P-4 或 S_P-4 是有用的。

第十三具體實施例的第一方面，LG'為甲苯磺酸、樟腦磺酸鈉、芳基氧化物，或被以至少一個拉電子基所取代之芳基氧化物。

第十三具體實施例的第二方面，LG'為選自對硝基酚、2,4-二硝基酚以及五氟酚。

第十四具體實施例係針對 R_P-4 或 S_P-4 的同位素標記類似物。該用語「同位素標記」類似物意指 R_P-4 或 S_P-4 的類似物，其為「氘化的類似物」、「 ^{13}C -標記的類似物」或「氘化的/ ^{13}C -標記的類似物」。該用語「氘化的類似物」意指描述於本文之化合物，藉由 ^1H -同位素(即氫(H))被 ^2H -同位素(即氘(D))所取代。氘的取代可為部分的或完全的。部分的氘取代意指至少一個氫被至少一個氘所取代。例如，對 R_P-4 或 S_P-4 ，具有一般技藝之技術人員可考量至少一個下列的部分氘化的類似物(其中「 d_n 」代表n個氘原子，例如，對異丙基而言， $n=1-7$ ，而對於苯基而言， $n=1-5$)，以及描述如下者。





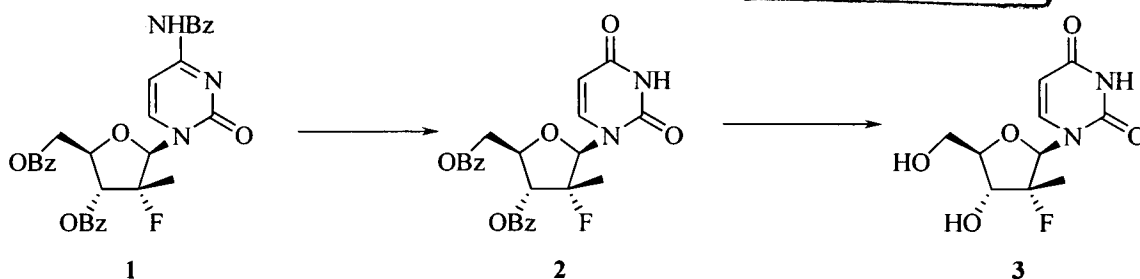
雖然上述之甲基基團所顯示的為完全地氘化，人們將可認出其部分氘化的變化也是可能的，例如 $-\text{CDH}_2$ 以及 $-\text{CD}_2\text{H}$ 。同位素標記於呋喃糖上，並且也考量鹼類。同樣地，該用語「 ^{13}C -標記的類似物」以及「氘化的/ ^{13}C -標記的類似物」意指本文所描述之化合物，藉由碳原子以 ^{13}C -同位素增量，意指增量程度超過了通常的自然充足度約1.1%。

範例

非以範例的方式作限制，下列範例乃作為促進對本揭露內容更佳的理解。

合成方面

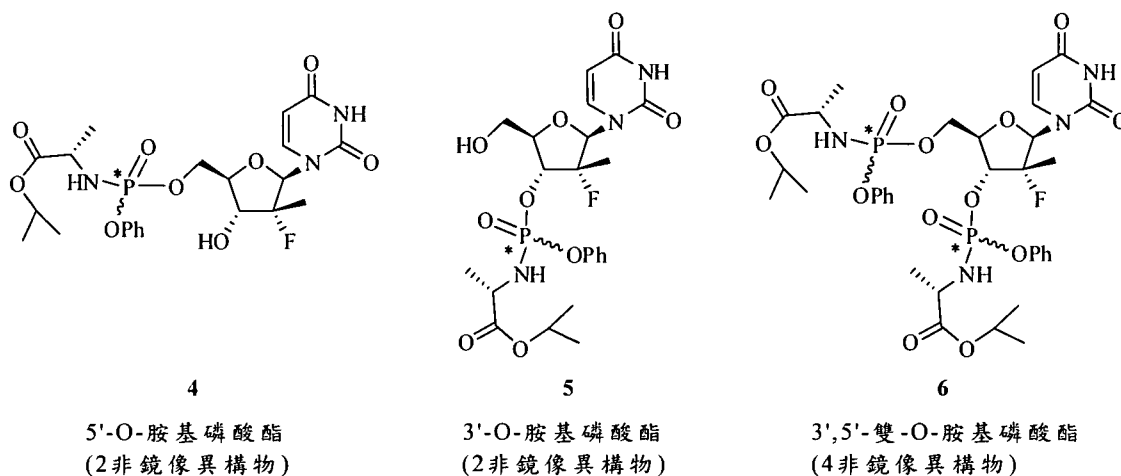
為了製備尿核苷，人們可利用在合成3之特定3',5'-二酯基化類似物(見下文)中進階的三苯甲醯化的胞苷中間產物，該特定的化合物已經以試驗規模有效率地被合成(參見WO 2006/031725或US 2006/0122146，兩者皆全文併入以作為參考)。下列方法被發現為可擴充規模的且花費經濟的。



以揭露於 WO 2006/031725 以及 WO 2008/045419 的方法(兩者皆全部併入本文以作為參考)而獲得 3',5'-O-二苯甲醯基-2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基-N⁴-苯甲醯基胞苷(1)。以 70% 醋酸水溶液處理 1，以生成 3',5'-O-二苯甲醯基-2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基-尿苷(2)。該苯甲醯基酯類也可經由數個方法水解，例如於酒精溶劑中之烷氧化物，例如甲醇中之甲氧化鈉、甲醇中之碳酸鉀或在乙醇的類似物，烷基胺例如甲醇中之甲胺、丁胺等等。甲醇氨被選作為較大規模的工作。從該三苯甲醯化的胞苷(1)，可經由結晶而純化以獲得 70% 產率之該尿苷產物(3)。

幾個文獻的程序詳細說明了使用數倍等值之試劑以製備胺基磷酸酯的不同途徑與條件。例如，可參見 McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 3504-3515 以及 McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7215。對於製程規模的工作，目前僅有一個已知的範例，其揭露於 Lehsten et al., *Org. Process Res. Dev.* 2002, 6, 819-822("Lehsten")。在此參考文獻中，作者們介紹「一鍋化程序」的概念，其中胺基酸鹽酸鹽以及苯基二氯磷酸鹽與在二氯甲烷中的 N-甲基咪唑共同反應。稍後加入該核苷以生成所需之 5'-O-胺基磷酸酯產物，其在目前的案例將生成由結構式 4 所表示之化合物。不

幸地，該Lehsten程序遭遇了弊端。舉例來說，所述Lehsten的程序利用遠多於所需的過量之試劑，其增加了花費並且增加層析純化的困難度。此外，相較於參考文獻透過使用較低的溫度以及緩慢加入該核苷，Lehsten建議人們可於5'-羥基至3'-羥基控制該反應的選擇性。



針對本文中所揭露之化合物使用Lehsten之程序，提供了約1-5%單一取代的3'-O-胺基磷酸酯非鏡像異構物(5)以及約10-30%之雙取代產物(6)。由於3'-非鏡像異構物的極性和所需之5'-非鏡像異構物(4)非常相似，層析分離非常具挑戰性。擴增該程序而不丟棄大部分之較低極性之5'-非鏡像異構物(4)或不接受較高程度的3'-非鏡像異構物(5)的污染是幾乎不可能的。在起始的50g擴增中，所生成的產物包含約3%的3'-非鏡像異構物(5)污染，其伴隨極性較低之5'-非鏡像異構物(4)共同沖提出來。

本文所揭露之反應條件使用較少量試劑，以及以較簡易的層析分離法選擇性移除該不純之3'-O-胺基磷酸酯非鏡像異構物(5)，從而提供所需之更高純度的5'-O-胺基磷酸酯

非鏡像異構物(4)。

對於試劑的化學計量學，有研究報導，其系統性地改變試劑之化學計量學並以作為Lehsten粗反應之磷核磁共振(phosphorus NMR)監控該結果。在更成功的運作中，將該所需產物分離的產率及純度作比較。觀察到該一級5'-羥基以較該二級3'-羥基更快的速率反應。這創造了在消耗所有起始核苷的反應過程與將5'-和3'-單一取代的產物(4和5)轉變成該5',3'-雙取代產物(6)競爭的情況。該3'-單一取代的產物以較該5'-單一取代的產物為快的速率轉變成該雙取代產物，因而可能經由更促使該反應生成雙取代之產物以降低該3'-非鏡像異構物污染程度。然而，伴隨一有效率的方式以去除該3'-非鏡像異構物，該反應可被優化而不需犧牲如此多的轉變為雙取代產物(6)之5'-非鏡像異構物以產出更多所需的5'-非鏡像異構物。亦觀察到該胺基酸鹽酸鹽為非常吸著水分的。由於任何水分的存在將消耗等量的苯基二氯磷酸鹽試劑，務必留意保持該胺基酸為實質上無水或應該在使用前使其實質上為無水的。簡言之，Lehsten曾報導了胺基酸對苯基二氯磷酸鹽對核苷之理想比率分別為3.5：2.5：1。發現該胺基酸對苯基二氯磷酸鹽對核苷之理想比率，在該3'-非鏡像異構物可被有效率的移除並且當該胺基酸鹽酸鹽為實質上無水的情況時，約1.6比約1.3比約1為最理想的。經由使用較小量的試劑，理解到花費的節省聯結了由試劑副產物以及由減少程度之雙非鏡像異構物中將所需產物層析分離的簡化。

在一替代的程序中，於兩步驟使用叔丁基二甲基矽基阻隔基來製備3之3'-羥基阻隔的衍生物。接著其被轉變為其5'-胺基磷酸酯衍生物。所需的為該矽烷基團可接著被移除並將不會有3'異構物(5)或3',5'-雙胺基磷酸酯(6)。相似的做法經由Borch以及Fries(美國專利號5,233,031)於烷基胺基磷酸酯以低總產率而被驗證。

另一個替代的做法為使用直接合成然後使用化學方法以幫助自所需之5'-非鏡像異構物4中區分該3'-非鏡像異構物之不純物5而幫助其分離。需要一基團選擇性地與3'-O-胺基磷酸酯不純物5的自由一級羥基反應至該所需的5'-O-胺基磷酸酯4之自由二級羥基。也需要該阻隔基顯著地自該所需之5'-O-胺基磷酸酯4改變所生成之被5'-O-阻隔的3'-O-胺基磷酸酯產物之極性。由於所需之5'-非鏡像異構物4不會被改變，將不需要另外的步驟來去除該阻隔基。該化學上被改變之3'-非鏡像異構物接著將使層析分離或經由特殊清除支撐或經由萃取的分離更加容易。

具體來說，該阻隔基叔丁基二甲基矽基(Tbdms)符合這些標準，且為第一個被證明且接著被使用於數公斤規模者。在特定的條件下，例如在吡啶作為溶劑和鹼類時，該tBDMS基團高選擇性地於該一級羥基位置反應至3'二級羥基位置。該胺基磷酸酯反應使用N-甲基咪唑(NMI)為鹼類。在NMI的存在下，該矽化為較不具選擇性的。較佳地，NMI的量應減少。這可在該胺基磷酸酯反應之後藉由以1N鹽酸沖洗該反應溶液而很容易地被達成。該NMI以及剩餘的起

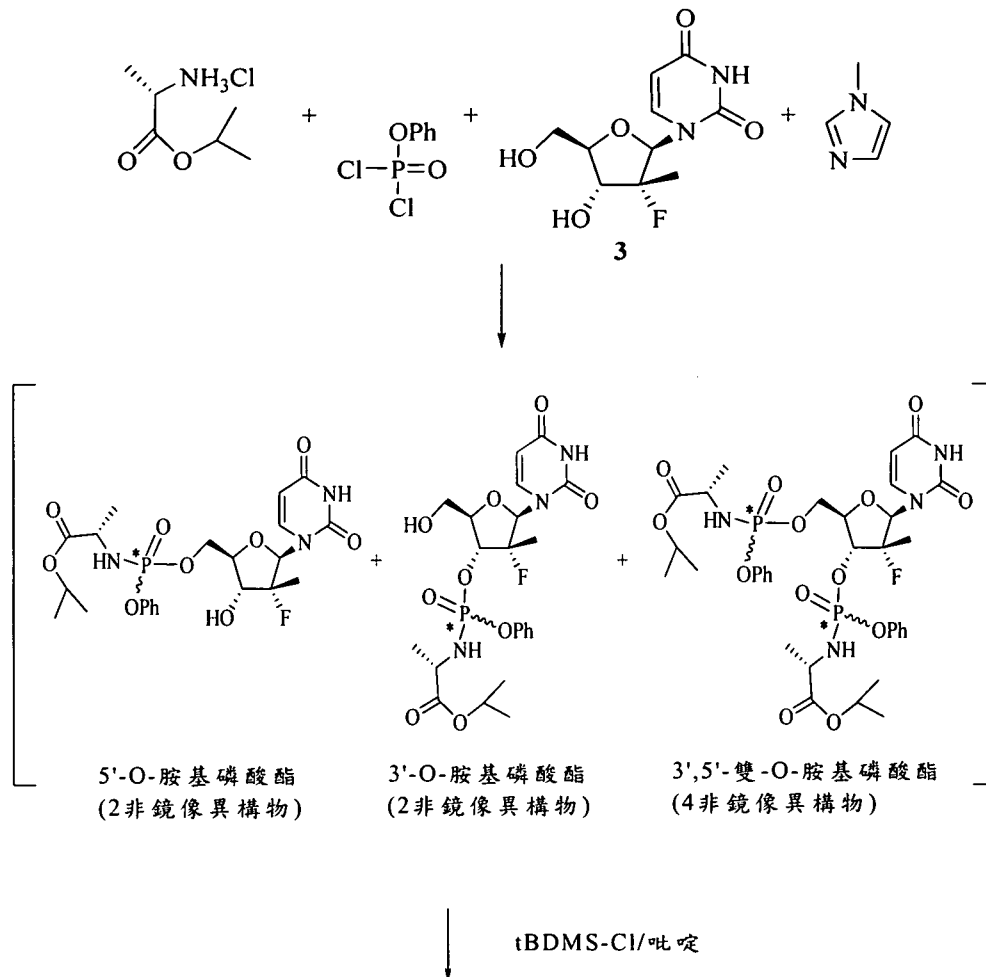
始核苷被移除，留下單一及雙取代產物與試劑副產物之粗混合物。接著將其溶解於吡啶並且以叔丁基二甲基矽基氯處理。該3'-單一取代之產物5在數小時(或更短)內被轉變成該5'-O-tBDMS-3'-O-胺基磷酸酯7。該實驗過程可以HPLC來監控。此矽化之產物7之極性小於該雙-胺基磷酸酯6並且很容易以層析法去除。使用這個方法，不用矽基處理而降低3'-單一胺基磷酸酯5至少於5'-產物4之0.1%(相較於1-3%)是可能的。相似地，於相同條件下以二甲氧基三苯甲基氯(DMT-Cl)處理也可以做得同樣好。經由TLC，當含有染上亮橘色之分子的DMT於加熱或曝露於酸類時，辨識該DMT反應產物亦較為容易。如上所述，人們也可設想許多其他的阻隔基。

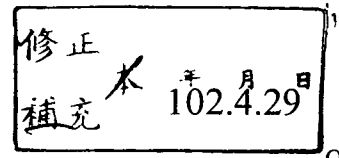
所述反應條件和消除該3'-不純物兩者為普遍的方法，並且可以應用至大部分具有自由的3'羥基的核苷胺基磷酸酯。該胺基磷酸酯基元可為任何胺基酸酯和芳香醇的結合。該核苷基元可以為任何核苷，其5'胺基磷酸酯將導致5'-單磷酸並且可進一步被代謝為5'-三磷酸的形式。

下面的方案為主要的反應方案，以圖例說明製造2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷之異丙基L-氫化鋁苯基胺基磷酸酯，伴隨該主要產物為所需之5'-O-胺基磷酸酯(4，兩個非鏡像異構物)以及較少的產物為3'-O-胺基磷酸酯(5，兩個非鏡像異構物)以及3',5'-雙-O-胺基磷酸酯(6，四個非鏡像異構物)。根據製備段落所描述之方法中的化學計量比率加入該試劑。讓該反應進行直到當於薄層層析法(TLC)由UV可視

第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

化判定仍剩餘約5% 的起始物質。於UPLC/MS亦顯示相較於所需之5'-產物，約略有10%之3',5'雙-胺基磷酸酯6生成。在平息以及酸性溶液作用之後，準備來自有機層之該粗殘餘物以行矽化作用。在所描述之反應條件下，該矽基基團優先與3'-O-胺基磷酸酯之自由5'-羥基反應以生成7。繼續該反應直到再也無法經由UPLC/MS偵測到該3'-O-胺基磷酸酯。





54

減壓下濃縮，以提供該粗產物(216g)。將該粗產物伴隨醋酸乙酯(325mL)於室溫攪拌3小時。經由過濾收集該生成的固體並以醋酸乙酯(216mL)沖洗。在真空下於室溫乾燥該固體物4小時，以提供於HPLC純度98.7%之160g(78%)的所需產物。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 11.44 (br s, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, C-6H), 5.97 (d, 1H, C-1'H), 5.64 (d, 1H, C-5H), 3.84-3.77 (m, 3H, C-5'-Ha, C-3'H, C-4'H), 3.63-3.60 (m, 1H, C5'-Hb), 1.23 (d, 3H, C-2'-CH₃). ES-MS M-1 259。

範例2. 製備(S)-2-{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氫-2H-嘓啶-1-基)-4-(R)-氟-3-羥基-4-甲基-四氫-呋喃-2-基甲氧基]-苯氧基-磷醯胺基}-丙酸異丙酯(4)

別名：5'-O-(異丙基-L-氫化鋁，苯基磷醯胺基)-2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基-尿苷非鏡像異構物混合物。

將一個5 L的三頸燒瓶安裝以機械攪拌子、鹽水冰浴、內部溫度計以及氮氣環境。將燒瓶裝入L-丙胺酸異丙酯鹽酸鹽(82.0g, 0.490moles)以及無水二氯甲烷(0.80L)。當其在攪拌時，加入一批苯基二氯磷酸鹽(85.0g, 0.40moles)並且攪拌。並且維持內部溫度介於-5至5℃，在半小時內的期間加入在二氯甲烷(250mL)中之N-甲基咪唑(NMI, 250g, 3.07moles)的一溶液。讓該溶液於此溫度範圍攪拌1小時。於0℃分批加入2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基-尿苷(3, 80.0g, 0.307moles)並接著讓該燒瓶在鹽水浴中緩慢加溫。於1小時，該內部溫度升至-2℃。於1小時之TLC(在DCM中之5%甲醇)顯示了多於50%之核苷被消耗。將該浴移除並且該反

應燒瓶於超過1小時達到室溫。於3和5小時後之TLC總共展現了95%之起始核苷被消耗。經由加入甲醇(100mL)以平息該反應混合物並且攪拌該反應5分鐘。

該反應混合物以1N HCl(2×500mL)接著以飽和碳酸氫鈉溶液(2×500mL)沖洗。經由無水硫酸鈉(50g)乾燥該分離的有機層並且過濾之。在減壓的條件下蒸發該溶液，然後於高度真空下至乾燥，以提供為一黏性油狀之粗產物(170g)。取得該粗產物的NMRs(^{31}P 以及 ^1H)。該 ^{31}P -NMR指示全部磷積成的約1%係由於該3'異構物**5**之存在。

將無水吡啶(1700mL)加至該粗產物中。於減壓的情況下蒸發該溶劑，然後於高度真空下經由共同蒸發而減少該粗混合物中之水含量。將該生成之油狀物重新溶解於無水吡啶(500mL)中，然後加入過量之叔丁基二甲基矽基氯(9.0g, 60mM)。於室溫下攪拌該反應。以UPLC/MS監控反應過程。在3小時後，該3'不純物**5**可再也不被偵測到，且該反應經由加入甲醇(50mL)而被平息。

該反應於減壓的情況下蒸發成一油狀物。將該殘餘物溶解於醋酸乙酯(1.5L)並以1N HCl(2×500mL)接著以飽和碳酸氫鈉溶液(2×500mL)沖洗。經由無水硫酸鈉(50g)乾燥其有機層，過濾並於減壓的情況下蒸發，以提供為一淡黃色油狀之粗產物。

以相同體積之二氯甲烷稀釋該粗油狀物，並於氣壓100psi裝上在輻射壓縮模組中之2.5Kg矽膠匣。於60psi使用一梯度泵且流速為400mL/min，以二氯甲烷(4L)接著以在二

氯甲烷中1-4%梯度之甲醇(48L)沖洗該匣。該主要不純物(二-(異丙基丙胺鹽)苯基磷酸鹽、3',5'-雙胺基磷酸酯(6), 3'-胺基磷酸酯-5'-TBDMS加合物(7))的大部分以~3%之梯度沖提。該所需之產物於3和4%之間的甲醇被沖提出。該包含多個組分之產物被分成兩批。第一批包含小量的上層雜質，且其後為純產物。第一組組分包含小量的極性較低之雜質(上層雜質)，例如該3',5'-雙胺基磷酸酯和二-丙胺鹽苯基磷酸鹽與大部分為 R_p 非鏡像異構物，並且需要第二次的管柱純化。(相對之用語，上層對下層意指於正常相矽膠管柱之沖提，其中該「上層異構物」意指第一個沖提出之異構物。)第二組組分不具有顯著量的雜質—僅為剩餘之 R_p 且大部分為 S_p 非鏡像異構物。稍後合併兩次管柱之組分。於減壓的情況下蒸發該溶劑，並且進一步乾燥(0.20mmHg)該生成之白色泡沫狀物1小時，以提供不純的一批42 g(基於 ^{31}P -NMR之4：1上層對下層異構物)與純的一批38g(1：3上層對下層異構物)。將不純的該批以類似方式再通過管柱，以提供4：1的比率的3.8g、97%純度之上層異構物(預留之組分)與36g之純產物。將該兩個主要批溶解於DCM中，合併、於減壓的情況下蒸發並乾燥(50°C，0.2mmHg，24小時)，以得到非鏡像異構物比率48：51之74g(45.7%)、為一白色泡沫狀之純產物4，熔點約75-85°C。

為了生成該非鏡像異構物混合物之非晶質固體，將74g的白色泡沫狀物伴隨叔丁基甲基醚(750mL)攪拌，生成部分溶液與黏性固體殘餘物。當攪拌時，緩慢加入庚烷(750mL)

並且機械性地攪拌該懸浮液1小時，直到大部分黏狀物質轉變為一白色固體物。將該固體物以刮刀刮下，並過濾生成的泥漿。以庚烷(4×50mL)沖洗該固體物，並在真空的情況下(50°C, 0.2mmHg, 24小時)乾燥，以提供一具寬熔點範圍ca 70-80°C之白色非晶質粉末(64g)。¹H以及³¹P NMR符合結構，且HPLC展示99.8%的純度，伴隨非鏡像異構物比率46:54(亦經由³¹P NMR確認)。

製造4之固體混合物的替代方法。在層析之後，該殘餘物伴隨二氯甲烷共同蒸發兩次(5mL/g)並於35-40°C、35-45mTorr下乾燥24小時。將該泡沫殘渣通過250 微米的屏幕篩選並且進一步在同樣的條件下乾燥，直到當以頂空氣相層析測量該殘餘的二氯甲烷降至低於400ppm。該生成之細緻灰白色至白色非晶質粉末具有53.7至63.5°C玻璃轉換溫度範圍。

該異構物(4)的混合物之特徵：¹H-NMR (CDCl₃) 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, 芳香的), 7.23-7.14 (m, 6H, R_P/S_P, 芳香的), 6.18 (br d, 2H, C1'-H, R_P/S_P), 5.63 (d, 1H, C5-H, S_P), 5.58 (d, 1H, C5-H, R_P), 5.01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂, R_P/S_P), 4.46-4.33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, R_P/S_P), 4.12 (m, 2 H, ala-CH-CH₃, R_P/S_P), 4.01-3.85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, R_P/S_P), 1.39-1.22 (m, 12H, 所有的CH₃, R_P/S_P)。

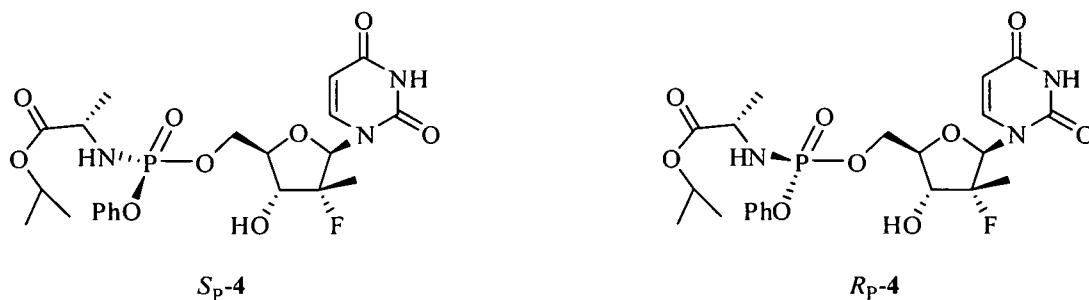
³¹P-NMR (CDCl₃) δ 3.60 (R_P), 3.20 S_P相對於三苯基磷

酸鹽在 -17.80 ppm。ES-MS $M+1$ 530.2。元素分析：計算之 % (包括 0.29% 之水，如同 Karl Fisher 分析所發現的) C, 49.75; H, 5.54; N, 7.90, F, 3.58, P, 5.84。發現 %: C, 49.50; H, 5.44; N, 7.85; F, 3.62; P, 6.05。

異構物分離之討論

由於在磷上之對掌性，化合物 **4** 由兩個非鏡像異構物組成，其被標示為 S_P -**4** 和 R_P -**4**。根據 S_P -**4** 的單晶 X 光分析而做出立體化學的分配。 R_P -**4** 和 S_P -**4** 兩者皆生成結晶產物。

結晶作用的程序概述如下。



範例 3. R_P -**4** 異構物之結晶作用。將包含第一次沖提、較低極性之 R_P -**4** 異構物之層析組分 (3.8g，純度 97%) 溶解於異丙醇 (36g) 中，並且以庚烷稀釋直到呈混濁狀 (72g)。將該溶液種晶並於室溫下攪拌 5 小時。經由真空過濾收集該生成之固體，以庚烷 (2×20 mL) 沖洗並乾燥 (50°C, 0.2mm, 24 小時) 成 2.3g、熔點 136.2-137.8°C、非常小的白色針狀物。該生成物質之 HPLC 純度發現為 99.02%。

R_P -**4**: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.10 (br s, 1H, NH), 7.36 (m, 2H, *o*-芳香的), 7.26-7.16 (m, 4 H, C6-H, *m,p*-芳香的), 6.16 (br d, 1H, C1'-H), 5.58 (d, 1H, C5-H), 5.01 (sept, 1H, CH-(CH₃)₂), 4.52-4.47 (m, 2H, C-5'-H₂), 4.10 (d, 1H, C3'-H),

4.02-3.76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃),
1.37-1.20 (m, 12H, 所有的CH₃)。

範例4. S_P-4之製備與結晶作用

方法1: 由粗製之4直接沉澱: 將二氯苯基磷酸鹽(7.5mL, 50mmol)於室溫加入在二氯甲烷(100mL)中之L-丙胺酸異丙酯鹽酸鹽(10.5g, 61.5mmol, 每次以50mL甲苯共沸乾燥共兩次)。將該混合物冷卻至-10°C, 並再於30分鐘內加入在30mL二氯甲烷中之NMI溶液(30.5mL, 384.3mmol)。在加完之後, 於介於-10以及-15°C下攪拌該混合物1小時。於上述混合物中加入一批量的2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(3)(10g, 38.4mmol)並且於低於-10°C攪拌該混合物3小時, 並再緩慢讓其加溫至20°C(6小時)。於此溫度攪拌該混合物過夜(15小時), 然後以10 mL甲醇平息。蒸發該溶劑並將該殘餘物再溶解於EtOAc(200mL)。以水(100mL)、1N HCl(3×75mL)、2% NaHCO₃水溶液(50mL)和鹽水(50mL)沖洗該EtOAc層。經由Na₂SO₄乾燥該有機層, 過濾並濃縮。於高度真空的情況下乾燥該殘餘物2小時, 以提供白色泡沫物(22g)。

將上述的泡沫物溶解於33mL之DCM中, 然後加入65 mL之IPE(異丙醚)以生成飽和溶液。透過小的矽藻土墊過濾該溶液, 並於室溫(約22°C-注意將懸浮液冷卻至0°C導致該粗產物出油)以S_P-4種晶攪拌該過濾物72小時。過濾該白色固體物, 以IPE(20mL)沖洗並乾燥以提供4.58g(如³¹P NMR所測定的, 分別為~85:15之S_P-4:R_P-4混合物)的白色粉末。將上述固體物懸浮於23 mL的 DCM中並接著回流3小時。

將該混合物冷卻至室溫並攪拌15小時。過濾該白色固體，以4.5mL之冷DCM沖洗並於45°C之高度真空下乾燥，以提供純的 S_p -4，熔點93.9-104.7°C，HPLC純度99.74% (3.11g，15.2%自該尿核苷)。

S_p -4 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.63 (br s, 1H, NH), 7.47 (d, 1H, C6-H), 7.30 (m, 2H, *o*-芳香的), 7.26-7.18 (m, 3H, *m,p*-芳香的), 6.18 (br d, 1H, C1'-H), 5.70 (d, 1H, C5-H), 5.02 (sept, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 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, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$)。

方法2：自粗製之4出油：將苯基二氯磷酸鹽(14.9 mL, 100mmol)於室溫下加入在二氯甲烷(200mL)中之L-丙胺酸異丙酯鹽酸鹽(20.6g, 123mmol，每次以75mL甲苯共沸乾燥共兩次)的一攪拌溶液中。將該混合物冷卻至-10°C然後於30分鐘內加入在60mL二氯甲烷中之NMI溶液(61.3mL, 769mmol)。在加完之後，於介於-10以及-15°C下攪拌該混合物1小時。於上述混合物中加入一批量的2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(3)(20g, 76.9mmol)並且於低於-10°C攪拌該混合物3小時，然後緩慢讓其加溫至20°C(6小時)。於此溫度攪拌該混合物過夜(15小時)並再以10mL甲醇平息。蒸發該溶劑並將該殘餘物再溶解於EtOAc(400mL)。以水(200mL)、1N HCl(3×100mL)、2% NaHCO₃水溶液(100mL)和鹽水(50mL)沖洗該EtOAc層。經由Na₂SO₄乾燥該有機

層，過濾並濃縮。於高度真空的情況下乾燥該殘餘物2小時，以提供白色泡沫物(43g)。將上述的泡沫物溶解於裝有機械攪拌子的二頸圓底燒瓶中的86mL EtOAc中。當攪拌時，緩慢加入100mL的庚烷並攪拌該懸浮液1小時。傾析上層液並將該殘餘物伴隨50mL之2:3 EtOAc/庚烷再度攪拌10分鐘，然後傾析。於高度真空的情況下乾燥該殘餘物以提供白色泡沫狀物(31g)。

將上述的泡沫物溶解於46mL之DCM中，並接著加入95mL之IPE以生成飽和溶液。透過小的矽藻土墊過濾該溶液，並於室溫以 S_p -4種晶攪拌該過濾物72小時。過濾該白色固體物，以IPE(30mL)沖洗並乾燥以提供7.33g(如 ^{31}P NMR所測定的，分別為~85:15之 S_p -4: R_p -4混合物)的白色粉末。將上述固體物懸浮於36mL的DCM中並接著回流3小時。將該混合物冷卻至室溫並攪拌15小時。過濾該白色固體，以7.5mL之冷DCM沖洗並於45°C之高度真空下乾燥，以提供>99%純度的 S_p -4(4.78g, 11.6%自該尿核苷)。

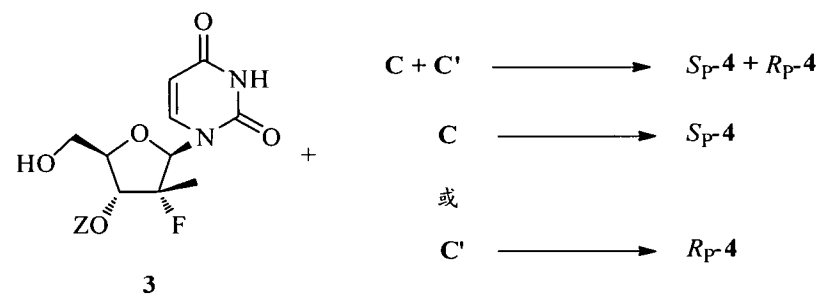
方法3：粗製之4的矽膠裝載：以如同非鏡像異構物之混合物的同樣方式，恰於管柱層析步驟之前，以約略2.5g之2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(3)為起始，生產5.0g之粗製之4。將該粗製物溶於10mL之DCM中並加入10g矽膠至該溶液中。蒸發該溶劑以生成無水泥漿。將該泥漿伴隨40mL之50% EtOAc/己烷攪拌15分鐘然後過濾。以額外的10mL之50% EtOAc/己烷沖洗該矽膠。然後以15% MeOH/DCM (100mL)沖洗該矽膠並分開收集。蒸發該溶劑並於高度真空

下乾燥，以提供4.0g之殘餘物(泡沫)。將該殘餘物溶解於DCM(6mL)中並接著加入~9mL之IPE以製成飽和溶液。然後於室溫下將該混合物伴隨 S_P -4晶種溫和攪拌過夜。過濾該白色固體物並且以IPE(5mL)沖洗，以提供1.28g之產物。 ^{31}P NMR顯示上述產物包含了分別為77：23的 S_P -4： R_P -4混合物。將此從20mL之DCM再結晶以獲得0.75g、純度>99%之 S_P -4(12%自該尿核苷)。此 S_P -4之製備不需矽化的步驟來完成混合物，因此整個反應程序如上述所示。 S_P -4的單晶以及多態形式之方面如下所示。

方法4：將40.0g、1：1之4的混合物溶解於90mL的二氯甲烷中。將二異丙基醚(70mL)加入上述溶液以提供一飽和溶液。(二異丙基醚的量可根據產物的純度而變化。)將該溶液以純 S_P -4(>99%)種晶並且將該混合物於室溫以一攪拌棒溫和攪拌20小時(在2小時後觀察到固體生成)。過濾該固體，以40mL二異丙基醚/二氯甲烷(1：1)之混合物沖洗，並乾燥以提供白色固體物(16.6g，以NMR純度89.35%之 S_P -4)。將該固體物懸浮於83mL之二氯甲烷並回流3小時。將該懸浮液冷卻至室溫並攪拌過夜。過濾該固體物並以10mL之冷DCM沖洗。於真空下乾燥該固體物以提供 S_P -4 (13.1 g，由HPLC純度99.48 %)。於熱的條件下將11g的此固體物重新溶解於330mL之DCM中。將該溶液冷卻至室溫並留於此溫度過夜。過濾該結晶產物並乾燥以提供10.5g之 S_P -4(由HPLC 99.74%)。

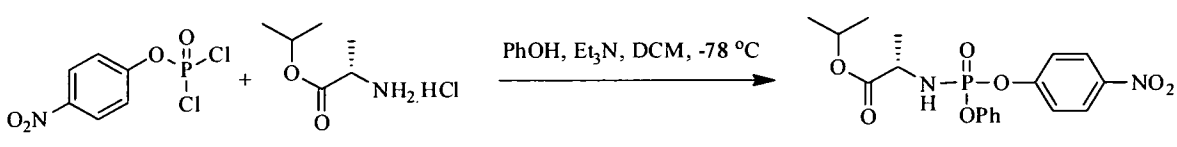
化合物 S_P -4以及 R_P -4可替代地被製備，根據第九或第十

具體實施例，經由將核苷(受保護的或未受保護的)3伴隨異丙基-丙胺鹽基-胺基磷酸酯(C和C'的混合物、C或C')，如下列方程式所示。



P.D. Howes et al. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2003, Vol. 22, Nos. 5-8, pp. 687-689 ("Howes")揭露經由與叔丁基氯化鎂反應而獲得之2'-和5'-胺基磷酸酯。此處，Howes揭露了當3'-去氧-胞核苷與(S)-2-[氯-苯氧基-磷鹽胺基]丙酸甲酯反應，該反應於1.2等效之叔丁基氯化鎂存在下，於2'-位置發生選擇性的磷酸化作用，但伴隨額外的等效叔丁基氯化鎂時，則於5'-位置發生選擇性的磷酸化作用。此揭露內容應與揭露於方案1者作對照。

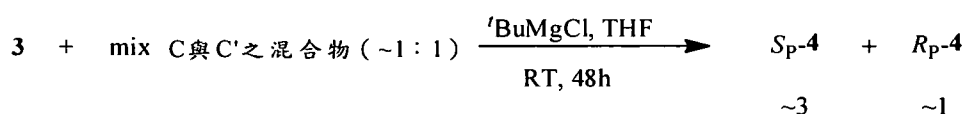
範例5-1.(S)-2-[(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷鹽胺基]丙酸異丙酯的製備



將在二氯甲烷(100mL)中之苯酚和三乙胺(7.7mL, 55mmol)之一溶液，在-78℃於20分鐘內加入在二氯甲烷(100mL)中之4-硝基苯基二氯磷酸酯(12.8g, 50mmol)的一攪拌溶液中。將該混合物於此溫度攪拌30分鐘，然後於0℃移至另一個含有於二氯甲烷(100mL)中之L-丙胺酸異丙酯鹽

酸鹽 (8.38g, 50mmol) 之圓底燒瓶中。將第二批三乙胺 (14.6mL, 105mmol) 於 15 分鐘內加入該混合物中。將該混合物於 0°C 攪拌 1 小時，然後蒸發該溶劑。將該殘餘物伴隨醋酸乙酯 (150mL) 研碎然後將白色固體物過濾除去。於減壓的情況下濃縮該過濾物以提供淡黃色油狀物。將該粗化合物使用梯度 0-20% 之醋酸乙酯/己烷層析，以提供比率為約 1:1 的非鏡像異構物混合物之產物 (17g, 產率 83%)。 ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0.31, -0.47; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.31-8.27 (m, 2H), 7.51-7.37(m, 4H), 7.27-7.19(m, 3H), 6.70-6.63(m, 1H), 4.85-4.78(m, 1H), 3.97-3.86(m, 1H), 1.21-1.19(m, 3H), 1.11-1.09 (m, 6H); MS (ESI) *m/z* 407 (M-1)⁺. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -2.05, -2.10; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (d, J=9.2Hz, 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 = 6.8Hz, 3H), 1.22 (dd, J = 6.2 & 3.0Hz, 6H); MS (ESI) *m/z* 407 (M-1)⁺。

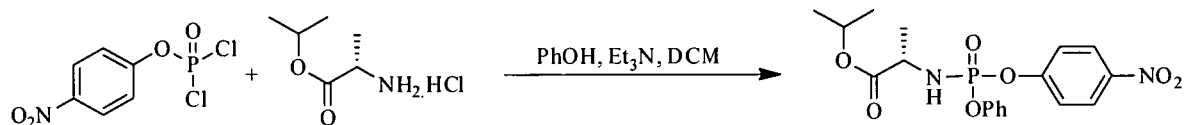
範例 5-2. S_P-4/R_P-4 之製備



將 1.0M 的叔丁基氯化鎂 (1.05mL, 1.05mmol, 2.1 等效) 溶液在室溫下於 5 分鐘內加入在無水 THF (1.5mL) 中之 1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基)-1H-嘓啶-2,4-二酮 (130mg, 0.5mmol) 的一攪拌溶液

中。在30分鐘後，將在THF(1.5mL)中之(S)-2-[(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基] 丙酸異丙酯(1：1異構物混合物，408mg，1mmol)的一溶液於5分鐘內逐滴加入。使該混合物於室溫攪拌48小時，然後以飽和NH₄Cl水溶液(20ml)平息。將該混合物於醋酸乙酯(50mL)與水(20mL)之間分層。將結合的有機萃取物經由無水硫酸鈉乾燥，過濾並於減壓的情況下濃縮，以提供淡黃色之殘餘物。該殘餘物使用梯度0-2%之MeOH/二氯甲烷之管柱層析提供一白色泡沫狀之固體物(125mg，產率47%，比率為約3.05：1.0的*S_P-4/R_P-4*混合物)。

範例6.(S)-2-[(S)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯之製備與非層析分離



將L-丙胺酸異丙酯鹽酸鹽(330g, 1.97mol)於減壓的情況下、經由伴隨甲苯(2×400mL)共同蒸發而預先乾燥，並接著於真空爐(50°C, 0.2mmHg, 17小時)乾燥。將在二氯甲烷(900mL)中之苯酚(183.8g, 1.953mol)和三乙胺(300mL, 2.15mol)的一溶液於-60°C內部溫度、於3小時內加入在無水二氯甲烷(3.0L)中之4-硝基苯基二氯磷酸酯(500.0g, 1.953mol)的一攪拌溶液。於此溫度下攪拌該混合物額外的30分鐘，並接著於2.5小時內使其升溫至-5°C。於氮氣環境、-5~0°C、10分鐘內加入該預乾燥之胺基酸酯類。將在額外的燒瓶中之該胺基酯鹽類之殘餘物藉由二氯甲烷(2×100mL)的淋洗而移至該反應的混合物中。於0°C攪拌該混合物40分

第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

鐘，並在一段40分鐘的時間內加入第二批的三乙胺(571mL, 4.10mol)。於0~10°C攪拌該混合物3小時，然後將白色固體物(三乙胺鹽酸鹽)過濾去除，並以二氯甲烷(3×300mL)淋洗。於減壓的情況下濃縮該過濾物並將該殘餘物伴隨甲基叔丁基醚(MTBE, 4L)研碎。將該因而形成之額外固體鹽類過濾去除並以MTBE(3×150mL)淋洗。於減壓的情況下濃縮該過濾物以提供澄清淡棕色油狀物。將該殘餘物伴隨己烷(2×140mL)共同蒸發，以去除任何殘餘之MTBE並且進一步於40°C真空下乾燥2小時。將該乾燥之殘餘物與二異丙基醚(IPE, 1.1L)混合，並於5°C之冰水浴中攪拌。將產物中所需的 S_p -異構物之小量晶種加入該溶液並於5°C攪拌該混合物超過22小時，以生成中等厚度之泥漿。使其處於冷凍庫(-10°C)中44小時。藉由過濾收集該沉澱之產物並以預冷之IPE和己烷之混合溶劑(1:1, 3×190mL)淋洗。於室溫真空下(0.5mmHg)乾燥該固體直到得到一恆定重量，以提供為一白色粉末之固體227.23 g(產率: 28.5%)。根據 ^{31}P NMR(162 MHz, DMSO- d_6 , δ -0.31 (S_p), -0.47)，該二個非鏡像異構物 S_p : R_p 之比率為9.65/1。將該產物經由溶解於IPE(840mL)同時加熱於60°C水浴而再結晶。於室溫攪拌上述溶液1小時，然後加入小量之晶體 S_p 異構物之種晶。白色粉末固體於2小時內生成，並將該燒瓶儲存於冷凍庫(-10°C)中16小時。將獲得之白色且細緻的結晶固體過濾，以預冷之IPE(3×50mL)沖洗，並於真空下(室溫, 0.5mmHg)乾燥至恆定的重量，以提供白色蓬鬆之固體(177.7g，根據 S_p 異構物

第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

之理論產率，總產率22%或44%)，伴隨根據³¹P-NMR非鏡像異構物比率48/1。熔點62-66°C。

³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d6): δ -0.31; **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d6):** δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.49(d, J=8.8Hz, 2H), 7.41-7.37(m, 2H), 7.23-7.19 (m, 3H), 6.66 (dd, J=13.6, 10.0Hz, 1H), 4.86-4.78 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.19 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.10(d, J=6.4Hz, 6H) ;

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -2.05; (162 MHz, DMSO-d6): δ -0.31; **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 8.22 (d, J=9.2Hz, 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=6.8Hz, 3H), 1.22 (dd, J=6.2 & 3.0Hz, 6H); **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d6):** δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.49(d, J=8.8Hz, 2H), 7.41-7.37(m, 2H), 7.23-7.19 (m, 3H), 6.66 (dd, J=13.6, 10.0Hz, 1H), 4.86-4.78 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.19 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.10(d, J=6.4Hz, 6H)

MS (ESI) m/z 407 (M-1)⁺。

8(*S_p*-異構物)的立體化學已經由單晶X-射線結晶學確認，參見下文所提供之詳情。

範例7.經由SFC分離非鏡像異構物混合物(S)-2-[(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯

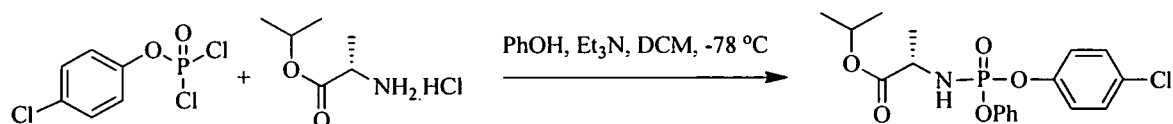
將以*R_p*-異構物擴增之非鏡像異構物之混合物的樣品(4.8g)使用一ChiralPak AD-H(2×15cm)管柱行SFC，並且於100bar以在二氧化碳中之35%異丙醇沖提。使用於濃度為

第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

17mg/mL之甲醇之4mL樣品的注射裝載。該 R_P -異構物[(S)-2-[(R)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯]首先被沖提出。合併多次操作之合適的組分並且於減壓的情況下濃縮，以提供為淺黃色黏稠油狀、2.9g之 R_P -異構物[(S)-2-[(R)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯]，以及提供為白色固體、1.9g之 S_P -異構物[(S)-2-[(S)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯]。 R_P -異構物之分析數據為與經由上述結晶方法分離之產物相似。

(S)-2-[(R)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯 (8, R_P -異構物)之分析數據： ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.47; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.46-7.38 (m, 4H), 7.27-7.20 (m, 3H), 6.68 (dd, $J=13.8$, 10.2Hz, 1H), 4.86-4.77 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.20 (d, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.10(dd, $J=6.2$, 2.2Hz, 6H); **MS (ESI) m/z** 407 ($M-1$) $^+$ 。

範例8-1.外消旋2-[(4-氯-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯(±)之製備：



將在二氯甲烷(20mL)中之苯酚(0.94g, 10mmol)和三乙胺(1.56mL, 11mmol)的一溶液於-78 $^{\circ}\text{C}$ 、20分鐘內加入在二氯甲烷(20mL)中之4-氯-苯基二氯磷酸酯(2.45g, 10.0mmol)的一攪拌溶液。將該混合物於此溫度攪拌30分鐘，然後於0 $^{\circ}\text{C}$ 移至含有於二氯甲烷(50mL)中之L-丙胺酸異丙酯鹽酸鹽

第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

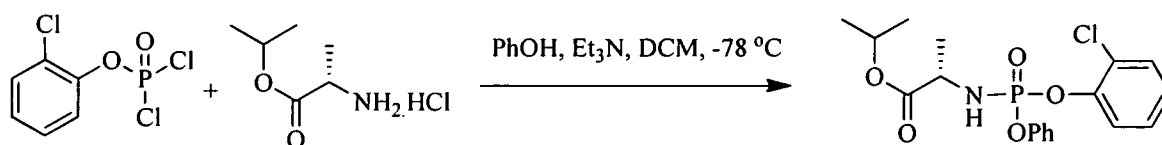
(1.67g, 10mmol) 的另一圓底燒瓶中。將第二批三乙胺 (2.92mL, 21mmol) 於 15 分鐘內加入該混合物。於 0°C 攪拌該混合物 1 小時，然後蒸發該溶劑。將該殘餘物伴隨醋酸乙酯 (30mL) 研碎，並將該白色固體物過濾去除。於減壓的情況下濃縮該過濾物以提供淡黃色油狀物。將該粗製之化合物使用 10-20% 梯度之醋酸乙酯/己烷層析，以提供比率約 1:1 之非鏡像異構物的混合物之產物 (2.0g, 產率 50%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -1.58, -1.62; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.06-7.51 (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 (ESI) m/z 398 ($\text{M}-1$)⁺。將該生成之產物如上所述以萃取、結晶或層析純化。

範例 8-2. (S)-異丙基 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羥基-4-甲基四氫呋喃-2-基)甲氧基)(苯氧基)-磷醯胺基)丙酸(4)之製備

將 1.7M 的叔丁基氯化鎂 (12.4mL, 21mmol, 2.1 等效) 溶液在室溫下於 15 分鐘內加入在無水 THF (50mL) 中之 1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮 (3, 2.6g, 10mmol) 的一攪拌溶液中。30 分鐘後，在 10 分鐘內逐滴加入於 THF (15mL) 中之外消旋的 (2-[(4-氟-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯 (4.08g, 10mmol))。使該混合物於室溫下攪拌 72 小時。與真正產物之 TLC 共點顯示了與起始核苷相比約生成 5% 之所需產物。

範例 9-1. 外消旋 2-[(2-氯-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異

丙酯(±)之製備

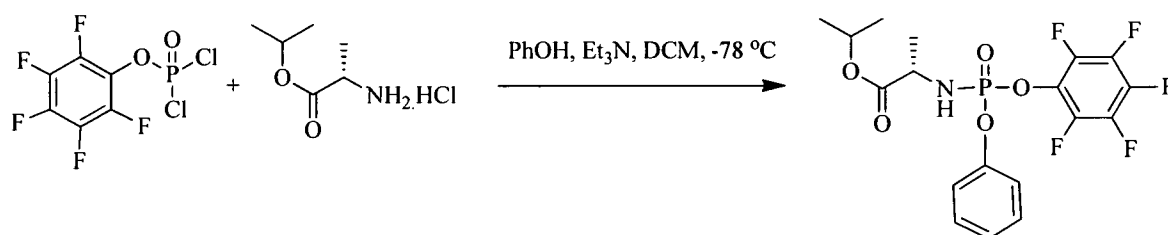


將在二氯甲烷(80mL)中之苯酚(3.76g, 40mmol)和三乙胺(6.16mL, 44mmol)的一溶液於-78°C、20分鐘內加入在二氯甲烷(80mL)中之2-氯-苯基二氯磷酸酯(9.8g, 40mmol)的一攪拌溶液。將該混合物於此溫度攪拌30分鐘，然後於0°C移至含有於二氯甲烷(150mL)中之L-丙胺酸異丙酯鹽酸鹽(6.7g, 40mmol)的另一圓底燒瓶中。將第二批三乙胺(11.6mL, 84mmol)於15分鐘內加入該混合物。於0°C攪拌該混合物1小時，然後蒸發該溶劑。將該殘餘物伴隨醋酸乙酯(100mL)研碎，並將該白色固體物過濾去除。於減壓的情況下濃縮該過濾物以提供淡黃色油狀物。將該粗製之化合物使用10-20%梯度之醋酸乙酯/己烷層析，以提供比率約1:1之非鏡像異構物的混合物之產物(11.3g, 產率72%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -1.58, -1.61; ^1H NMR (400 MHz, 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 (ESI) m/z 398 ($\text{M}-1$) $^+$ 。將該生成之產物如上所述以萃取、結晶或層析純化。

範例 9-2. (S)-異丙基 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羥基-4-甲基四氫呋喃-2基)甲氧基)(苯氧基)-磷醯胺基)丙酸之製備

將 1.7M 的叔丁基氯化鎂 (12.4mL, 21mmol, 2.1 等效) 溶液在室溫下於 15 分鐘內加入在無水 THF (50mL) 中之 1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基)-1H-嘓啶-2,4-二酮 (3, 2.6g, 10mmol) 的一攪拌溶液中。30 分鐘後，於 10 分鐘內逐滴加入於 THF (15mL) 中之 (2-[(2-氟-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基] 丙酸異丙酯 (外消旋 4.08g, 10mmol) 溶液。使該混合物於室溫下攪拌 72 小時。與真正產物之 TLC 共點顯示了與起始核苷相比約生成 5-10% 之所需產物。

範例 10-1. 外消旋 2-[(2,3,4,5,6-五氟-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基] 丙酸異丙酯 (±) 之製備



將在二氯甲烷 (40mL) 中之苯酚和三乙胺 (3.08mL, 22mmol) 的一溶液於 -78°C、20 分鐘內加入在二氯甲烷 (40mL) 中之五氟苯基二氯磷酸酯 (6.0g, 20mmol) 的一攪拌溶液。將該混合物於此溫度攪拌 30 分鐘，然後於 0°C 移至含有於二氯甲烷 (100mL) 中之 L-丙胺酸異丙酯鹽酸鹽 (3.35g, 20mmol) 的另一圓底燒瓶中。將第二批三乙胺 (5.84mL, 42mmol) 於 15 分鐘內加入該混合物。於 0°C 攪拌該混合物 1 小時，然後蒸發該溶劑。將該殘餘物伴隨醋酸乙酯 (60mL) 研碎，並將該白色固體物過濾去除。於減壓的情況下濃縮該過濾物以提

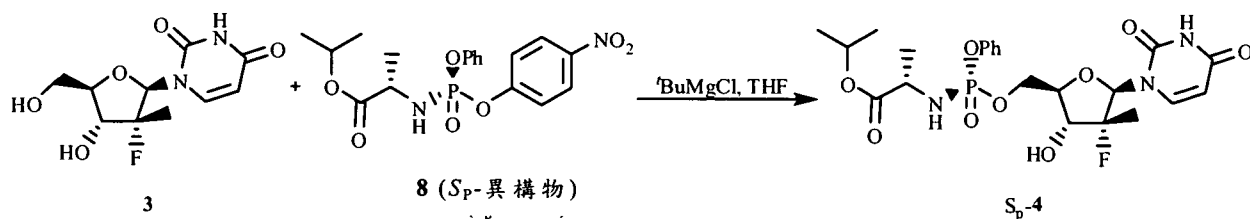
第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

供為比率約 1 : 1 之非鏡像異構物的混合物之淡黃色油狀物。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -0.49, -0.58。將該生成之產物如上所述以萃取、結晶或層析純化。

範例 10-2.(S)-異丙基 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氫嘓啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羥基-4-甲基四氫呋喃-2基)甲氧基)(苯氧基)-磷醯胺基)丙酸之製備

將 1.7M 的叔丁基氯化鎂 (12.4mL, 21mmol, 2.1 等效) 溶液在室溫下於 15 分鐘內加入在無水 THF (50mL) 中之 1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基)-1H-嘓啶-2,4-二酮 (3, 2.6g, 10mmol) 的一攪拌溶液中。30 分鐘後，於 10 分鐘內逐滴加入於 THF (15mL) 中之粗製的外消旋 (2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯 (4.08g, 10mmol)。使該混合物於室溫下攪拌 72 小時。與真正產物之 TLC 共點顯示了與起始核苷相比約生成 40-50% 之所需產物。

C 或 C' 的製備與純化提供了對 S_p-4 或 R_p-4 直接的途徑，如下面的範例所示。



範例 11.S_p-4 之製備 (32mg-規模)：將 1M 叔丁基氯化鎂溶液 (0.26mL, 0.26mmol, 2.1 等效) 在室溫下於 3 分鐘內加入於無水 THF (1mL) 中之 1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基

第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

-3- 甲基 - 四 氫 - 呋 喃 -2- 基)-1H- 嘧 啶 -2,4- 二 酮 3(32mg, 0.12mmol) 的一攪拌溶液。30分鐘後，於3分鐘內逐滴加入在THF(0.5mL)中之(S)-2-[(S)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯(8, S_P -異構物)的一溶液。讓該混合物於室溫攪拌42小時，然後以飽和 NH_4Cl 水溶液(10mL)平息。將該混合物於醋酸乙酯和水之間分層。經由無水硫酸鈉乾燥所結合的有機萃取物並且濃縮之。使用梯度0-4%之甲醇/二氯甲烷將該殘餘物層析，以提供為泡沫狀固體之 S_P -4(29mg, 產率44.5%)。 ^1H 與 ^{31}P NMR與本文所揭露者相符。

範例12. S_P -4之製備(2.6g-規模，不經層析)：將1.7M叔丁基氯化鎂溶液(12.4mL, 21mmol, 2.1等效)在室溫下於15分鐘內加入於無水THF(50mL)中之1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮(2.6g, 10mmol)的一攪拌溶液。30分鐘後，於10分鐘內逐滴加入在THF(15mL)中之(S)-2-[(S)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯(8, S_P -異構物, 4.08g, 10mmol)的一溶液。讓該混合物於室溫攪拌60小時，然後以飽和 NH_4Cl 水溶液(20mL)平息。將該混合物於醋酸乙酯(150mL)以及依序是10% Na_2CO_3 水溶液(3×20mL)和水(20mL)之間分層。經由無水硫酸鈉乾燥所結合的有機萃取物，將其過濾並且於減壓的情況下濃縮，以提供淡黃色殘餘物(3.8g)。將該殘餘物溶解於二氯甲烷(7.6mL)中，然後於室溫下攪拌20小時。過濾該白色固體，以1:1 IPE/二氯甲烷(5mL)沖洗，並於真空下乾燥，以提供為白色固體之純化產物(1.85g, 產率

35%)。

範例13.使用NaHMDS製備 S_P -4: 將於THF(270 μ L, 0.54mmol)中之2.0M雙三甲矽胺鈉溶液(NaHMDS)(12.4mL, 21mmol, 2.1等效)在-78 $^{\circ}$ C下於2分鐘內加入至無水THF(2.0mL)中之1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基)-1H-嘓啶-2,4-二酮(71mg, 0.27mmol)的一攪拌溶液。30分鐘後, 將在THF(1mL)中之(S)-2-[(S)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]-丙酸異丙酯(8, S_P -異構物, 111mg, 0.27mmol)的一溶液加至該混合物中。讓該混合物於此溫度攪拌2小時, 然後加溫至-20 $^{\circ}$ C, 於此溫度再攪拌額外的20小時。由TLC指示~30%的未反應核苷起始材料。因此, 加入額外的在THF(0.5mL)中的0.5等效試劑(55mg, 0.14mmol)至該反應混合物中, 並另外攪拌6小時。以飽和氯化銨溶液平息該反應混合物, 然後於醋酸乙酯和水之間分層。所結合的有機萃取物經由無水硫酸鈉乾燥並濃縮, 以提供淺棕色的殘餘物。使用梯度0-5%之甲醇/二氯甲烷將該粗產物行管柱層析, 以提供 S_P -4(22mg, 產率15%)、3'-胺基磷酸酯(5, S_P -異構物, 11.5mg, 16%產率)以及雙胺基磷酸酯(6, S_P , S_P -異構物, 12.6mg)。

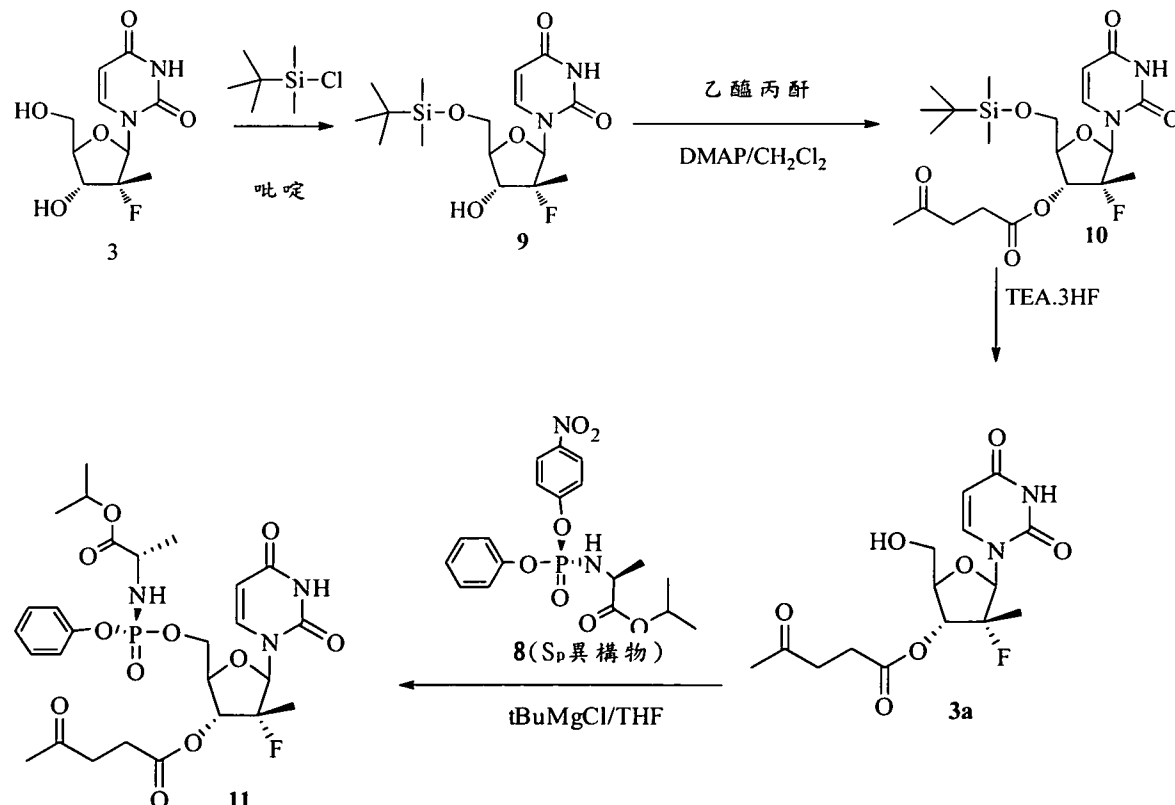
範例14. R_P -4(260 mg-規模)之製備: 將1.7M叔丁基氯化鎂溶液(1.23mL, 2.1mmol, 2.1等效)在室溫下於5分鐘內加入於無水THF(6mL)中之1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基)-1H-嘓啶-2,4-二酮(260mg, 1mmol)的一攪拌溶液。30分鐘後, 於3分鐘內逐滴加入在

第 99115937 號專利申請案說明書替換頁

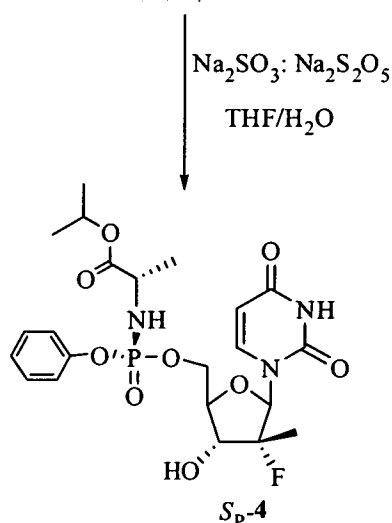
THF(3mL)中之(S)-2-[(R)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]丙酸異丙酯(8, R_P -異構物)的一溶液。讓該混合物於室溫攪拌96小時,並再以飽和 NH_4Cl 水溶液(10mL)平息。將該混合物於醋酸乙酯(50mL)和水($2 \times 20\text{mL}$)之間分層。經由無水硫酸鈉乾燥所結合的有機萃取物,過濾並且於減壓的情況下濃縮,以提供淡黃色殘餘物(490mg)。使用梯度0-5%之甲醇/二氯甲烷將該殘餘物層析,以提供為一白色固體之產物(160mg, 產率30%)。

S_P -4或 R_P -4的製備也可經由將3'-受保護的3伴隨合適的試劑C或C'或包含C和C'的混合物反應而達成,如下面範例所示。

範例15. S_P -4之製備伴隨3a為合成中間產物



修正
補充
102.4.29
本 年 月 日



範例15-1.5'-O-叔丁基二甲基矽基-2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(9)：

將在無水吡啶(500mL)中之TBDMSCl溶液(103.19g, 685.6mmol)在室溫下於45分鐘內逐滴加入在無水吡啶(750mL)中之2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷(3, 81.1g, 312mmol)的一攪拌溶液中。讓該反應於室溫下攪拌24小時。將甲醇(85mL)加至該反應混合物中並讓其攪拌10分鐘，然後將該溶劑於減壓的情況下蒸餾去除。將熱水(45 °C)(1L)加入該反應群並將該混合物以醋酸乙酯(2×500mL)萃取，以水(1×500mL)沖洗。經由無水硫酸鈉乾燥該有機層。將醋酸乙酯蒸餾去除，並將獲得之殘餘物與甲苯(2×500mL)共同蒸發，以提供為一白色泡沫之粗製的**9**。產量=116.9g(定量的)。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.1 (s, 6H), 0.91 (s, 9H), 1.22 (d, 3H, J = 21 Hz), 2.50 (s, 2H), 3.75-4.05 (m, 4H), 5.54 (d, 1H, J = 9 Hz), 5.73 (s, 1H), 6.0 (d, 1H, J = 18 Hz), 7.81 (d, 1H, J = 9 Hz), 8.57 (br, s, 1H), 11.1 (s, 1H)。

**範例 15-2.5'-O-(叔丁基二甲基矽基)-3'-O-乙醯丙基
(levulinyl)-2'-去氧-2'-氟2'-C-甲基-尿苷(10)之合成：**

將 DMAP(30.5g, 249.7mmol) 加入於在 DCM(1L) 中之核
苷 **9**(116.9g, 312.1mmol) 的一攪拌溶液，並讓其於室溫下攪
拌 20 分鐘。將在 DCM(200mL) 中之乙醯丙酐溶液(133.6g,
642.3mmol) 加入該混合物並讓其攪拌 24 小時。該混合之
TLC 指示反應的完成。加入冷水(500mL) 並攪拌該混合物 20
分鐘。分層並以飽和碳酸氫鈉溶液(2×250mL) 沖洗該有機
層，經由無水硫酸鈉乾燥然後於減壓的情況下蒸餾去除溶
劑，以提供黃色油狀物。粗產率：197.6g(135%)。該材料
使用於下一步驟。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.11 (s, 6H),
0.94 (s, 9H), 1.34 (d, 3H, J = 21 Hz), 2.22 (s, 3H), 2.6-2.89
(m, 4H), 3.72 (m, 1H), 4.01 (d, 1H, J = 12 Hz), 4.23 (d, 1H, J
= 9 Hz), 5.33 (dd, 1H, J = 15 Hz), 5.73 (d, 1H, J = 6 Hz),
6.26 (d, 1H, J = 15 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 12 Hz), 8.72 (br, s,
1H)。

**範例 15-3.3'-O-乙醯丙基-2'-去氧-2'-氟2'-C-甲基-尿苷(3a)
之合成：**

將粗製之 **10**(197.6g, ~312.1mmol) 溶解於 DCM(1L) 中，
於其加入 TEA.3HF(50.3g, 312.1mmol) 並使其於室溫攪拌過
夜。該混合物之 TLC 指示反應完成約 50%。加入另一等效之
TEA.3HF(50.3g, 312.1mmol) 並讓該反應混合物攪拌 6 小
時。於此時 TLC 指示約 10% 的未反應起始材料。加入另外
0.25 等效之 TEA.3HF(12.5g, 78.0mmol) 並使該反應混合物

攪拌過夜。濃縮反應混合物至乾燥以提供黃色油狀物。將所有批次的粗產物經由矽膠管柱層析純化(於DCM中0-2% MeOH)以提供124.1 g、為一白色泡沫固體物之3'-乙醯丙酸(自2'-去氧-2'-氟-2'-C-甲基尿苷之三步驟內的純化產率90%)。¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.55 (d, 3H, CH₃, J = 20 Hz), 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 Hz), 5.25 (dd, 1H, J = 16 Hz), 5.93 (d, 1H, J = 8 Hz), 8.20 (d, 1H, J = 8 Hz), 9.18 (s, 1H)。

範例15-4.(S)-2-{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-二氧3,4-二氫-2H-嘓啶-1-基)-4-(R)-氟-3-(4-氧代戊醯基)-4-甲基-四氫-呋喃-2-基甲氧基]-苯氧基-磷醯胺基}-丙酸(S)-異丙酯(11)之立體選擇性合成：

將叔丁基氯化鎂溶液(於THF中1.7M, 2等效)加入冷卻至0°C之於5mL無水THF中的核苷(3a, 1.00mmol, 358mg)溶液, 並讓其加溫至室溫且攪拌半小時。將試劑(ca. 97%對掌性純度)(S)-2-[(S)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基] 丙酸異丙酯(8, S_P-異構物)(408mg, 1.00mmol, 1.00等效)以一批量加至此混合物中, 並使其於室溫下攪拌。在16小時後, 剩下~30%的起始材料。以飽和NH₄Cl溶液10mL平息該反應混合物, 並以醋酸乙酯(3×25mL)萃取該水相。以鹽水沖洗所結合的有機層, 並經由無水硫酸鈉乾燥, 且蒸發至乾燥以提供淡黃色泡沫(500mg)。將其使用在二甲基氯中之2-5%甲醇之矽膠層析純化, 以提供約97% P對掌性純度、一白色

泡沫之產物(275mg)以及未反應的起始材料(162mg)。根據被消耗的起始材料，該產率為76%。³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): 3.7 ppm; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.22 (dd, 6H, J = 6.4 Hz), 1.37 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.63-2.9 (m, 4H), 4.0 (d, 1H, J = 8 Hz), 4.2-4.33 (m, 1H), 4.57 (d, 1H, J = 8Hz), 4.96-5.00 (sept, 1H), 5.2 (dd, 1H, J = 9 Hz), 5.42 (d, 1H, J = 8Hz), 6.19 (d, 1H, J = 18Hz), 7.15-7.35 (m, 5H), 7.5 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 8.2 (br, s, 1H)。

範例 15-5.(S)-2-{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氫-2H-嘓啶-1-基)-4-(R)-氟-3-羥基-4-甲基-四氫-呋喃-2-基甲氧基]-苯氧基-磷醯胺基}-丙酸(S)-異丙酯(*S_P*-4)之合成

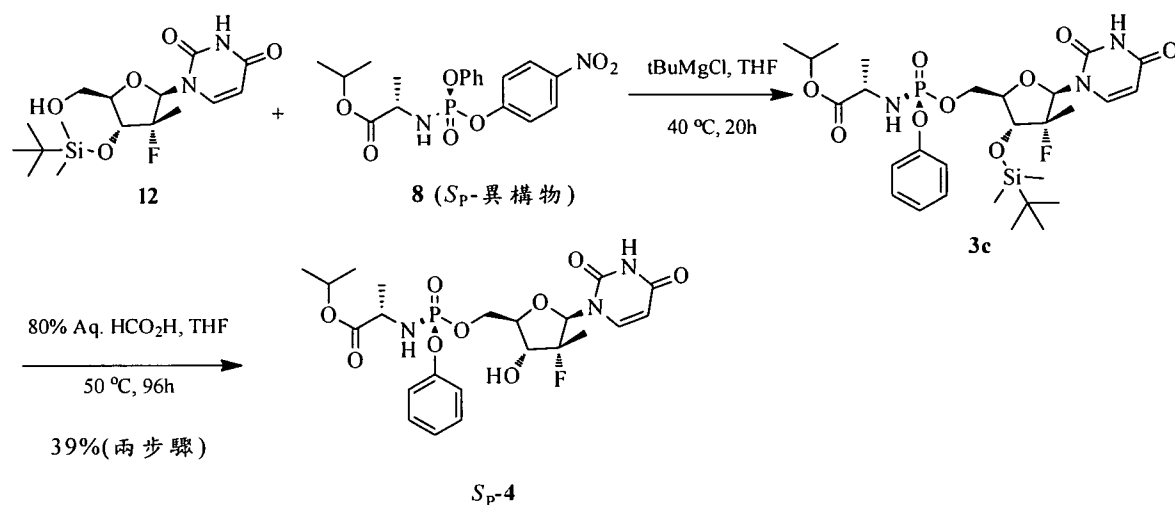
經由在水(25mL)中加入Na₂S₂O₃(1.51g)和Na₂S₂O₅(0.57g)來製備亞硫酸鈉溶液。將1.0mL的該亞硫酸鈉溶液加入在無水THF(2.5mL)中的乙醯丙酸(**11**, 250mg, 0.40mmol)的一溶液中。讓其於室溫攪拌4小時。將該反應混合物倒入水(15mL)中，並以醋酸乙酯(3×25mL)萃取，乾燥並蒸發，以定量地提供約97% P 對掌性純度之一白色固體產物，其與自未保護的核苷直接生成之*S_P*-4的物理和光學性質相稱。

範例 16.由**3a**製備*S_P*-4之替代程序

將1.7M之叔丁基氯化鎂溶液(1.07mL, 1.82mmol)在室溫下於2分鐘內加入在無水THF(1.5mL)中之4-氧代戊酸(2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氫-2H-嘓啶-1-基)-4-氟-2-羥甲基-4-甲基-四氫-呋喃-3-基酯(**3a**, 210mg, 0.59mmol)的一攪拌溶液。起初，觀察到白色沉澱物，且在10分鐘後該

反應混合物轉為暗黃色溶液。在30分鐘後，將在THF(1.5mL)中之(S)-2-[(S)-(4-硝基苯氧基)-苯氧基-磷醯胺基]-丙酸異丙酯(8(*S_P*-異構物)，382mg，0.94mmol)的一溶液於3分鐘內逐滴加入。當TLC與¹H NMR指示少於2%之未反應起始材料時，將該混合物於40°C加熱5小時。將該反應以飽和氯化銨溶液平息，然後於醋酸乙酯和水之間分層。以10% Na₂CO₃水溶液(3×10mL)接著以水沖洗所結合的有機層。經由無水硫酸鈉乾燥該有機層並濃縮之，以提供棕色之殘餘物(410mg)。將該粗產物溶解於四氫呋喃(1.0mL)，然後加入在1mL水中之亞硫酸鈉(37mg，0.295mmol)與焦亞硫酸鈉(224mg，1.18mmol)之混合水溶液。於TLC觀察到僅約10%轉換的階段，將該混合物於45°C加熱20小時，因此加入額外的亞硫酸鈉(74mg)與焦亞硫酸鈉(448mg)並繼續加熱額外的52小時。在這時，經由TLC觀察到約有40%轉換。將該反應混合物於水和醋酸乙酯之間分層。經由無水硫酸鈉乾燥所結合的有機層並濃縮之，以提供棕色之殘餘物(210mg)。將該殘餘物使用梯度0-5% MeOH/DCM之管柱層析，提供未反應的起始材料(89mg)與*S_P*-4(57mg，產率18%，24%根據回收的起始材料)。

範例17.以3c為合成中間產物製備*S_P*-4



範例 17-1.1-[(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-4-(叔丁基二甲基矽烷氧基)-3- 氟-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基]-1*H*-嘓啶-2,4-二酮, 12 之製備

將二氯甲烷(50mL)加至在吡啶(50mL)中之 3(10.0g, 38.43mmol)的一溶液中。將該溶液冷卻至 0°C。將 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(14.32g, 42.27mmol)加入至該溶液中,並於 0°C 攪拌該溶液 5 小時。加入甲醇(5mL)以平息該反應,於減壓的情況下濃縮該溶液至乾燥並將該殘餘物在醋酸乙酯(500mL)和水(50mL)之間分層。以鹽水(50mL)沖洗該有機溶液並加以乾燥(硫酸鈉, 4g)。於減壓的情況下移除該溶劑,並將該殘餘物溶解於二氯甲烷(100mL)。將咪唑(7.83g, 115mmol)以及叔丁基二甲基矽基氯(8.68g, 57.6mmol)加入該溶液。於室溫下攪拌該溶液 16 小時。加入甲醇(5mL)以平息該反應,並於減壓的情況下移除該溶劑,並將該殘餘物在醋酸乙酯(500mL)和水(50mL)之間分層。將該有機溶液乾燥(硫酸鈉, 4g)並於減壓的情況下蒸發。經由管柱層析(於己烷中之 10-40% EtOAc)純化該殘餘物,以提供

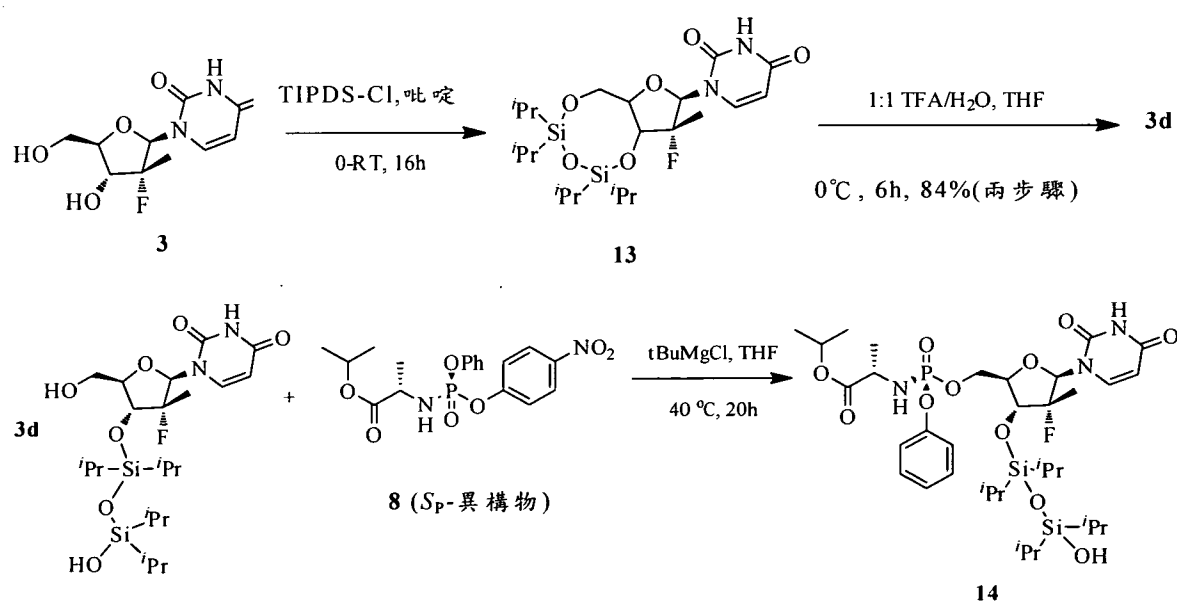
5'-O-DMT-3'-O-tBDMS 之中間產物。輪到以在二氯甲烷 (200mL) 中之 1% 三氟乙酸處理。將該溶液於室溫下攪拌 1 小時。加入水 (20mL) 並將該溶液於室溫下攪拌另一個 1 小時。緩慢加入甲醇 (5mL) 並將該溶液於室溫下攪拌另一個 1 小時。加入氫氧化銨以調整該溶液之 pH 到 7。分離該有機溶液、乾燥 (硫酸鈉, 4g) 並且於減壓的情況下蒸發至乾燥。經由矽膠管柱層析 (在二氯甲烷中之 1-5% 甲醇) 純化該殘餘物, 以提供為一白色固體、7.5g、於三步驟內 50% 產率之 **12**。
¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm) 11.48 (br s, 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, 3 H, 2-CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.12 (s, 6H, Si(CH₃)₂)。

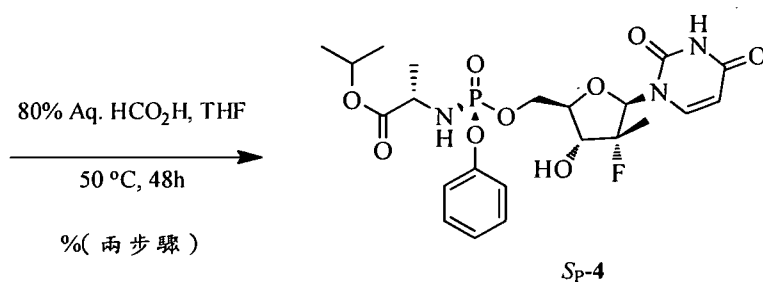
範例 17-2. 使用 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(叔丁基二甲基矽烷氧基)-3-氟-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮 (**3c**) 以製備 *S_P*-4

將 1.7M 之叔丁基氯化鎂溶液 (1.8mL, 3.1mmol) 在室溫下於 2 分鐘內加入在無水 THF (3mL) 中之 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(叔丁基二甲基矽烷氧基)-3-氟-5-羥甲基-3-甲基-四氫-呋喃-2-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮 (**12**, 374mg, 1mmol) 的一攪拌溶液。起初, 觀察到白色沉澱物, 且在 10 分鐘後該反應混合物轉為澄清暗黃色溶液。在 30 分鐘後, 將在 THF (2.5mL) 中之 (S)-2-[(S)-(4-硝基苯氧基)-苯氧基-磷鹽胺基]-丙酸異丙酯 (**8**, *S_P*-異構物, 653mg, 1.6mmol) 的一溶液於 3 分鐘內逐滴

加入。當TLC與 ^1H NMR指示少於5%之未反應起始材料時，將該混合物於 40°C 加熱20小時。將該反應以飽和氯化銨水溶液平息，然後於醋酸乙酯和水之間分層。以10% Na_2CO_3 水溶液($3\times 10\text{mL}$)接著以水(20mL)沖洗該有機層。經由無水硫酸鈉乾燥該有機層並濃縮之，以提供包含**3c**之棕色殘餘物(850mg)。將該粗產物溶解於四氫呋喃(2mL)並於室溫加入 0.8mL 之80%甲酸水溶液。將該反應混合物於 50°C 加熱96小時。於TLC觀察到約70%轉換。將該反應混合物倒入冷的飽和碳酸氫鈉水溶液，然後於醋酸乙酯和水之間分層。將該所結合的有機層經由無水硫酸鈉乾燥並且濃縮之，以提供棕色殘餘物(220mg)。將該殘餘物使用梯度0-5% MeOH/DCM 之管柱層析，以提供未反應的起始材料(21mg)和**S_P-4**(77mg ，產率35%，產率39%根據回收的起始材料)。

範例18.以3d**為合成中間產物製備**S_P-4****





範例 18-1.3d 之製備

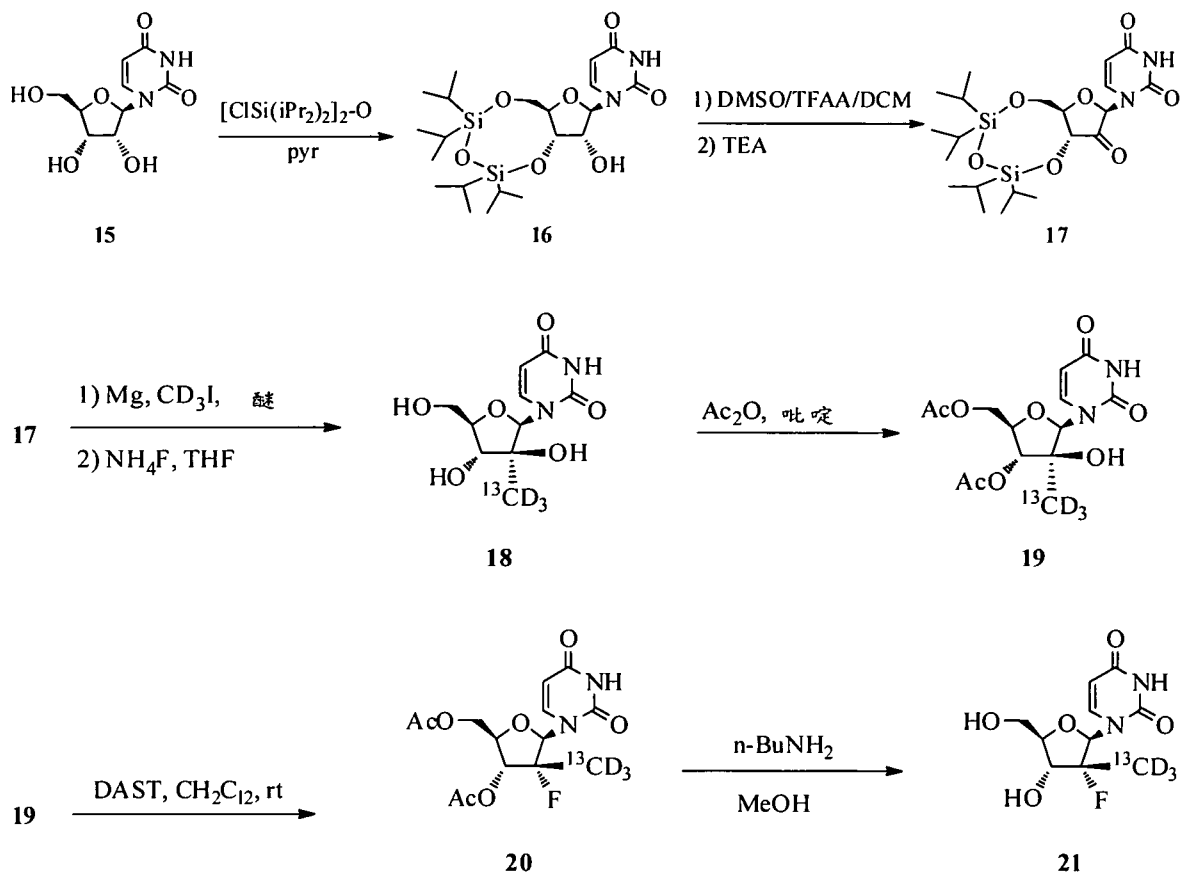
將 TIPDS-Cl 於 15 分鐘內逐滴加入在吡啶 (20ml) 中之 3 的一攪拌溶液。使該混合物緩慢加溫至室溫，於此溫度攪拌 16 小時。蒸發以去除其吡啶並且將該殘餘物伴隨甲苯 (50ml) 共同蒸發。然後將該殘餘物伴隨己烷研碎，並且使用矽藻土墊以過濾去除該白色沉澱物。於減壓的情況下濃縮該過濾物，以提供一泡沫狀固體 (12.97g)。將該粗產物 (13) 復溶於四氫呋喃 (75ml) 中並且於 0°C、20 分鐘內加入 TFA 水溶液 (75ml, 1 : 1 TFA/水)。於此溫度攪拌該混合物 6 小時。TLC 指示 ~5% 之起始材料。以飽和 NaHCO₃ 水溶液平息該反應混合物直到 pH 8，然後以醋酸乙酯萃取。以水沖洗所結合的有機萃取物，乾燥並且濃縮以提供白色結晶固體。將該固體進一步伴隨己烷 (30ml) 研碎，以提供白色固體，將其過濾並於高度真空的情況下乾燥，以提供 3d (10.1 g，於兩步驟內產率 84%)。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.83 (bs, 1H), 7.94 (bd, J=6.0Hz, 1H), 6.10 (bd, J=18.4Hz, 1H), 5.71 (d, J=8.2Hz, 1H), 4.43 (bs, 1H), 4.36 (dd, J=22.6, 9.0Hz, 1H), 4.27 (bs, 1H), 4.10 (d, J=13.2Hz, 1H), 4.03 (d, J=9.2Hz, 1H), 3.92 (d, J=13.2Hz, 1H), 1.39 (d, J=22.0Hz, 3H), 1.11-0.92 (m, 28H)。

範例18-2. *S_P*-4之製備

將1.7M之叔丁基氯化鎂溶液(1.8mL, 3.1mmol, 3.1等效)在室溫下於15分鐘內加入在無水THF(5mL)中之**3d**(520mg, 1mmol)的一攪拌溶液。在30分鐘後，將在THF(1mL)中之(S)-2-[(S)-(4-硝基-苯氧基)-苯氧基磷醯胺基] 丙酸異丙酯(**8**, *S_P*-異構物, 653mg, 1.6mmol)的一溶液於3分鐘內逐滴加入。讓該混合物於室溫下攪拌60小時。該粗製樣品之¹H和³¹P NMR指示非鏡像異構物之混合物約為1:0.76。以飽和NH₄Cl水溶液(20mL)平息該反應混合物。將該混合物於醋酸乙酯(150mL)以及依序是10% Na₂CO₃水溶液(3×20mL)和水(20mL)之間分層。經由無水硫酸鈉乾燥所結合的有機萃取物，過濾並於減壓的情況下濃縮，以提供一淡黃色殘餘物(**14**, 878mg)。

將上述化合物**14**復溶於四氫呋喃(3mL)，然後加入80%甲酸水溶液。將該混合物於55℃加熱20小時。將該反應混合物冷卻至0℃，然後以飽和碳酸氫鈉水溶液(pH 7.0)平息。然後將該反應混合物於醋酸乙酯和水之間分層。經由硫酸鈉乾燥所結合的有機層並濃縮之，以提供560mg的殘餘物。將該殘餘物使用梯度0-5%甲醇/二氯甲烷之層析，以提供未反應之起始材料(**14**, 242mg)以及為一白色固體之*S_P*-4(80mg, 15%產率)。

範例19.同位素標記*S_P*-4之製備



範例19-1.1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-羥基-2,2,4,4-四異丙基四氫-6H-呋喃并[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮，16之製備

將尿苷(15, 100.0g, 409.5mmol)與無水吡啶(600mL)共同蒸發至乾燥，並重新懸浮於無水吡啶(700mL)中。將1,3-二氯-1,1,3,3-四異丙基二矽烷(135.7g, 482.5mmol)在60分鐘內於室溫下加入此攪拌的細緻懸浮液。於室溫攪拌該細緻懸浮液17小時之後，加入甲醇(20mL)以平息該反應，然後於減壓的情況下濃縮。將該殘餘物於醋酸乙酯(1.5L)和水(2L)之間分層。進一步以5%鹽酸(2×1L)、鹽水(500mL)沖洗該有機層，經由固態硫酸鈉(50g)乾燥，過濾並於減壓的情況下濃縮成為該粗產物，ca 250g。將該殘餘物置於使用矽

膠(1.75kg)和在己烷中20-65%梯度之醋酸乙酯的過濾管柱。結合以均質之TLC判斷為純化產物的組分(於1:1己烷-醋酸乙酯中Rf 0.55)，並且於減壓的情況下濃縮並乾燥(40°C, 0.2mmHg, 24小時)，以提供為一白色泡沫固體、145.5g的**16** (76%)。同時收集額外的輕微不純之**16**的組分(35g)。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 11.35 (s, 1H, NH), 7.66 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, *H*-6), 5.57 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, 2'-OH), 5.50-5.49 (m, 2H, 1'-*H* 以及 *H*-5), 4.14-4.18 (m, 3H, 2', 3', 4'-*H*), 3.97-3.87 (m, 2H, 5'-*Ha* and *Hb*), 1.02-0.95 (m, 28H, CH(CH₃)₂)。

範例 19-2.1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-四異丙基-9-側氧四氫-6H-呋喃并[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮，**17**之製備

將無水DCM(600mL)和DMSO(30.82g, 394.5mmol)加入一乾燥三頸圓燒瓶。將該溶液於氮氣環境之乾燥冰/丙酮浴中冷卻至-78°C。將三氟乙酸酐(無水的, 77.7g, 369.8mmol)於40分鐘內由針筒加入並生成一混濁混合物。將在DCM(600mL)中之尿苷衍生物**16**的一溶液於-78°C、75分鐘內、經額外的漏斗逐滴加入該混合物中。將該非均質的混合物於-78~-65°C攪拌2小時，然後經由針筒快速加入無水三乙胺(92mL)以生成一澄清淡黃色溶液。於低溫下1小時之後，經由TLC(於己烷中之30% EtOAc)顯示該反應完成。移去冷浴並於1小時內緩慢加溫該反應混合物至室溫。加入飽和NH₄Cl(180mL)以平息該反應。加入水(200mL)而有機層被分離。以DCM(300mL)再度萃取該水層。以水

(3×400mL)、鹽水(150mL)沖洗所結合的有機層，並經由Na₂SO₄乾燥。將溶劑移除而生成一黏稠棕色殘餘物。

將該粗製油狀殘餘物(包含微量DCM)儲存於冷凍庫過夜。在過夜之後，於該油狀物中觀察到一些結晶固體。將該油狀物在室溫下溶解於500mL己烷中。將該溶液儲存於冷凍庫24小時且更多固體生成。由過濾收集固體並以冷的在己烷中之10% DCM(1L)淋洗以移除大部分的橘色。將該固體(17)於真空下乾燥2小時然後於空氣中乾燥24小時。於真空、50℃下乾燥後，該固體重21g。將該過濾物濃縮並由管柱層析(在己烷中之10-70%醋酸乙酯)純化該殘餘物，以生成額外的為一淡橘色固體之37g(合併產率97%)的17。

範例 19-3.1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-二氫-5-(羥甲基)-3-¹³C-過氧代甲基四氫呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮，18之製備

將以5%鹽酸溶液沖洗並乾燥(50℃, 0.2mmHg, 24小時)的鎂(3.53g, 147mmol)放入配置有磁性攪拌子與冷凝器之雙頸圓底燒瓶。將該燒瓶填滿氫氣然後加入無水醚類(80mL)。將過氧代-¹³C甲基碘(15.06g, 110.3mmol)緩慢加入於該醚中之鎂，其產生一放熱反應。在將該反應混合物冷卻之後，將該懸浮液於-50℃、20分鐘內移至在無水THF(1L)中之乾燥化合物 17(50℃, 0.2mmHg, 15小時)(10.0g, 20.63mmol)的溶液中。使該溫度升至-40℃，並於-40至-25℃之間攪拌該混合物4小時。於反應完成時，以EtOAc(1L)於-50℃稀釋該混合物，然後緩慢加入鹽水(300mL)。將該有機層分離然後以飽和氯化銨溶液(300mL×2)沖洗並以硫

酸鈉乾燥。在過濾和於減壓的情況下濃縮後，將該殘餘物溶解於MeOH(250mL)。加入氟化銨(12g)和TBAF(400mg)。將該生成的混合物於90°C攪拌7小時，然後於減壓的情況下以矽膠(20g)濃縮。在經由真空乾燥後，以快速矽膠管柱層析(MeOH:CH₂Cl₂=1:20至1:10)純化所獲得的殘餘物而生成為一白色固體之化合物**18**(5g, 46%)。 ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 11.26 (s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-6), 5.77 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-1'), 5.57 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5), 5.46 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz, HO-3'), 5.24 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, HO-2'), 5.14 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, HO-5'), 3.74-3.56 (m, 4H, H-3', 4', 5', 5'')。

範例19-4.((2R,3R,4S,5R)-3-乙醯氧基-5-(2,4-二氧-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-羥基-4-¹³C-過氙代甲基四氫呋喃-2-基)醋酸甲酯，19之製備

將醋酸酐(3mL)於室溫下加入在無水嘧啶(100mL)中之化合物**18**(5.00g, 19.1mmol)的一溶液。將該生成之混合物於室溫下攪拌15小時，以EtOAc(250mL)稀釋，以水(50mL×3)沖洗，並以硫酸鈉乾燥。在過濾和濃縮後，經由快速管柱層析(在CH₂Cl₂中之0-5% MeOH)純化該殘餘物，以提供為一灰色固體之化合物**19**(4.0g, 68%)。

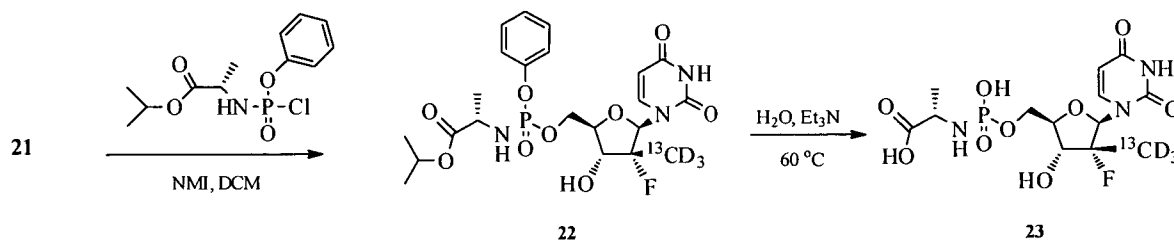
範例19-5.((2R,3R,4R,5R)-3-乙醯氧基-5-(2,4-二氧-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-4-¹³C-過氙代甲基四氫呋喃-2-基)醋酸甲酯，20之製備

將DAST(1.33mL, 10.1mmol)於-78°C緩慢加入在無水

CH₂Cl₂(60mL)中之化合物**19**(2.33g, 6.73mmol)的一溶液。將該生成之混合物暴露於室溫後，攪拌30分鐘。以完全相同的方式進行一額外的兩個2.33g規模的反應和一個1.00g規模之反應。合併所有四個反應混合物，以CH₂Cl₂(300mL)稀釋並以冰水(100mL×2)然後以冷NaHCO₃水溶液(100mL×2)沖洗。在乾燥、過濾以及濃縮後，以快速矽膠管柱層析法(於己烷中之0-%50% EtOAc, 化合物以約48%產出)純化該殘餘物，以提供為一白色固體之化合物**20**(2.0g, 從總共7.99g之化合物**19**之24%)。 ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 8.27 (s, 1H, NH), 7.55 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-6), 6.17 (d, 1H, *J* = 18.8 Hz, H-1'), 5.78 (dd, 1H, *J* = 1.2, 8.4 Hz, H-5), 5.12 (dd, 1H, *J* = 9.6, 21.6 Hz, H-3'), 4.40-4.31 (m, 3H, H-4', 5', 5''), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.15 (s, 3H, CH₃)。

範例19-6.1-((2R,3R,4R,5R)-3-氟-4-羥基-5-(羥甲基)-3-¹³C-過氘代甲基四氫呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮，**21**之製備

將正丁胺(6mL)加入在甲醇(20mL)中之化合物**20**(2g, 5.74mmol)的一溶液。將該生成之混合物於室溫下攪拌15小時，並於真空中以矽膠濃縮。以快速矽膠管柱層析(在CH₂Cl₂中之0-10% MeOH)純化獲得之殘餘物，以提供為一白色固體之化合物**21**(1.3g, 85%)。 ¹H NMR (CD₃OD) δ (ppm) 8.08 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.13 (d, 1H, *J* = 18.4 Hz, H-1'), 5.70 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5), 3.99 (d, 1H, *J* = 13.6 Hz, H-5'), 3.97-3.91 (m, 2H, H-3', 4'), 3.80 (dd, 1H, *J* = 2.0, 12.8 Hz, H-5''), ESMS (M+1)估計為265，觀察到265。



範例 19-7. (S)-異丙基 2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二
氫嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羥基-4-¹³C-過氘代甲基四氫呋喃
-2-基)甲氧基)(苯氧基)磷醯氨基)丙酸，22 之製備

將預先製備的在 THF (1.0M, 2.35mL, 2.35mmol) 中之氯
磷酸於 0 °C 逐滴加入在 THF (4mL) 中之未受保護的核苷
21 (207mg, 0.783mmol) 和 *N*-甲基咪唑 (0.4mL, 5mmol) 的一溶
液。將該反應於 1 小時內緩慢加溫至室溫，然後加入水 (1mL)
和 EtOAc (5mL)。以飽和檸檬酸溶液 (一價鹼，2×2mL)、飽
和 NaHCO₃ 溶液 (1×2mL) 沖洗該有機溶液，乾燥 (MgSO₄) 並
於減壓的情況下濃縮。將該粗製物以使用在 CH₂Cl₂ 中之 0 至
5% ⁱPrOH 為沖提液之矽膠管柱層析純化，以提供為一白色
固體之胺基磷酸酯 22 (216mg, 52%，P-非鏡像異構體之 1:1
混合物)：¹H NMR ((400MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.54 (s, 1H), 7.56
(d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.23-7.18 (m, 3 H),
6.14-5.96 (m, 2H), 5.89 (dd, *J* = 5.6, 25.6 Hz, 1H), 5.55 (t, *J*
= 8.4 Hz, 1H), 4.85 (dq, *J* = 1.6, 6.0 Hz, 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 NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.90,
4.77；針對 C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534.5 計算 LRMS (ESI) [M +
H]⁺，發現 534.4。

範例19-8. (2S)-2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-氟-3-羥基-4-¹³C-過氧代甲基四氫呋喃-2-基)甲氧基)(羥基)磷氧基)胺基)丙酸，23之製備

將胺基磷酸酯 22(147mg, 0.276mmol)懸浮於三乙胺(2mL)和水(0.5mL)中，並於60°C加熱30小時。接著於減壓的情況下蒸發該揮發性成分。將該粗製品以矽膠管柱層析純化，該層析以50-70%在CH₂Cl₂中之ⁱPrOH沖提，然後以0到20%的在ⁱPrOH中之NH₄OH沖提，以提供為一白色固體之23(95mg, 83%)： ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 19.2 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.02-3.81 (m, 4H), 1.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12；針對C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₉P 416.3計算LRMS (ESI) [M + H]⁺，發現416.4。

R_p-4, 4, 以及*S_p*-4樣品之製備

經由X-射線粉末繞射(XRPD)、核磁共振(NMR)光譜學、傅立葉轉換紅外(FT-IR)光譜學、微差掃描熱量法(DSC)、熱解重量測量分析(TGA)、重量蒸氣吸附法(GVS)、溶液溶解度之熱力學以及高效液相層析術(HPLC)來分析*R_p*-4, 4, 以及*S_p*-4的樣品。

範例20. X-射線粉末繞射

根據下列方案，經由X-射線粉末繞射(XRPD)分析*R_p*-4, 4, 以及*S_p*-4的樣品。

a. Bruker AXS/Siemens D5000

於 Siemens D5000 繞射儀使用 Cu K α 輻射 (40kV, 40mA)、 θ - θ 測向儀、V20發散以及接收狹縫、石墨二級單光以及閃爍計數器收集X-射線粉末繞射圖譜。該儀器為使用經認證之Corundum標準(NIST 1976)以確認性能。用以收集數據的軟體為Diffrac Plus XRPD Commander v2.3.1並且使用Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2或v 13.0.0.2來分析與呈現數據。

環境條件

操作的樣品係為於環境條件下使用接收的粉末製備為平板樣本。大約35mg的樣品被輕輕裝至切割成磨光、零背景(510)之矽晶圓中。該樣本在分析的期間內於其本身的平面中旋轉。該資料收集的細節為：角度範圍：2至42°2 θ ；步進大小：0.05°2 θ ；以及收集時間：4s.step⁻¹。

b. Bruker AXS C2 GADDS

在使用Cu K α 輻射線(40kV, 40mA)、自動化XYZ階段、用於自動樣本定位的雷射攝影顯微鏡以及HiStar 2維區域偵測器的Bruker AXS C2 GADDS繞射儀上收集X射線粉末繞射圖譜。X射線光學儀器由與0.3mm針孔準直器耦合的單一Göbel多層鏡所組成。

發散角，即，樣品上的X射線光束之有效尺寸，為大約4mm。 θ - θ 連續掃描模式用於樣品-偵測器距離20cm，其提供有效用的2 θ 範圍3.2°-29.7°。典型地該樣品將暴露於X射線光束120秒。用以收集數據的軟體為GADDS for WNT 4.1.16並且使用Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2或v 13.0.0.2來分

析與呈現數據。

環境條件

操作的樣品係為於環境條件下使用所接收而不研磨的粉末製備為平板樣本。將大約1-2mg的樣品輕壓於玻片上以獲得一平坦表面。

X射線粉末繞射(XRPD)

經由XRPD發現**4**為非晶質的(見第1圖)。根據範例3所製備的 R_p -**4**之高解析度XRPD分析確認為表現繞射粉末圖譜的晶體固體物質， S_p -**4**(根據範例4的方法4所製備)之高解析度XRPD分析，也被確認為晶體固體物質。 R_p -**4**和 S_p -**4**的XRPD結果表格展示於表格1，其中排除表現強度 $\leq 5\%$ (R_p -**4**)以及 $\leq 3\%$ (S_p -**4**)的所有波峰。

表格1.針對 R_p -4以及 S_p -4之XRPD數據

R_p -4之XRPD數據		S_p -4之XRPD數據(形式1)	
角度 $2-\theta^\circ$	強度 %	角度 $2-\theta^\circ$	強度 %
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		

將 S_p -4樣品以研杵與研鉢磨碎，然後連續通過500與250 μ m的篩孔以產生細緻粉末之樣品。經由高解析度XRPD再分析該樣品，確認沒有發生形狀改變。

範例21. S_p -4的結晶學研究

晶體 S_p -4表現了多形性。因此，一方面係針對晶體 S_p -4及其個別的多形形式。 S_p -4可存在至少五個多形的形式，標示為形式1-5。此外，也可製備非晶質的 S_p -4。一典型的結晶作用提供溶解約100mg的 S_p -4於合適體積的結晶溶劑中(乙腈(5體積)、氯仿(5體積)、醋酸正丁酯(7體積)、二氯甲烷(50體積)、苯甲醚(7體積)以及1:1 MTBE/己烷(50體積))，並且使該溶液於5°C蒸發。獲得多種晶體形式，但每一形式經由過濾及/或乾燥，提供了形式1。

如同經由單晶X射線與XRPD分析所確認的，形式1、2與3分別為非溶劑化物形式、1:1 DCM溶劑化物以及1:1 氯仿溶劑化物。由 S_p -4結晶作用而獲得的形式4和5分別來自乙腈與苯甲醚溶液。由於沒有獲得足夠品質的單晶，未能收集到足夠的數據以判斷形式4和5是否為非溶劑化物、水合物或溶劑化物。形式4與5經過過濾轉變為形式1。來自醋酸正丁酯(n BuAc)和一包含甲基正丁基醚(MTBE)和庚烷的溶液之 S_p -4結晶作用獲得了兩個額外的晶體形式；此二結晶形式經由過濾皆轉變為形式1。形式2和3亦於分離而轉變為形式1。形式1為非溶劑化物形式，其展現出廣泛的熔化吸熱，伴隨起始溫度94.3°C以及 ΔH_{fus} 為24.0kJ mol⁻¹。額外的 S_p -4形式1之XRPD圖譜描繪於第4圖。

範例21-1. S_p -4形式1

表格2表示 S_p -4形式1的波峰列表。

角度	強度%
$2-\theta^\circ$	%
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

範例21-2. S_p -4形式2

S_p -4形式2的XRPD圖譜描繪於第5圖。

表格3呈現 S_p -4形式2的波峰列表。

角度	強度%
$2-\theta^\circ$	%
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

範例 21-3. S_p -4 形式 3

S_p -4 形式 3 的 XRPD 圖譜描繪於第 6 圖。

表格 4 呈現 S_p -4 形式 3 的波峰列表。

度	強度 %
$2-\theta^\circ$	%
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

範圍 21-4. S_p -5 形式 4

S_p -4 形式 4 的 XRPD 圖譜描繪於第 7 圖。

表格 5 呈現 S_p -4 形式 4 的波峰列表。

角度	強度 %
$2-\theta^\circ$	%
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

範例21-5. S_P -4形式5

S_P -4形式5的XRPD圖譜描繪於第8圖。

表格6呈現 S_P -4形式5的波峰列表。

角度	強度%
$2-\theta^\circ$	%
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

範例21-6. S_P -4(非晶質的)

非晶質 S_P -4之XRPD圖譜描繪於第9圖。

範例22. S_P -4及其溶劑化物之單晶X-射線結晶學

範例22-1. S_P -4單晶X-射線結晶學(形式1)

第10圖展示了 S_P -4形式1之X射線晶體結構。其中，該圖由展示採用編號方案之晶體結構而展示了形式1之分子的觀點。非氫原子之各向異性原子位移橢圓面於50%機率層顯示。氫原子被顯示為具有任意的小半徑。

該構造解析係經由直接的方法獲得，於 F^2 之全矩陣最小平方法之精確化，具權重 $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0592P)^2 +$

($0.6950P$)，其中 $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ 、各向異性位移參數、使用球諧函數行經驗吸收度校正、實施於SCALE3 ABSPACK 之縮放演算法。最後對所有資料而言， $wR^2=\{\sum [w(F_o^2-F_c^2)^2]/\sum [w(F_o^2)^2]\}^{1/2}=0.0871$ ，傳統的 $R_1=0.0329$ 於 F 值之7090個反射具有 $F_o>4\sigma(F_o)$ ，對所有資料而言 $S=1.016$ ，以及870個參數。最後的 Δ/σ (最大值)0.001， Δ/σ (平均值)，0.000。最後的差分圖譜介於+0.534與-0.36e Å⁻³之間。

表格7.形式1的單晶參數

分子式	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
分子量	529.45				
晶體系統	單斜的				
空間群	$P2_1$	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	1.347g.cm ⁻¹				
μ	1.475mm ⁻¹				
光源，波長 λ	Cu K α , 1.54178Å				
$F(000)$	1112				
T	100(1)K				
晶體	無色的平板，0.12×0.09×0.03mm				
資料截取	0.80 Å				
$\theta_{\max}$	74.48°				
完成度	99.4%				
反射	14854				
獨特反射	7513				
R_{int}	0.0217				

範例22-2. S_P-4(形式2)的單晶X-射線結晶學

第11圖顯示了S_P-4形式2之X射線晶體結構。其中，該圖由展示採用編號方案之晶體結構而展示了形式2之分子觀點。由於非常微弱的數據，雜原子被等向性解析。氫原子未顯示。

該構造解析係經由直接的方法獲得，於 F^2 之全矩陣最小平方法之精確化，具權重 $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0975P)^2 + (10.6969P)$ ，其中 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ 、各向異性位移參數、使用球諧函數進行經驗吸收度校正、實施於SCALE3 ABSPACK 之縮放演算法。對所有資料而言，最後的 $wR^2 = \{ \Sigma [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \Sigma [w(F_o^2)^2] \}^{1/2} = 0.1883$ ，傳統的 $R_1 = 0.0741$ 於 F 值之2525個反射具有 $F_o > 4\sigma(F_o)$ ，對所有資料而言 $S = 1.05$ ，以及158個參數。最後的 Δ/σ (最大值)0.000、 Δ/σ (平均值)，0.000。最後的差分圖譜介於+1.388與-0.967e $\text{\AA}^{-3}$ 。

表格8.形式2的單晶參數

分子式	$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$				
分子量	614.38				
晶體系統	單斜的				
空間群	$P2_1$	a	12.8315(3) $\text{\AA}$,	α	90°,
		b	6.14530(10) $\text{\AA}$,	β	91.752(2)°,
		c	17.6250(4) $\text{\AA}$,	γ	90°
V	1389.14(5) $\text{\AA}^3$				
Z	2				
D_c	1.469g.cm $^{-1}$				
μ	3.196mm $^{-1}$				
光源，波長 λ	Cu-K, 1.54178 $\text{\AA}$				
$F(000)$	640				
T	293(2)K				
資料截取	0.80 $\text{\AA}$				
θ_{max}	62.23°				
完成度	91.1%				
反射	3528				
獨特反射	2562				
R_{int}	0.0227				

範例22-3. S_p -4(形式2)的單晶X-射線結晶學

第12圖描繪了 S_p -4(形式2)X射線晶體結構(ORTEP-各向異性)。 S_p -4(形式2)之二氯甲烷溶劑化物之晶體結構， $C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$ ，生成單斜空間群 $P2_1$ (系統缺乏 $0k0$ ： $k=\text{odd}$)，其具有 $a=12.8822(14)\text{\AA}$ 、 $b=6.1690(7)\text{\AA}$ 、 $c=17.733(2)\text{\AA}$ 、 $\beta=92.045(3)^\circ$ 、 $V=1408.4(3)\text{\AA}^3$ 、 $Z=2$ 以及 $d_{\text{calc}}=1.449\text{ g/cm}^3$ 。在143K的溫度下利用石墨單色Mo-K α 輻射線($\lambda=0.71073\text{\AA}$)在Rigaku Mercury CCD區域偵測器上收集X射線強度資料。從一系列具30秒曝光的12個 0.5° 旋轉影像執行初步索引編輯。以35mm的晶體至偵測器距離、 -12° 的 2θ 旋角、 0.5° 的旋轉寬度以及30秒鐘的曝光來收集共648個旋轉影像：掃描號碼1為在 $\omega=10^\circ$ 以及 $\chi=20^\circ$ 從 315° 至 525° 的 ϕ 掃描；掃描號碼2為在 $\chi=-90^\circ$ 以及 $\phi=315^\circ$ 從 -20° 至 5° 的 ω 掃描；掃描號碼3為在 $\chi=-90^\circ$ 以及 $\phi=135^\circ$ 從 -20° 至 4° 的 ω 掃描；掃描號碼4為在 $\chi=-90^\circ$ 以及 $\phi=225^\circ$ 從 -20° 至 5° 的 ω 掃描；掃描號碼5為在 $\chi=-90^\circ$ 以及 $\phi=45^\circ$ 從 -20° 至 20° 的 ω 掃描。使用CrystalClear(CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999)處理旋轉影像，產生未平均 F^2 以及 $\sigma(F^2)$ 值的列表，該未平均 F^2 以及 $\sigma(F^2)$ 值接著被傳至該CrystalStructure程式封包(CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigaku/MSO (2002))作進一步的處理，並在Dell Pentium III電腦上解答結構。在 $5.48 \leq 2\theta \leq 50.04^\circ$ 、 $-14 \leq h \leq 15$ 、 $-7 \leq k \leq 6$ 、 $-19 \leq l \leq 21$ 的範圍中測量共7707個反射，產生4253個獨特的反射($R_{\text{int}}=0.0180$)。使用REQAB(最

小以及最大傳送為0.824、1.000)而針對勞倫茲偏極化效應 (Lorentz and polarization effects)以及吸收度來校正該強度數據。

藉由直接的方法(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)解出該結構。使用 SHELXL-97(SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.*, **A64**,112-122)基於 F^2 而藉由全矩陣最小平方法來進行精確化。在精確化的期間使用所有的反射。所使用的權重方案為 $w=1/[\sigma^2(F_o^2)+0.0472P^2+0.4960P]$ ，其中 $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ 。非氫原子被各向異性地精確化，並使用“騎乘”模型(riding model)來精確化氫原子。對於4046個反射，精確化匯集至 $R_1=0.0328$ 以及 $wR_2=0.0817$ ，其中對於所有4253個獨特、非零反射以及358個變數， $F>4\sigma(F)$ 以及 $R_1=0.0348$ 、 $wR_2=0.0838$ 以及 $GOF=1.056(R_1=\sum ||F_o|-|F_c||/\sum |F_o|$; $wR_2=\{\sum w(F_o^2-F_c^2)^2/\sum w(F_o^2)^2\}^{1/2}$; $GOF=\{\sum w(F_o^2-F_c^2)^2/(n-p)\}^{1/2}$ ，其中 n =反射數量以及 p =精確化參數的數量)。在最小平方的最後週期中的最大 Δ/σ 是0.000，且在最後的差分傅立葉中最顯著的兩個峰是+0.312以及-0.389e/Å³。Flack絕對結構參數精確化至-0.06(6)從而證實了該標題化合物之立體化學。

表格1列出了晶胞的資訊、資料收集參數以及精確化資料。最後的位置與均等的等向熱學參數提供於表格2中。各向異性熱學參數於表格3("ORTEP-II: A Fortran Thermal

Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations".

C.K. Johnson (1976) ORNL-5138)以顯示為30%機率的熱橢圓體表示該分子。

表格9.化合物 $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ 結構決定的摘要

結構式：	$C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$
結構式分子量：	614.38
晶體等級：	單斜的
空間群：	$P2_1$ (#4)
Z	2
晶胞常數：	
A	12.8822(14)Å
b	6.1690(7)Å
C	17.733(2)Å
B	92.045(3)°
V	1408.4(3)Å ³
μ	3.48cm ⁻¹
晶體大小, mm	0.42×0.12×0.10
D_{calc}	1.449g/cm ³
F(000)	640
輻射：	Mo-K α ($\lambda=0.71073$ Å)
2 θ 範圍	5.48 – 50.04 °
收集之hkl：	$-14 \leq h \leq 15$; $-7 \leq k \leq 6$; $-19 \leq l \leq 21$
測量到反射數目：	7707
獨特反射數目：	4253 ($R_{int}=0.0180$)
觀察到反射數目	4046 ($F > 4\sigma$)
用於精確化反射數目	4253
參數之數目	358
R索引 ($F > 4\sigma$)	$R_1=0.0328$ $wR_2=0.0817$
R索引(所有資料)	$R_1=0.0348$ $wR_2=0.0838$
GOF：	1.056
最大差分峰, e/Å ³	+0.312, -0.389

範例22-4. S_p-4 (形式3)的單晶X-射線結晶學

第13圖展示了 S_p-4 形式3之X射線晶體結構。其中，該圖由展示採用編號方案之晶體結構而展示了形式3之分子

觀點。非氫原子之各向異性原子位移橢圓面於50%機率層顯示。氫原子被顯示為具有任意的小半徑。

該構造解析係經由直接的方法獲得，於 F^2 之全矩陣最小平方法之精確化，具權重 $w^{-1}=\sigma^2(F_o^2)+(0.0512P)^2+(0.6810P)$ ，其中 $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ 、各向異性位移參數、使用球諧函數進行經驗吸收度校正、實施於SCALE3 ABSPACK之縮放演算法。對所有資料而言，最後的 $wR^2=\{\sum[w(F_o^2-F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2}=0.0796$ ，傳統的 $R_1=0.0294$ 於 F 值之2486個反射具有 $F_o>4\sigma(F_o)$ ，對所有資料而言， $S=1.068$ ，以及377個參數。最後的 Δ/σ (最大值)0.001、 Δ/σ (平均值)，0.000。最後的差分圖譜介於+0.211與-0.334e Å⁻³。

表格10.形式3的單晶參數

分子式	C ₂₃ H ₃₀ Cl ₃ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
分子量	648.82				
晶體系統	單斜的				
空間群	P21	<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	1.507g.cm ⁻¹				
μ	3.977mm ⁻¹				
光源，波長 λ	Cu K α , 1.54178Å				
$F(000)$	672				
T	100(1)K				
晶體	無色針狀，0.22×0.03×0.02mm				
資料截取	0.80 Å				
$\theta_{\max}$	74.41°				
完成度	69.1%				
反射	3062				
獨特反射	2607				
R_{int}	0.0198				

範例23.於溫度和相對溼度提升時的穩定性

將 R_p -4樣品儲存於40°C與75%相對溼度之濕度箱中一星期，並且經由XRPD重新分析該樣品。所獲得的 R_p -4粉末圖譜顯示在實驗過程期間無重大變化，意指沒有觀察到固體形式的改變。此結果應與4之樣品對照，其在40°C與75%相對溼度下於約16小時內潮解。確切地，4之潮解性質的實例說明如下。將4之樣品通過250 μ m篩孔，再將樣品儲存於40°C/75% RH以及25°C/53%相對溼度，並且於規律區間以視覺觀察。其結果提供於表格4。

表格11.於相對溼度提升時4之穩定性

條件	t=1.5h	t=4.5h	t=6.5h	t=8.5h	t=73h
40°C/ 75%RH	潮解	-	-	-	-
25°C/ 53%RH	無潮解	黏性固體	部分潮解	幾乎完全 潮解	潮解

於儲存在40°C與75%相對溼度下， S_p -4之樣品於16小時內潮解。舉例來說， S_p -4樣品以磨杵與磨臼研碎，然後連續地通過500和250 μ m之篩孔，以生成為細緻粉末之樣品。將此物質之樣品儲存於40°C與75%相對溼度和25°C與53% RH，並且於規律區間以視覺觀察。其結果提供於表格5。

表格12.於相對溼度提升時 S_p -4之穩定性

條件	t = 1.5 h	t = 4.5 h	t = 104 h
40°C/75% RH	無潮解	潮解	-
25°C/53% RH	無潮解	無潮解	無潮解

在25°C與53% RH下儲存104小時之後的樣品的XRPD分析，於產生的繞射圖顯示無重大變化，意指沒有發生形式的改變。

範例24.傅立葉轉換-紅外線(FT-IR)光譜

裝有通用衰減全反射(ATR)取樣配件的紅外線光譜分析儀(Perkin-Elmer Spectrum One)上收集資料。收集並使用Spectrum v5.0.1軟體分析該資料。

所獲得的4、 R_p -4以及 S_p -4之該IR光譜分別展示於第5-7圖中。所選擇的波峰以波數(cm^{-1})列舉如下：

4：~1680、~1454、~1376、~1205、~1092、~1023(第14圖)；

R_p -4：~1742、~1713、~1679、~1460、~1377、~1259、~1157、~1079(第15圖)；以及

S_p -4 (形式1)：~1743、~1713、~1688、~1454、~1378、~1208、~1082(第16圖)。

範例25.微差掃描熱量法(DSC)熱重分析(TGA)

於配備50位自動加樣器之TA Instruments Q2000收集DSC資料。熱容值的校準為使用藍寶石進行且能量與溫度之校準為使用經認證之鈳進行。

溫度調幅式DSC典型地於0.8-1.2mg之每一樣品，在一針孔鋁盤中，使用下方加熱速率 $2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 以及溫度調整參數 $\pm 0.2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 與40秒進行。對該樣品維持以 $50\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 之乾燥氮氣的淨化。

控制儀器的軟體為Advantage for Q Series v2.8.0.392以及Thermal Advantage v4.8.3，並且使用Universal Analysis v4.3A分析資料。

於配備34位自動加樣器之Mettler DSC 823e收集DSC

資料。使用經認證之鈰校準該儀器的能量與溫度。典型地對於0.8-1.2mg之每一樣品，在一針孔鋁盤中，以 $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ 由 25°C 加熱至 250°C 。對該樣品維持以 $50\text{mL}.\text{min}^{-1}$ 之氮氣淨化。控制儀器與分析資料的軟體為STARe v9.20。

於配備34位自動加樣器之Mettler TGA/SDTA 851e收集TGA資料。使用經認證之鈰校準該儀器的溫度。典型地將8-12mg之每一樣品裝載至預先秤重的鋁坩堝，並以 $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ 由室溫加熱至 350°C 。對該樣品維持以 $50\text{mL}.\text{min}^{-1}$ 之氮氣淨化。控制儀器與分析資料的軟體為STARe v9.20。

4之DSC分析顯示出單一寬吸熱峰伴隨起始溫度 58.7°C ($\Delta H\ 14\ \text{J}.\text{g}^{-1}$)，經確認係由於進一步的調幅DSC分析而於玻璃轉移期間之分子鬆馳(第17圖)。4之TGA分析顯示在高於 240°C 而解離之前沒有重量損失，確認該材料為非溶劑化物的。如同4之XRPD分析確認該材料為非晶質的，進行調幅DSC分析以試圖計算玻璃轉移溫度，其被發現為 57°C 。

R_p -4之DSC分析顯示出單一急劇吸熱峰伴隨起始溫度 136.2°C ($\Delta H\ 76\ \text{J}.\text{g}^{-1}$)經高溫載台顯微鏡確認為熔化。見第18圖。 R_p -4之TGA分析顯示在高於 240°C 而解離之前沒有重量損失，確認該材料為非溶劑化物的。

S_p -4之DSC分析顯示出單一寬吸熱峰伴隨起始溫度 93.9°C ($\Delta H\ 43\ \text{J}.\text{g}^{-1}$)經高溫載台顯微鏡確認為熔化。見第19圖。 S_p -4之TGA分析顯示在高於 240°C 而解離之前沒有重量損失，確認該材料為非溶劑化物的。

範例26.重力蒸氣吸附(GVS)

SMS DVS Intrinsic

使用 SMS DVS Intrinsic 溼度吸附分析儀以獲得吸附等溫線，經由 SMS Analysis Suite 軟體控制。經由儀器控制將樣品溫度維持在 25°C。經由混合乾與溼的氮氣蒸氣來控制溼度，伴隨總流速 200 mL.min⁻¹。由校準之 Rotronic 探針(動態範圍 1.0-100 %RH)於接近樣品的位置來量測相對濕度。該樣品之重量變化(質量鬆馳)為經由微平衡(精確度 ±0.005mg)持續監控之 %RH 的函數。

典型地，將 5-20mg 樣品於室溫條件下置於已測量皮重之不銹剛網籃中。將樣品於 40% RH 以及 25°C (典型室內條件)裝入以及取出。溼度吸附等溫線如下概述而操作(2次掃描提供 1 次完整循環)。該標準等溫線於 25°C、0.5-90%RH 範圍內以 10%RH 為區間而操作。

表格 13. SMS DVS Intrinsic 實驗之方法參數

參數	值
吸附-掃描 1	40-90
解離/吸附-掃描 2	90-0, 0-40
區間(%RH)	10
掃描數目	2
流速(mL.min ⁻¹)	200
溫度(°C)	25
穩定度(°C.min ⁻¹)	0.2
吸附時間(小時)	6小時時間內

在完成等溫線和經 XRPD 重新分析之後，將該樣品回收。

GVS 分析顯示 *R_p-4* 為不吸濕的，由 0 至 90% 相對濕度時表現可逆之攝取約 0.2 重量百分率(wt%)之水。於 GVS 實驗後，經由 XRPD 重新分析該樣品顯示無形狀的改變。

將 S_p-4 樣品以磨杵和磨臼研磨，然後連續通過500與250 μm 之篩孔，以生成為細緻粉末之樣品，再將其使用修飾過的單一循環方法分析。將樣品取自40% RH(約略為室溫)至60% RH，代替標準方法的90%，然後循環至0%以及回到40%RH。此分析顯示 S_p-4 為不吸濕的直到60%RH，伴隨由0至60%RH時可逆之攝取~0.2 %之水的重量。

範例27.水溶液溶解度之熱力學

經由懸浮足夠量之化合物於水中，以生成化合物之母自由形式的最大量之最後濃度 $\geq 10 \text{ mg.mL}^{-1}$ 之，以測定水溶液溶解度。於25 $^{\circ}\text{C}$ 平衡該懸浮液24小時，再測量其pH值。接著通過玻璃纖維C濾過器將該懸浮液過濾至96孔盤中。再以101之因數稀釋該過濾物。經由HPLC參考在DMSO中之約 0.1 mg.mL^{-1} 之標準溶液來定量。注射不同體積之標準品、稀釋與未稀釋之樣品溶液。使用被發現在相同滯留時間的峰作為在標準注射中主要峰，經由積分測定其峰面積而計算溶解度。

表格14.用於溶解度測量之HPLC方法參數

方法類型：	反相伴隨梯度沖提		
管柱：	Phenomenex Luna, C18 (2) 5 μm 50 $\times$ 4.6mm		
管柱溫度($^{\circ}\text{C}$)：	25		
標準注射(μl)：	1, 2, 3, 5, 7, 10		
測試注射(μl)：	1, 2, 3, 10, 20, 50		
偵測：	260,80		
波長，帶寬(nm)：			
流速(mL.min^{-1})：	2		
A相：	於水中之0.1% TFA		
B相：	於乙腈中之0.085% TFA		
時間表：	時間(min)	% A相	% B相
	0.0	95	5
	1.0	80	20
	2.3	5	95
	3.3	5	95
	3.5	95	5
	4.4	95	5

根據上述所提之條件、於配備二極管陣列偵測器之 Agilent HP1100 系列的系統並使用 ChemStation 軟體 vB.02.01-SR1 進行分析。

表格15. R_p -4、4以及 S_p -4溶液溶解度結果

樣品編號	未過濾混合物 之 pH	溶解度 / mg.mL^{-1}	註釋
R_p -4	7.12	1.58	懸浮液
4	7.03	6.11	殘餘固體
S_p -4	6.88	5.65	殘餘固體

範例28.經由HPLC測定化學純度

多種HPLC條件可用以測定本文所揭露之化合物之化學純度。一個這樣的例子揭露於上文關於溶液溶解度之熱力學研究。另一範例揭露於下。

HPLC條件：

LC: Waters Alliance 2695分離模組，Waters 2996 PDA 偵測器以及 Waters Empower 2 Software(版本6.00)

管柱： Phenomenex Luna C18(2); 4.6×50mm; 3 μm

流速： 1.2 mL/min

注射體積： 10 μL

移動相： 溶劑A：95%水伴隨5%甲醇以及10mM醋酸銨；pH~5.3

溶劑B：MeOH伴隨10mM醋酸銨

梯度：

保持於0%B	3 min
0-47%B	3-4 min
保持於47 %B	4-10 min

47%-74%B	10-11min
保持於74%B	11-13.5min
回復至 0%B	13.5-13.6 min
保持於0%B	13.6-15.5 min

在這些條件下，測定4、 R_p -4以及 S_p -4的純度分別為~99.6、~99%以及~99.5%。應注意可經由優化揭露於上文的方法而實現較高的純度。

檢視XRPD繞射圖顯示了該兩結晶單一非鏡像異構物提供顯著不同之XRPD圖譜。額外地，該兩結晶非鏡像異構物具有明顯不同的熔點， R_p -4相較於 S_p -4具有高相當多之起始點(136°C對94°C)。

範例29.額外的分離方法

下列的SFC分離(條件列於下文)產生足夠的非鏡像異構物、 R_p -4與 S_p -4混合物之分離。

製備方法：	分析方法：
Chiralpak AS-H (2×25cm) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25×0.46cm)
20% 甲醇/CO ₂ (100bar)	20% 甲醇/CO ₂ (100bar)
50 mL/min, 220nm.	3 mL/min, 220nm.
濃度：260mg/30mL 甲醇，注射體積：1.5mL	

下列的SFC分離(條件列於下文)產生足夠的非鏡像異構物、 R_p -4與 S_p -4混合物之分離。

製備方法：	分析方法：
Chiralpak IA(2×15cm)802091	Chiralpak IA(15×0.46cm)
30% 異丙醇(0.1% DEA)/CO ₂ ，100bar	40% 甲醇(DEA)/CO ₂ ，100bar
60 mL/min, 220nm.	3 mL/min, 220nm.
注射體積：2mL, 20mg/mL 甲醇	

表格16. *R_P*-4、4以及*S_P*-4成批特徵之結果摘要

分析	<i>R_P</i> -4	4	<i>S_P</i> -4
質子NMR	單一非鏡像異構物	1:1非鏡像異構物混合物	單一非鏡像異構物
XRPD	結晶-相異於 <i>S_P</i> -4	非晶質的	結晶-相異於 <i>R_P</i> -4
DSC	吸熱；熔化於-136℃	吸熱；59℃	吸熱；熔化於-94℃
TGA	無重量損失，分解 >240℃	無重量損失，分解 >240℃	無重量損失， 分解>240℃
IR	見上文	見上文	見上文
Aq溶解度 (mg.mL ⁻¹)	1.58	6.11	5.65
HPLC純度	96.9%	99.6%	99.5%
40℃/75% RH	無形式改變	於1.5h內潮解	於4.5h內潮解
25℃/53% RH	-	潮解	無形式改變
GVS	至90% RH非吸濕的	-	至60% RH非吸濕的

範例30. 8(*S_P*-異構物)之X射線結晶學

化合物8(*S_P*-異構物)，C₁₈H₂₁N₂PO₇，以單斜空間群P2₁結晶化(系統缺乏0k0：k=odd)，其具有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以及d_{calc}=1.397g/cm³。在100(1)K的溫度下利用石墨單色Mo-Kα輻射線(λ=0.71073Å)在Bruker APEXII CCD區域偵測器上收集X射線強度資料。第20A與20B圖分別展示了分子編號1和2之非對稱單位。

從一系列具30秒曝光的36個0.5°旋轉框執行初步索引編輯。以70.00mm的晶體至偵測器距離、0.5°的旋轉寬度以及20秒鐘的曝光來收集共3608個框：

掃描類型	2θ	ω	φ	χ	框
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

使用 SAINT(Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA)整合旋轉框，產生未平均 F^2 以及 $\sigma(F^2)$ 值的列表，該未平均 F^2 以及 $\sigma(F^2)$ 值接著被傳至該 SHELXTL(Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.)程式封包以進一步的處理並在 Dell Pentium 4電腦上解答結構。在 $1.58 \leq \theta \leq 25.09^\circ$ 、 $-6 \leq h \leq 6$ 、 $-18 \leq k \leq 18$ 、 $-28 \leq l \leq 28$ 的範圍中測量共6909個反射，產生 6909 個獨特的反射 ($R_{int}=0.0581$)。使用 SADABS(Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Germany.)(最小以及最大傳送為0.6093、0.7452)而針對勞倫茲偏極化效應 (Lorentz and polarization effects) 以及吸收度來校正該強度資料。

藉由直接的方法(SHELXS-97)(SHELXS-97: Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64,112-122.)解出該結構。使用 SHELXL-97(SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64,112-122)基於 F^2 而藉由全矩陣最小平方法來進行精確化。在精確化的期間使用所有的反射。所使用的權重方案為 $w=1/[\sigma^2(F_o^2)+(0.0000P)^2+14.0738P]$ ，其中 $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ 。非氫原子被各向異性地精確化，並使用騎乘模型 (riding model)來精確化氫原子。對於6173個所觀察到的反射，精確化匯集至 $R_1=0.0847$ 以及 $wR_2=0.1899$ ，其中對於所有 6909個獨特、非零反射以及512個變數， $F>4\sigma(F)$ 以及 $R_1=0.0963$ 以及 $wR_2=0.1963$ 以及 $GOF=1.119$ ($R_1=\Sigma||F_o|-|F_c||/\Sigma|F_o|$ ； $wR_2=[\Sigma w(F_o^2-F_c^2)^2/\Sigma w(F_o^2)^2]^{1/2}$ ； $GOF=[\Sigma w(F_o^2-F_c^2)^2/(n-p)]^{1/2}$ ；其中 n =反射數量以及 p =精確化參數的數量)。在最小平方的最後週期中的最大 Δ/σ 是0.000，且在最後的差分傳

立葉中最顯著的兩個峰是+0.402以及-0.559 e/Å³。

表格17.化合物8(*S_P*-異構物)結構測定的摘要

實驗式	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ PO ₇
分子式權重	408.34
溫度	100(1)K
波長	0.71073 Å
晶體系統	單斜的
空間群	P2 ₁
晶胞常數：	
a	5.3312(4) Å
b	15.3388(8) Å
c	23.7807(13) Å
β	92.891(3)°
體積	1942.2(2) Å ³
Z	4
密度(計算出的)	1.397 Mg/m ³
吸收係數	0.185 mm ⁻¹
F(000)	856
晶體大小	0.40×0.10×0.08 mm ³
資料收集的θ範圍	1.58至25.09°
索引範圍	-6≤h≤6, -18≤k≤18, -28≤l≤28
所收集的反射	6909
獨立反射	6909 [R(int)=0.0581]
完全成θ = 25.09°	99.6%
吸收度校正	來自均等物的半經驗方法
最大以及最小傳送	0.7452以及0.6093
精確化方法	F ² 的全矩陣最小平方法
資料/限制/參數	6909/1/512
F ² 的適合度	1.119
最終R索引 [I>2σ(I)]	R1=0.0847, wR2=0.1899
R索引 (所有資料)	R1 = 0.0963, wR2 = 0.1963
絕對結構參數	0.1(2)
最大差分峰與洞	0.402以及-0.559 e.Å ⁻³

範例31.生物活性

將包含細胞之複製單元以3000個細胞/孔(50μl)種植於96孔白色/不透明盤，或以1500個細胞/孔(25μL)種植於384孔白色/不透明盤上。將50μL之2X化合物加入96孔盤或將25μL之2X化合物加入384孔盤。將該盤於37°C、加濕之5%

CO₂環境中培養4天。在培養之後，加入Bright-Glo試劑(50μL於96孔盤或25μL於384孔盤)以測量HCV複製之螢光蟲螢光素酶報導基因。對未用藥控制組計算抑制百分比。

化合物	HCV複製子活性(μM)
4	0.58
<i>R_P</i> -4	2.87
<i>S_P</i> -4	0.13

R_P-4和*S_P*-4已被驗證具有廣泛的基因型範圍。例如，兩者皆顯示對C型肝炎病毒基因型1-4為有活性的。

美國專利申請案號12/053,015，以及2009年5月20日申請之美國臨時專利申請案第61/179,923號，以及於2010年3月31日申請之美國臨時專利申請案第61/319,513號之主題，其全部內容於此併入以作為參考。所有引用之參考文獻之主題於此併入以作為參考。如果所併入用語的意義與本文中所定義的用語意義相衝突，則以目前所揭露內容所包含的該用語意義為主導而優先於所併入之用語。

【圖式簡單說明】

第1圖4的高解析度XRD繞射圖。

第2圖*R_P*-4的高解析度XRD繞射圖。

第3圖*S_P*-4(形式1)的高解析度XRD繞射圖。

第4圖*S_P*-4(形式1)的高解析度XRD繞射圖。

第5圖*S_P*-4·CH₂Cl₂(形式2)的高解析度XRD繞射圖。

第6圖*S_P*-4·CHCl₃(形式3)的高解析度XRD繞射圖。

第7圖*S_P*-4(形式4)的高解析度XRD繞射圖。

第8圖*S_P*-4(形式5)的高解析度XRD繞射圖。

第9圖 S_p -4(非晶質)的高解析度XRD繞射圖。

第10圖針對 S_p -4的X-射線晶體結構(形式1)。

第11圖針對 S_p -4·CH₂Cl₂的X-射線晶體結構(等向性)
(形式2)。

第12圖針對 S_p -4·CH₂Cl₂的X-射線晶體結構(異向性)
(形式2)。

第13圖針對 S_p -4·CHCl₃的X-射線晶體結構(形式3)。

第14圖4的FT-IR光譜。

第15圖 R_p -4的FT-IR光譜。

第16圖 S_p -4的FT-IR光譜。

第17圖4的TGA與DSC分析。

第18圖 R_p -4的TGA與DSC分析。

第19圖 S_p -4的TGA與DSC分析。

第20A圖針對8(S_p -異構物)的X-射線晶體結構(非對稱
單位之1號分子)。

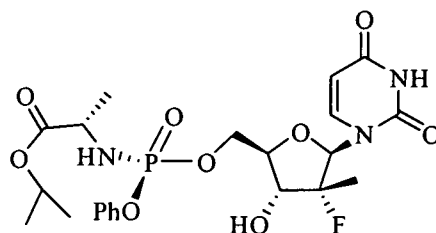
第20B圖針對8(S_p -異構物)的X-射線晶體結構(非對稱
單位之2號分子)。

【主要元件符號說明】

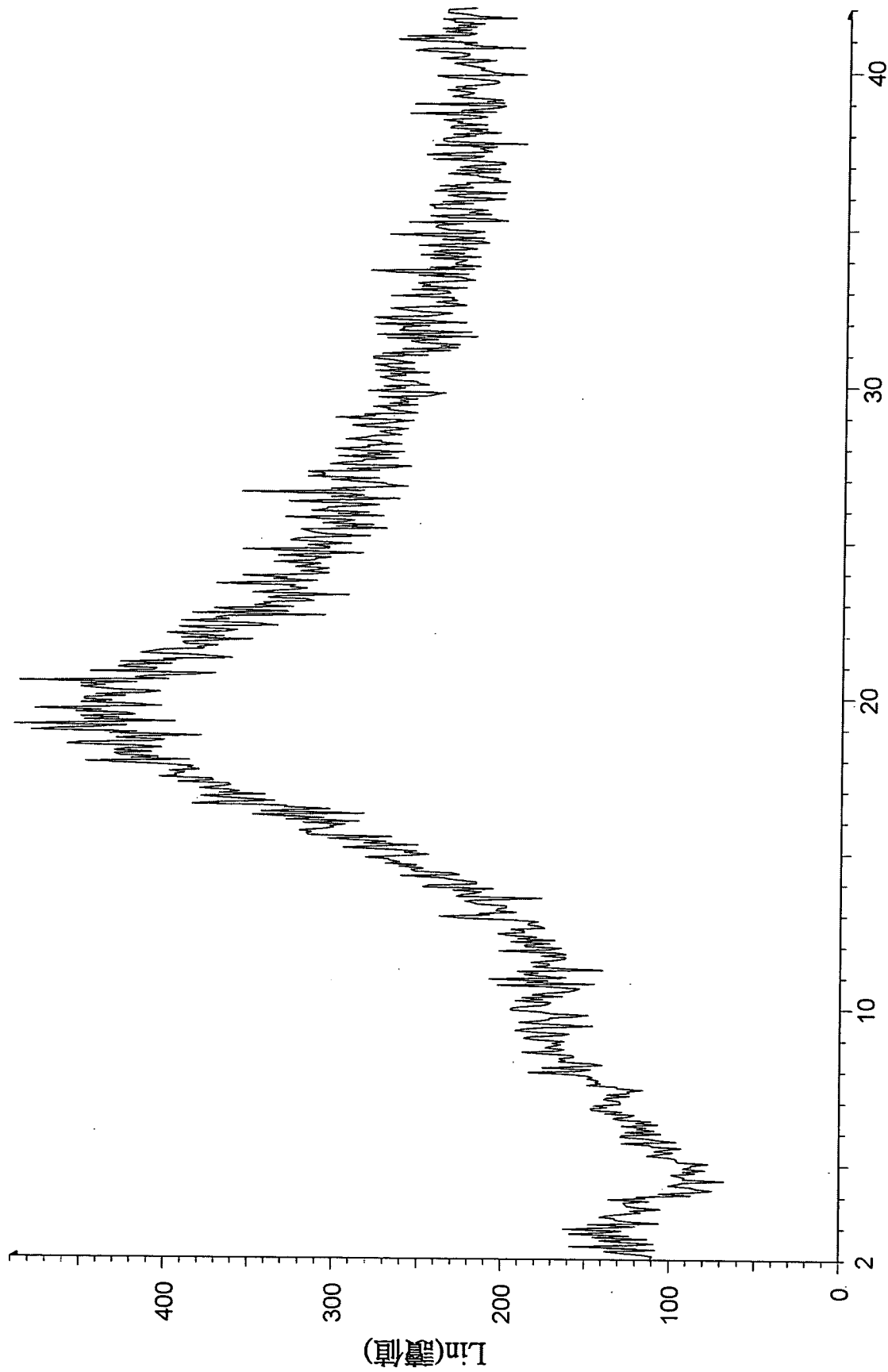
(無)

七、申請專利範圍：

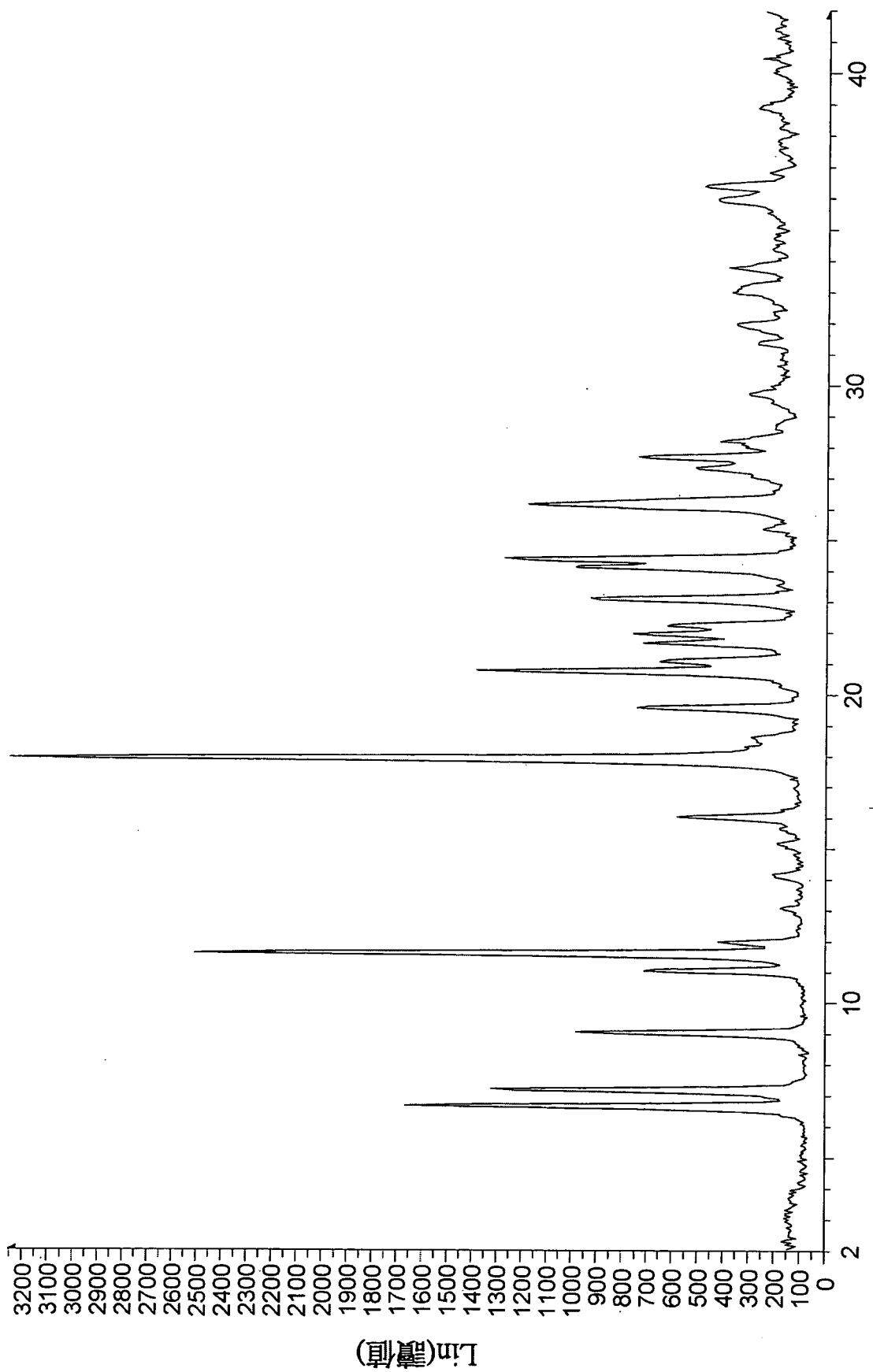
1. 一種由化學式 S_p-4 所示之結晶化合物：

 S_p-4

- ，其具有 XRPD 2 θ -反射角 ($\pm 0.2^\circ$) 於 5.0、7.3、9.4、及 18.1。
2. 如申請專利範圍第 1 項之結晶化合物，其中該化合物係具有下列單位晶格參數之單斜結晶 S_p-4 ：a $\sim$ 20.09Å、b $\sim$ 6.10 Å、c $\sim$ 23.01Å 以及 $\beta\sim$ 112.29°。
3. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項之化合物以及一種醫藥學上可接受之媒介。
4. 一種使用如申請專利範圍第 1 項之化合物於製造一藥物之用途，該藥物係用於治療 C 型肝炎病毒感染。

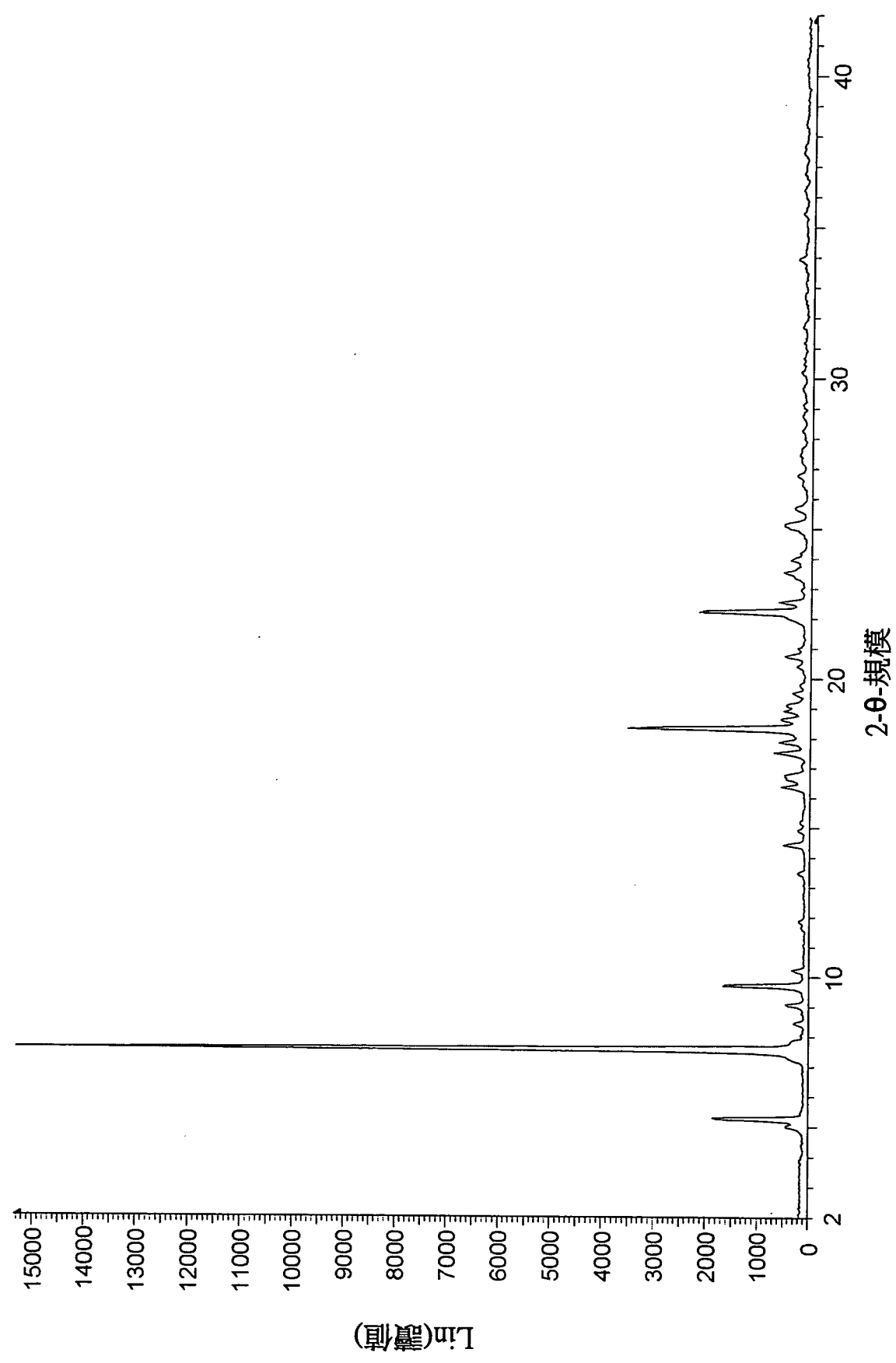


2-θ-規模
第1圖

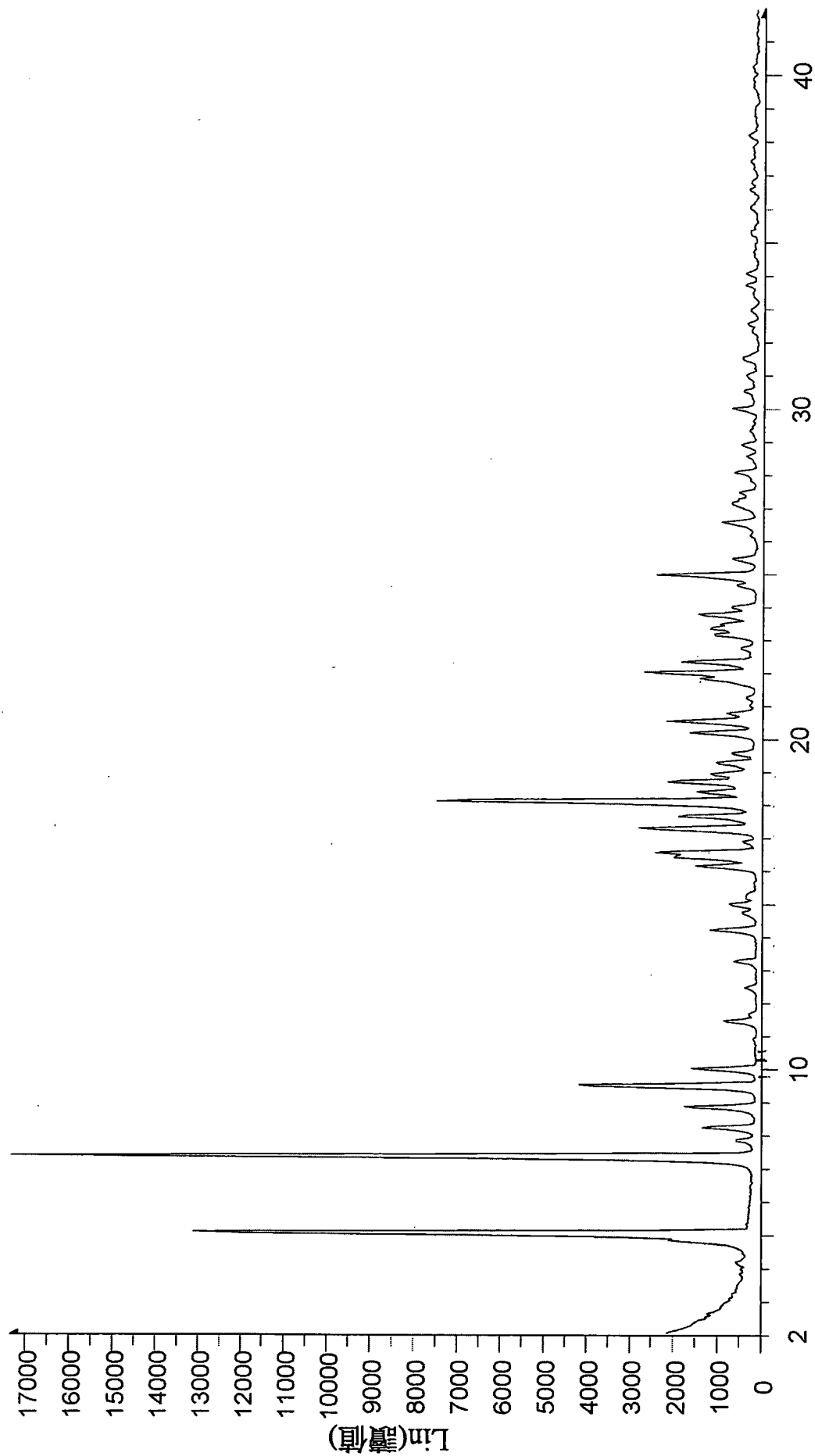


2-θ-規模

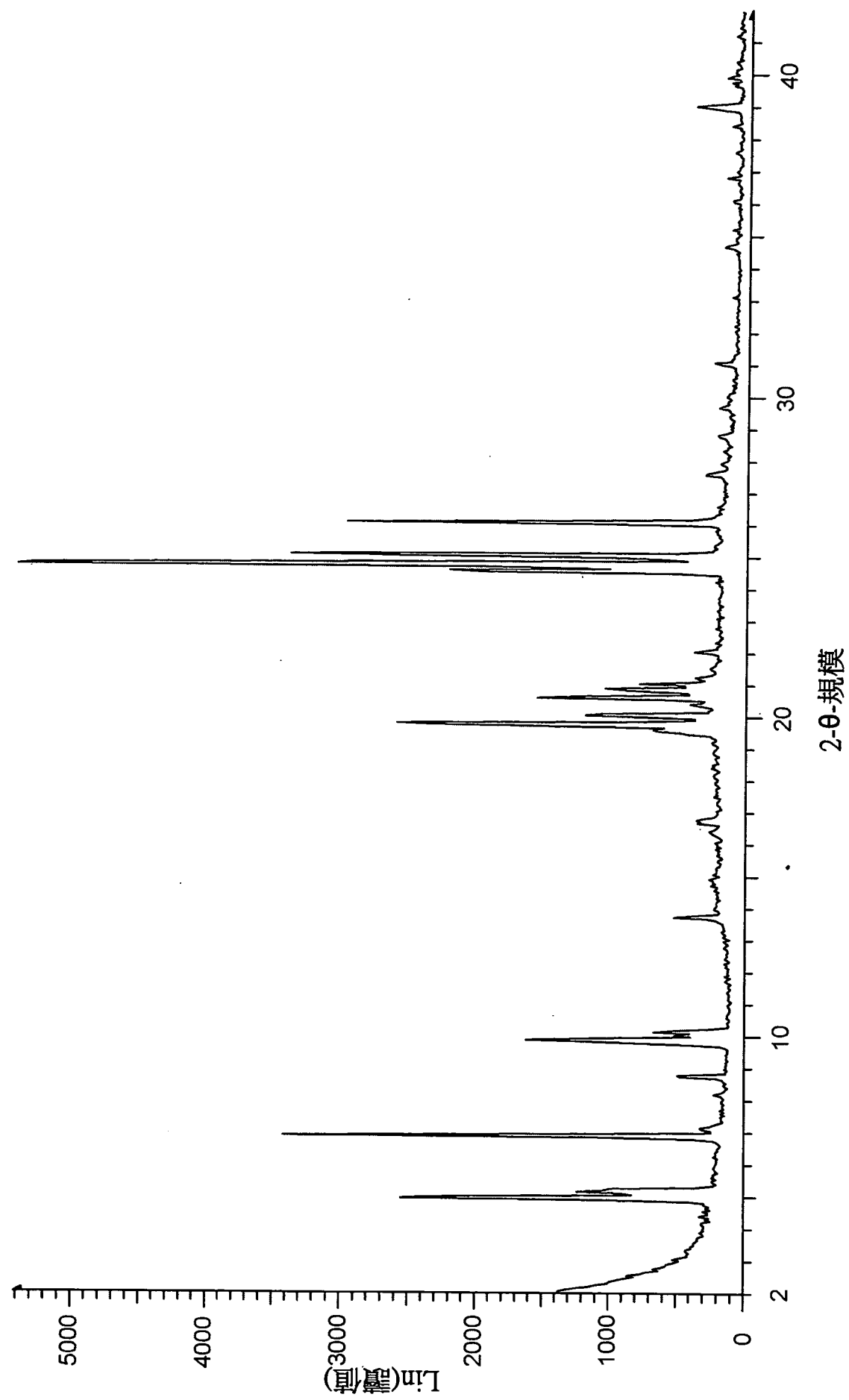
第2圖



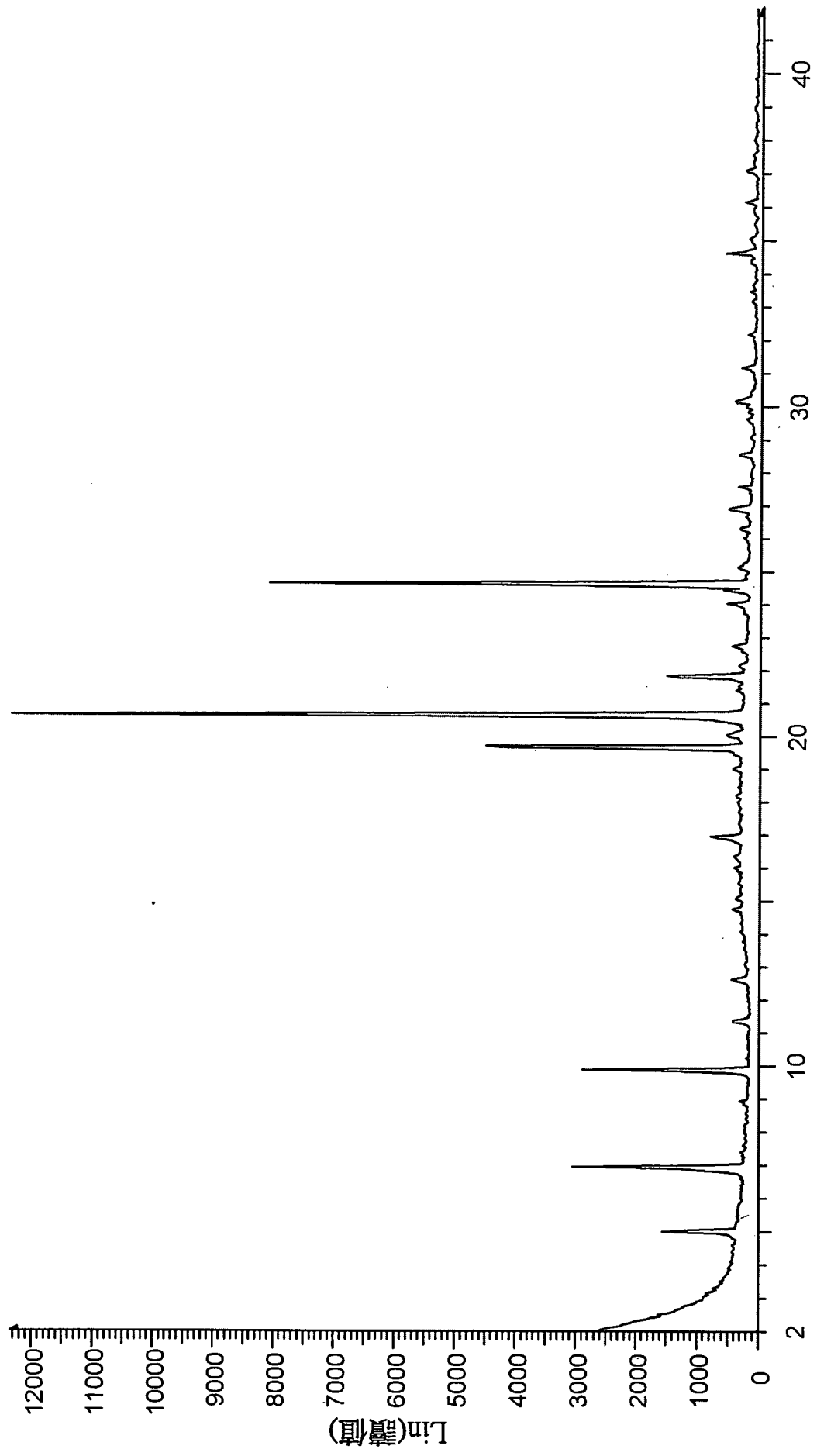
第3圖



第4圖

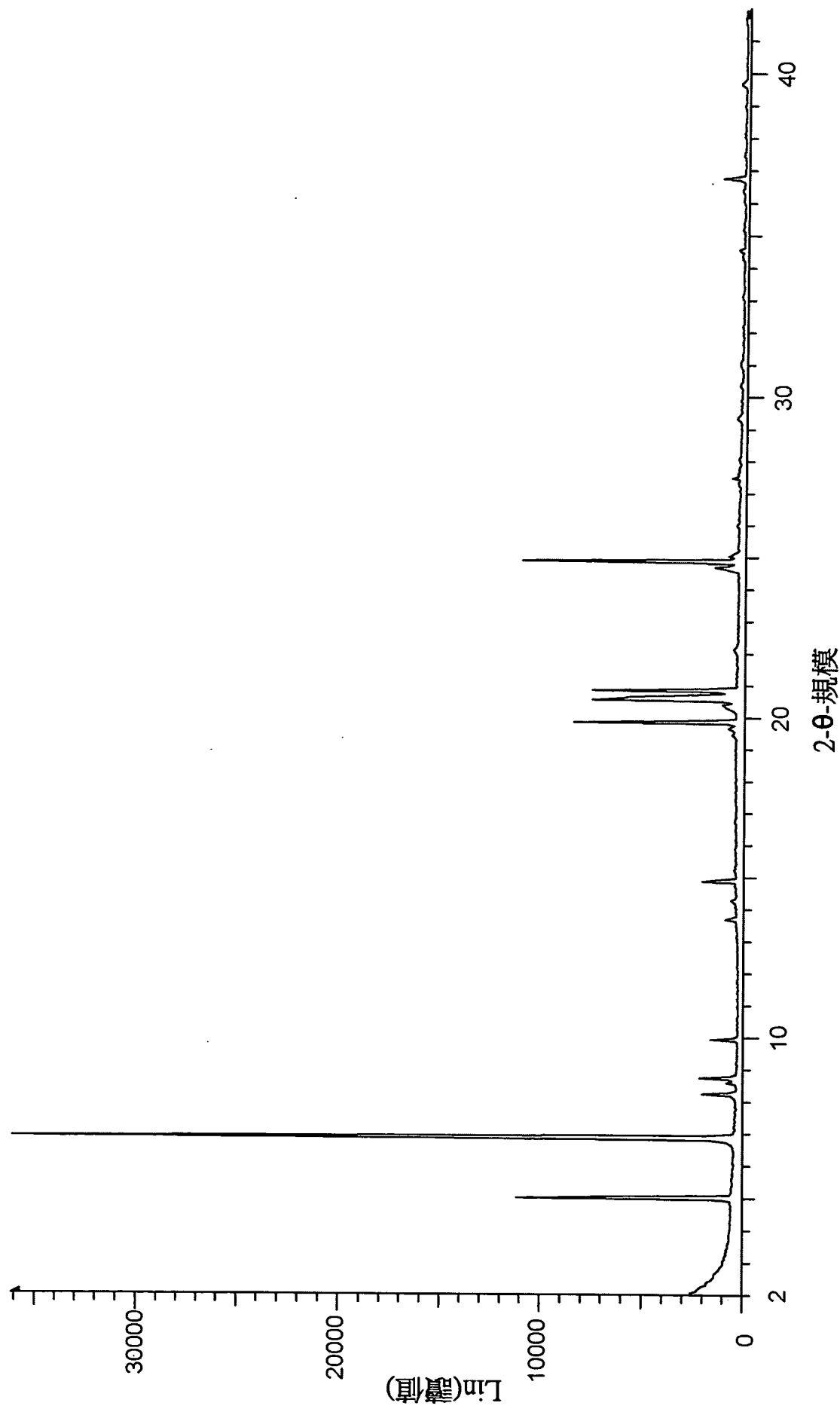


第5圖

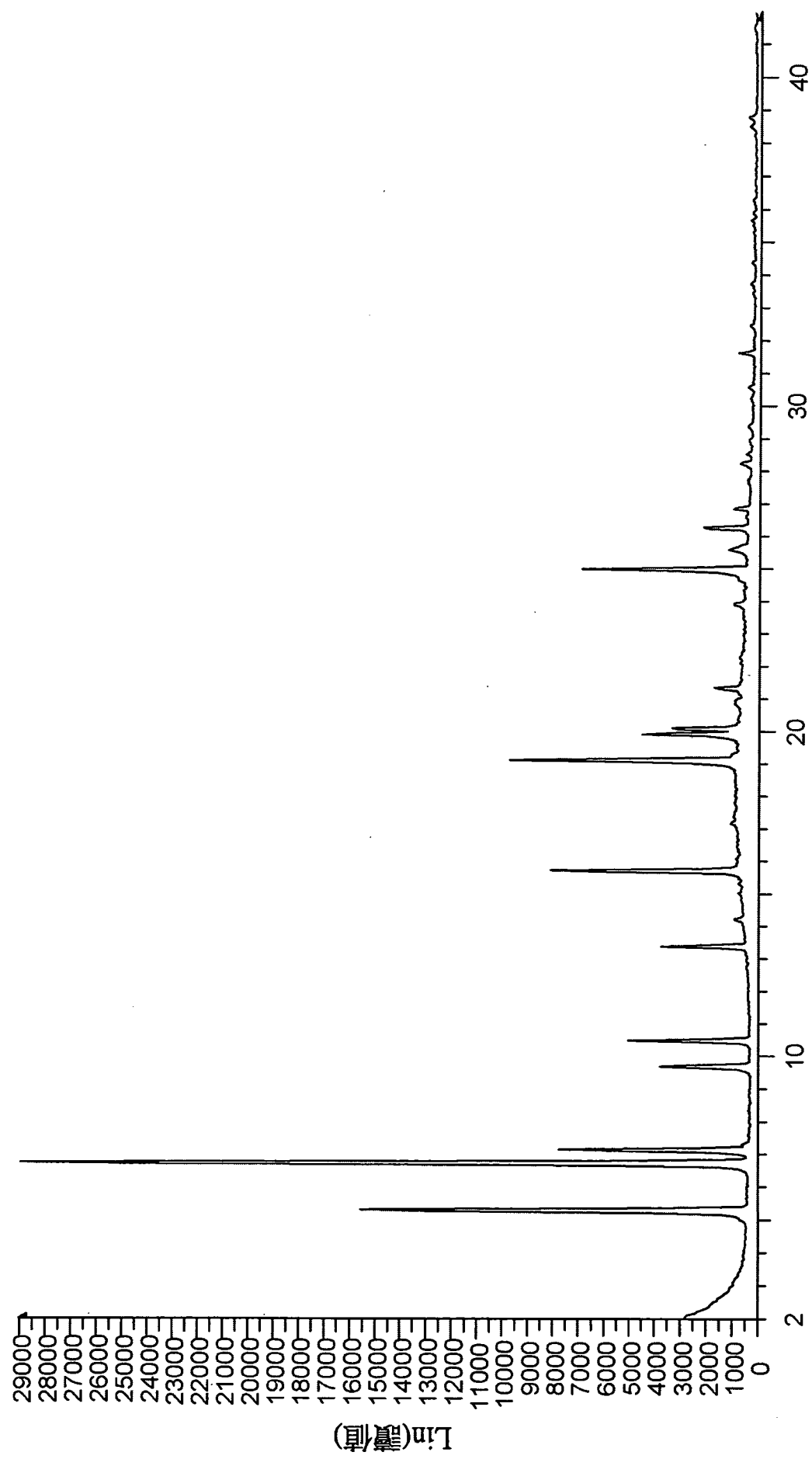


2-θ-規模

第6圖

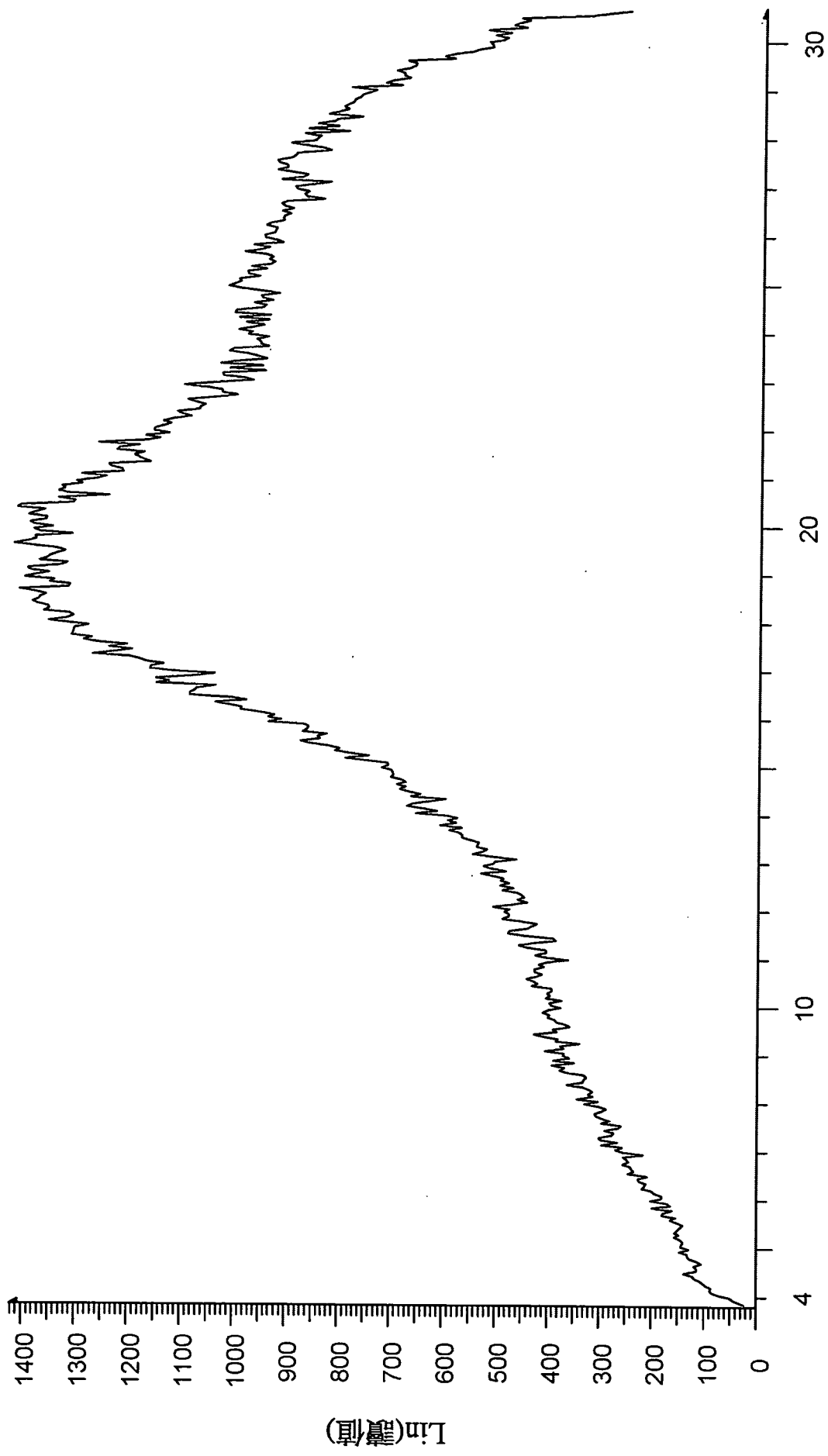


第7圖



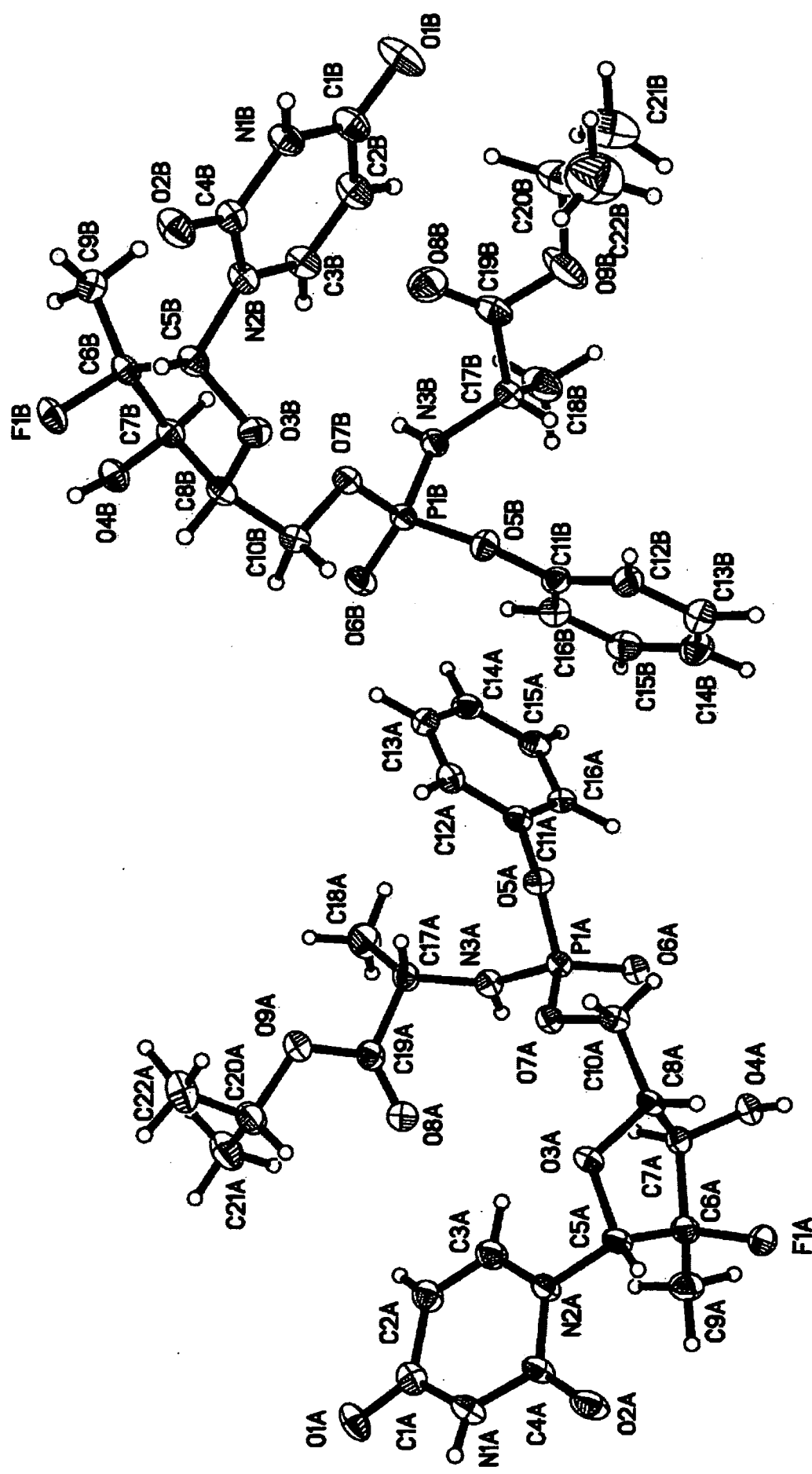
2-θ-規模

第8圖

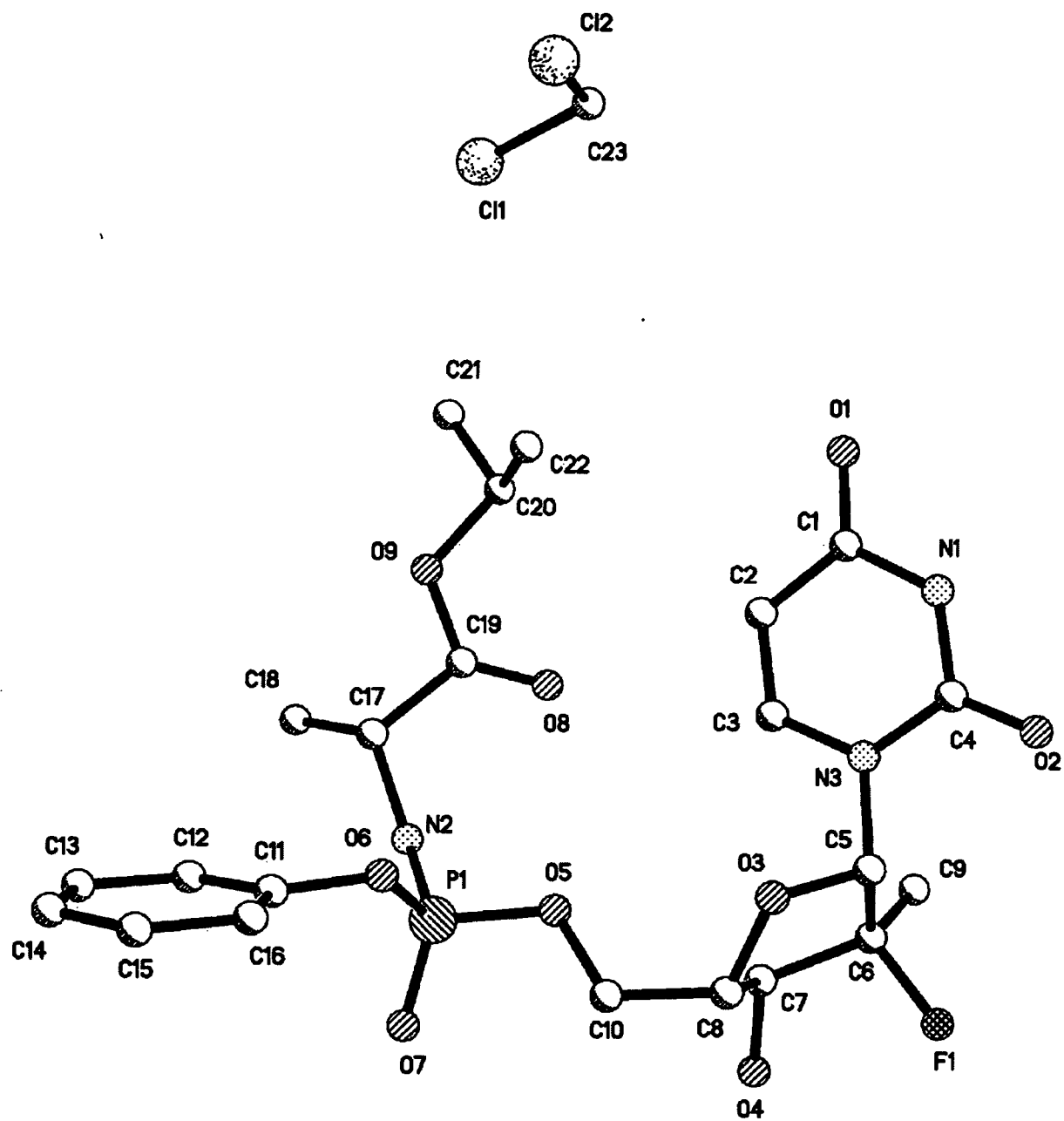


2-θ-規模

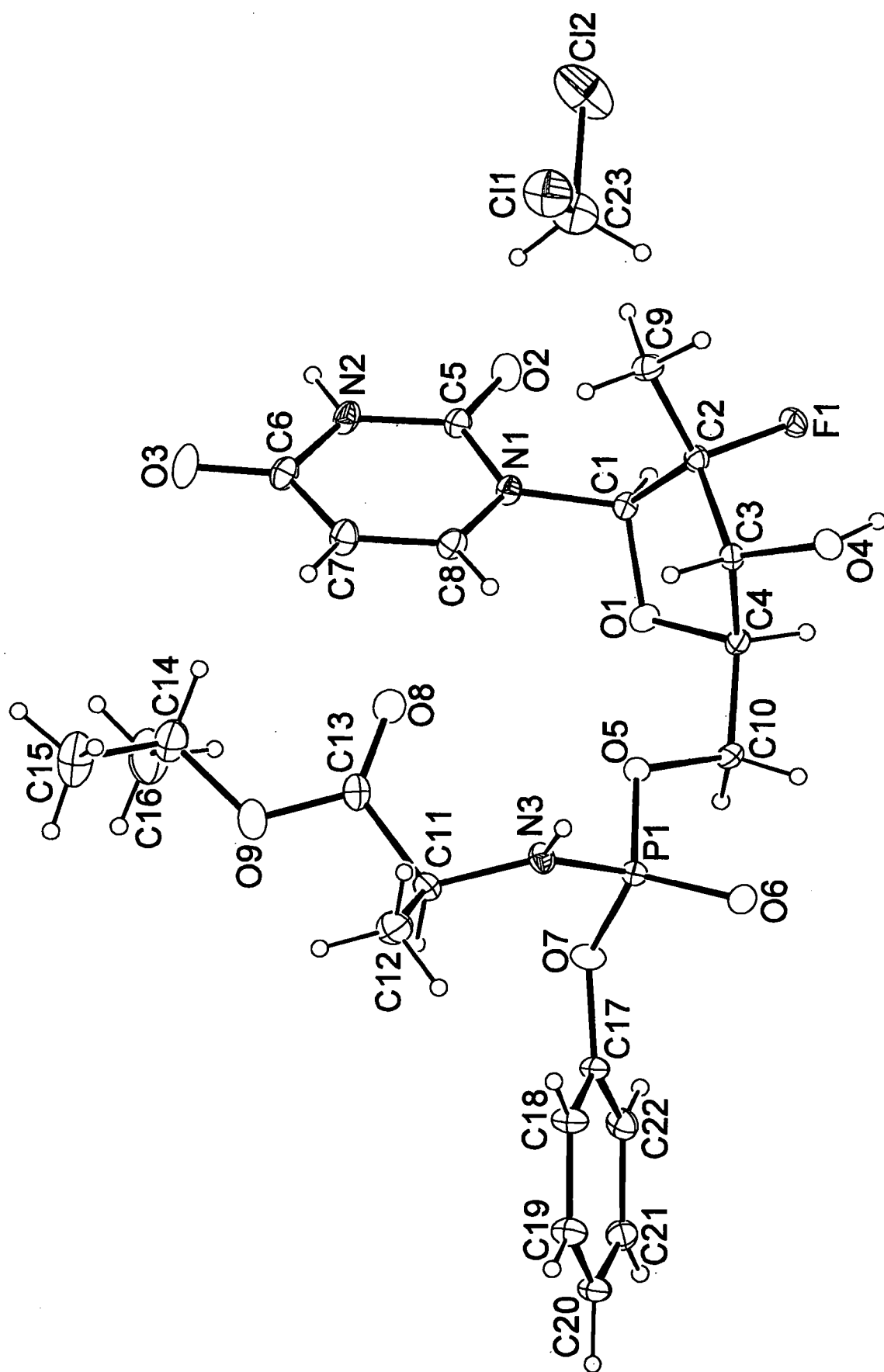
第9圖



第10圖



第11圖



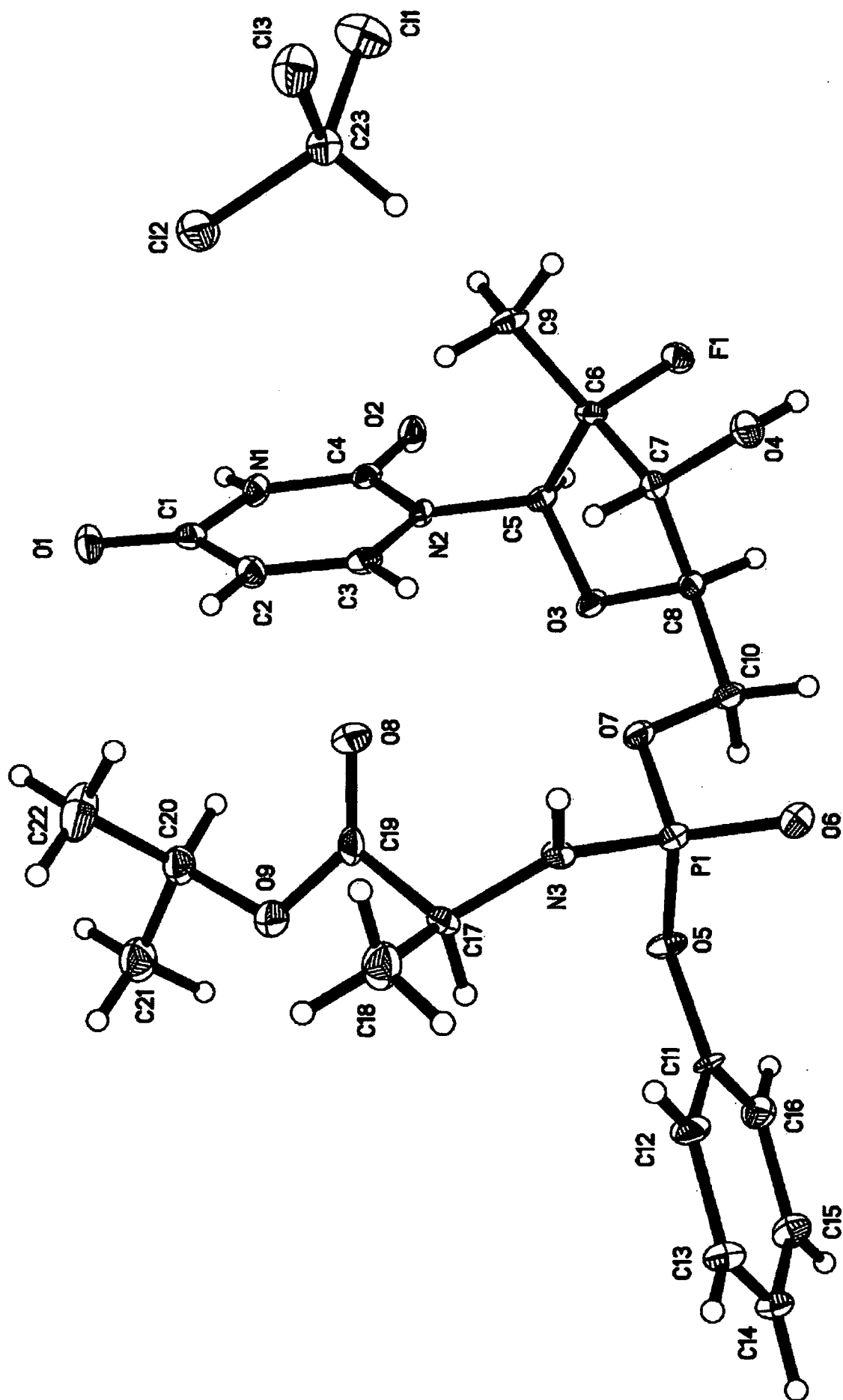
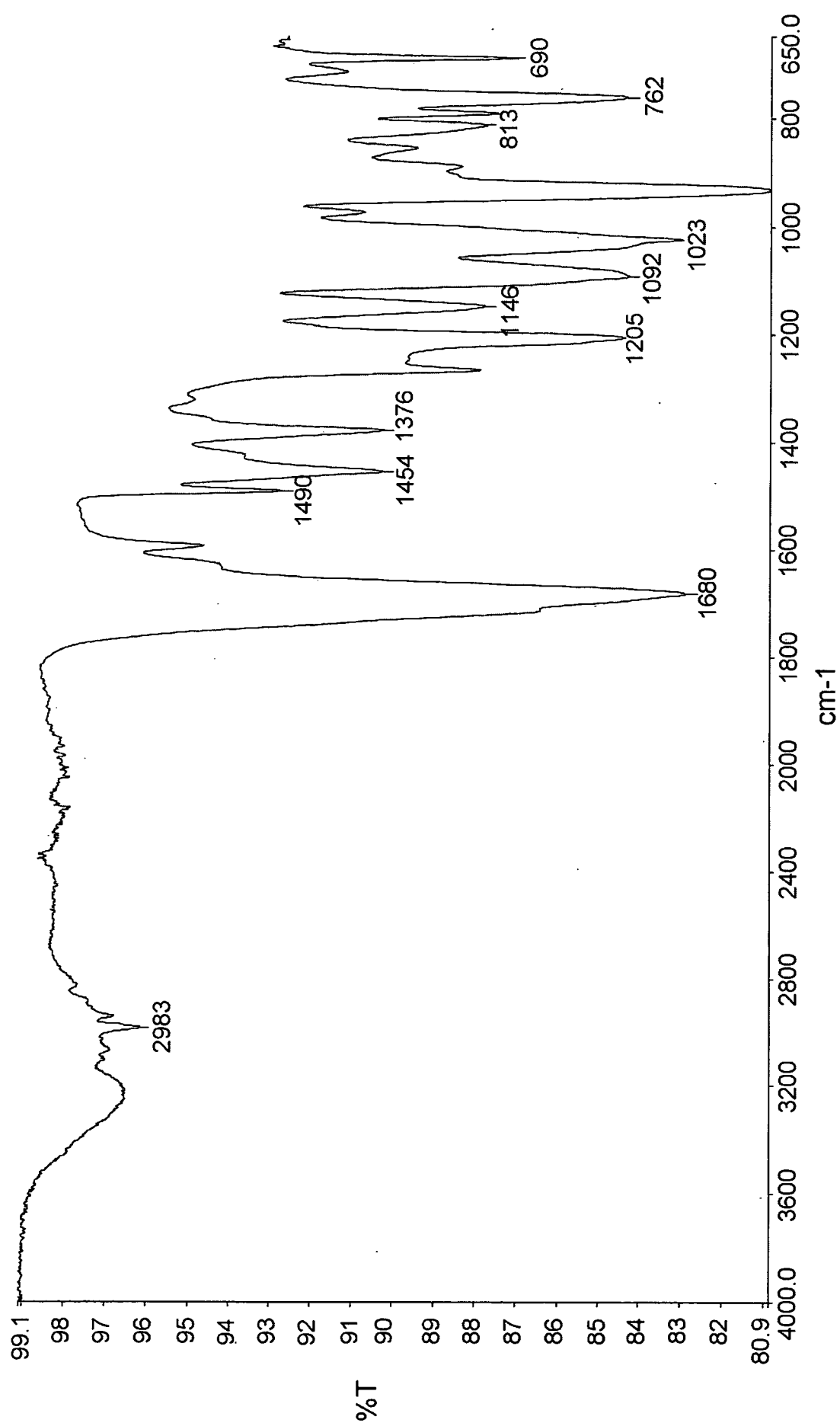
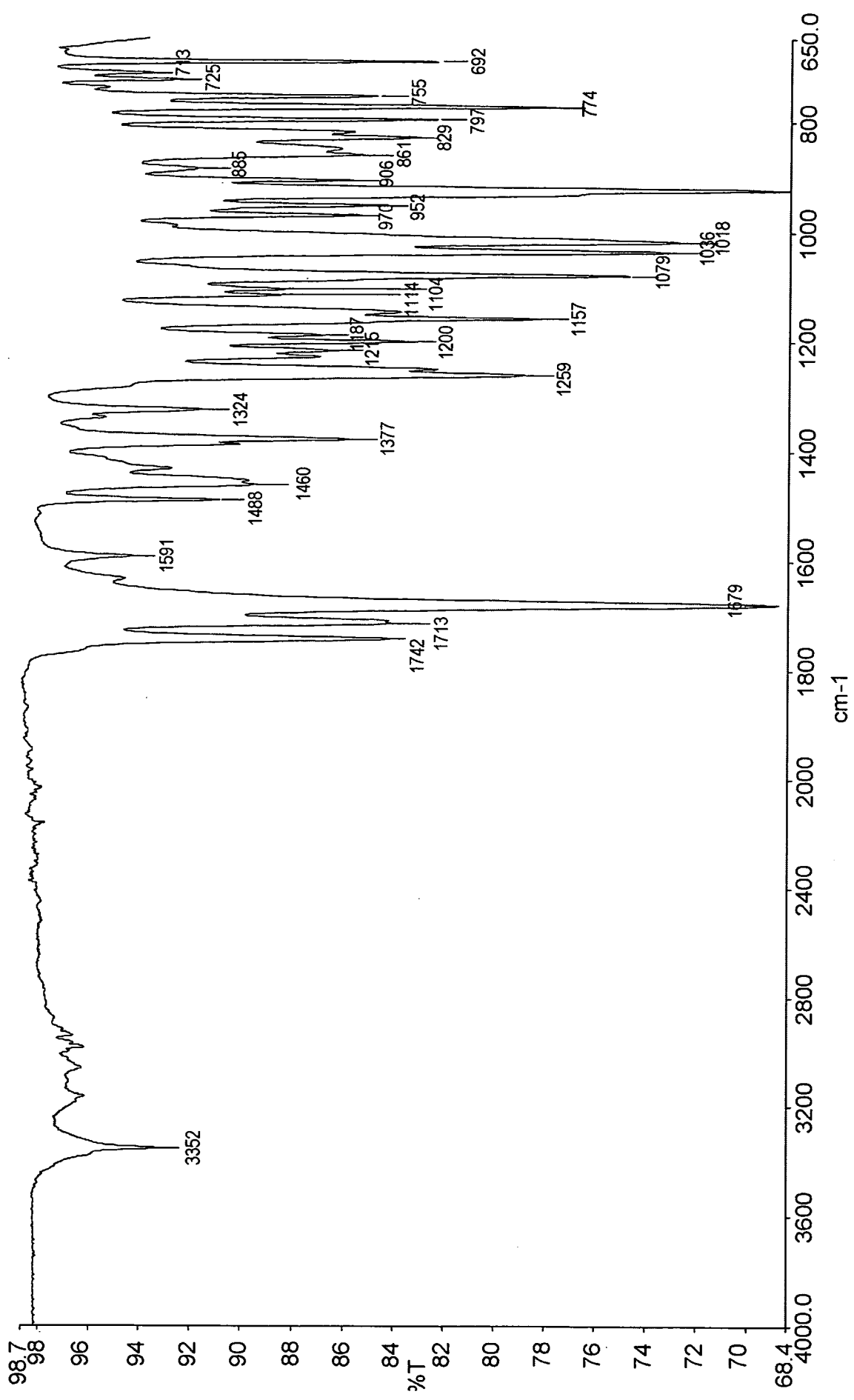


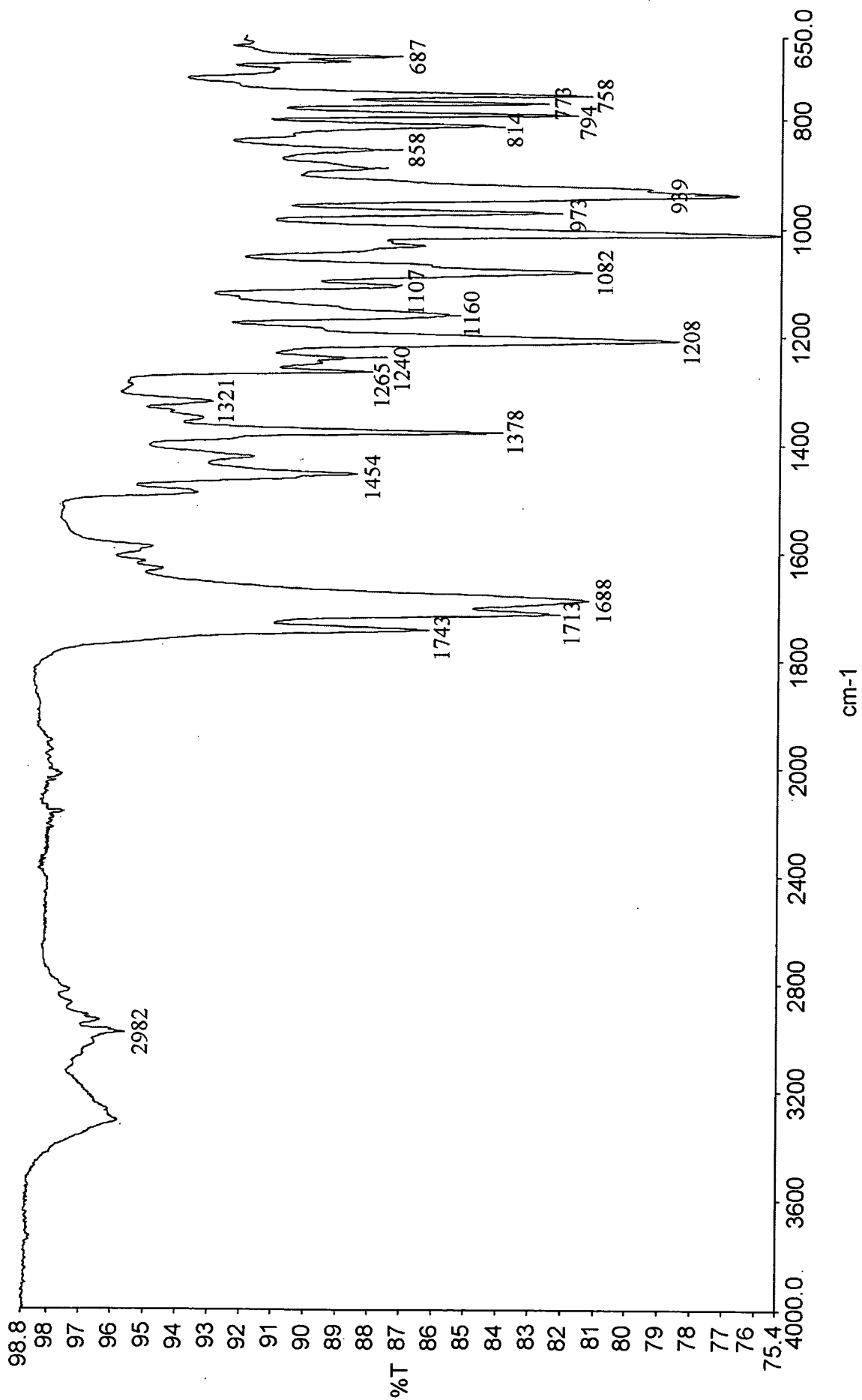
圖
第13



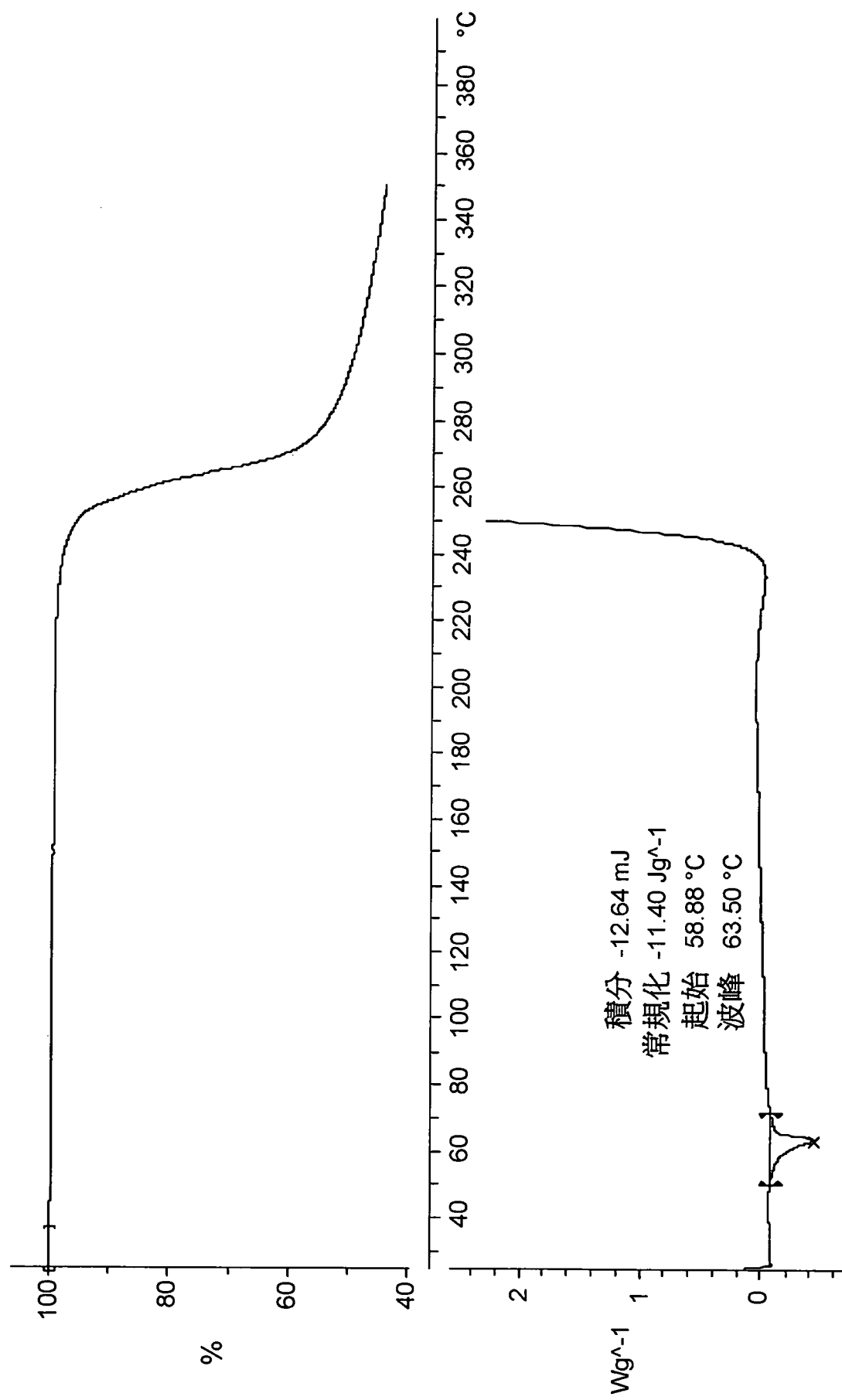
第14圖



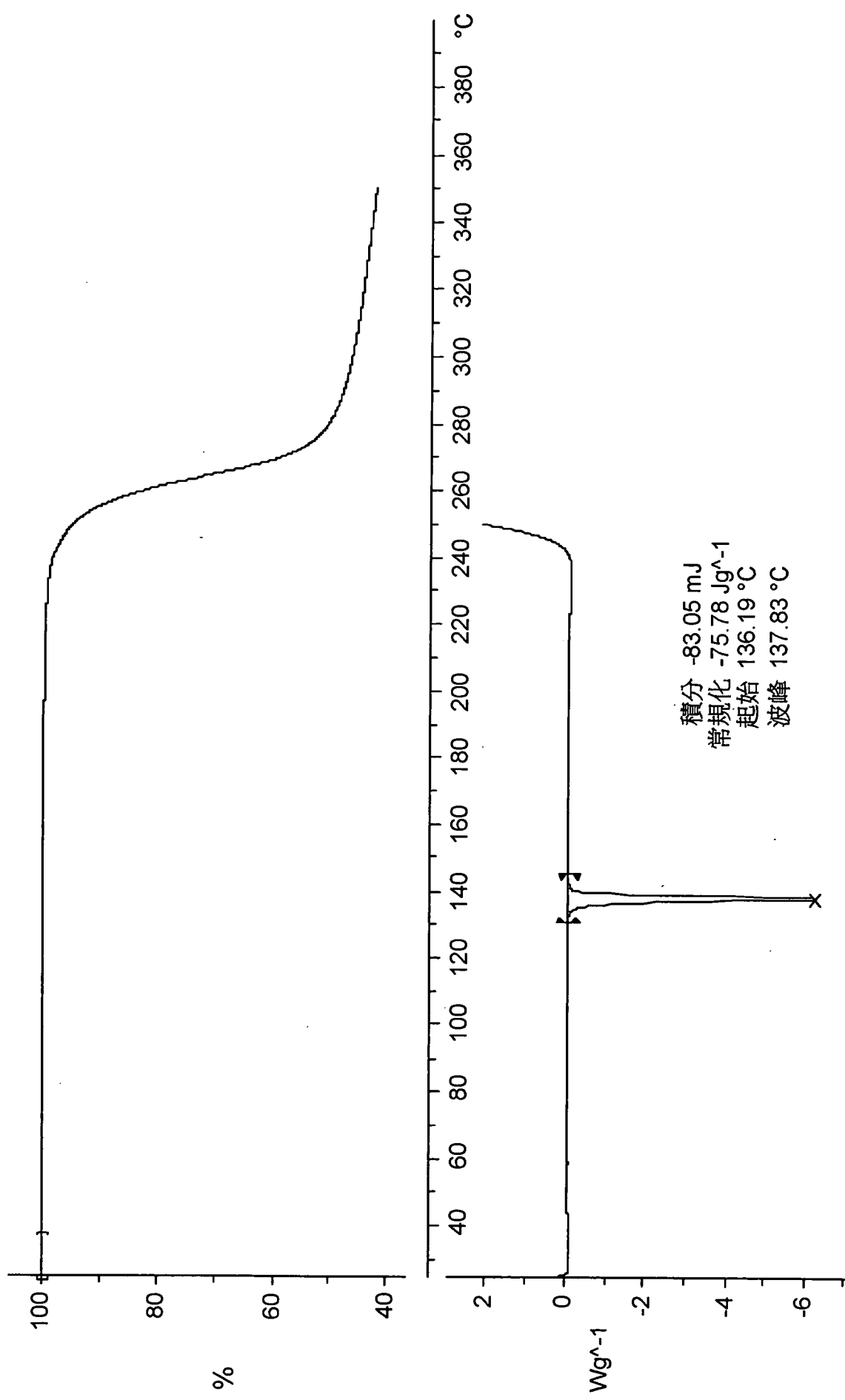
第15圖



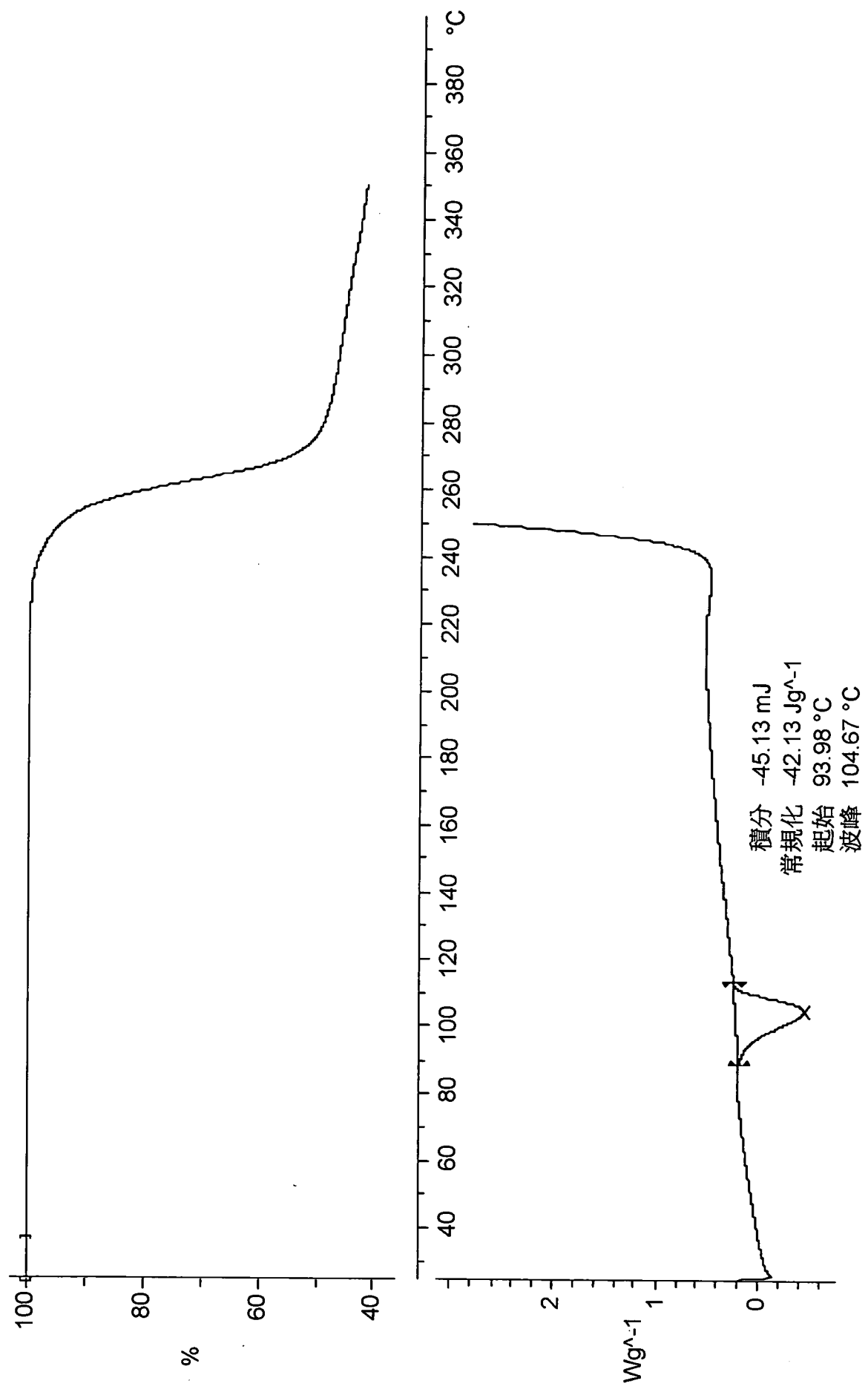
第16圖



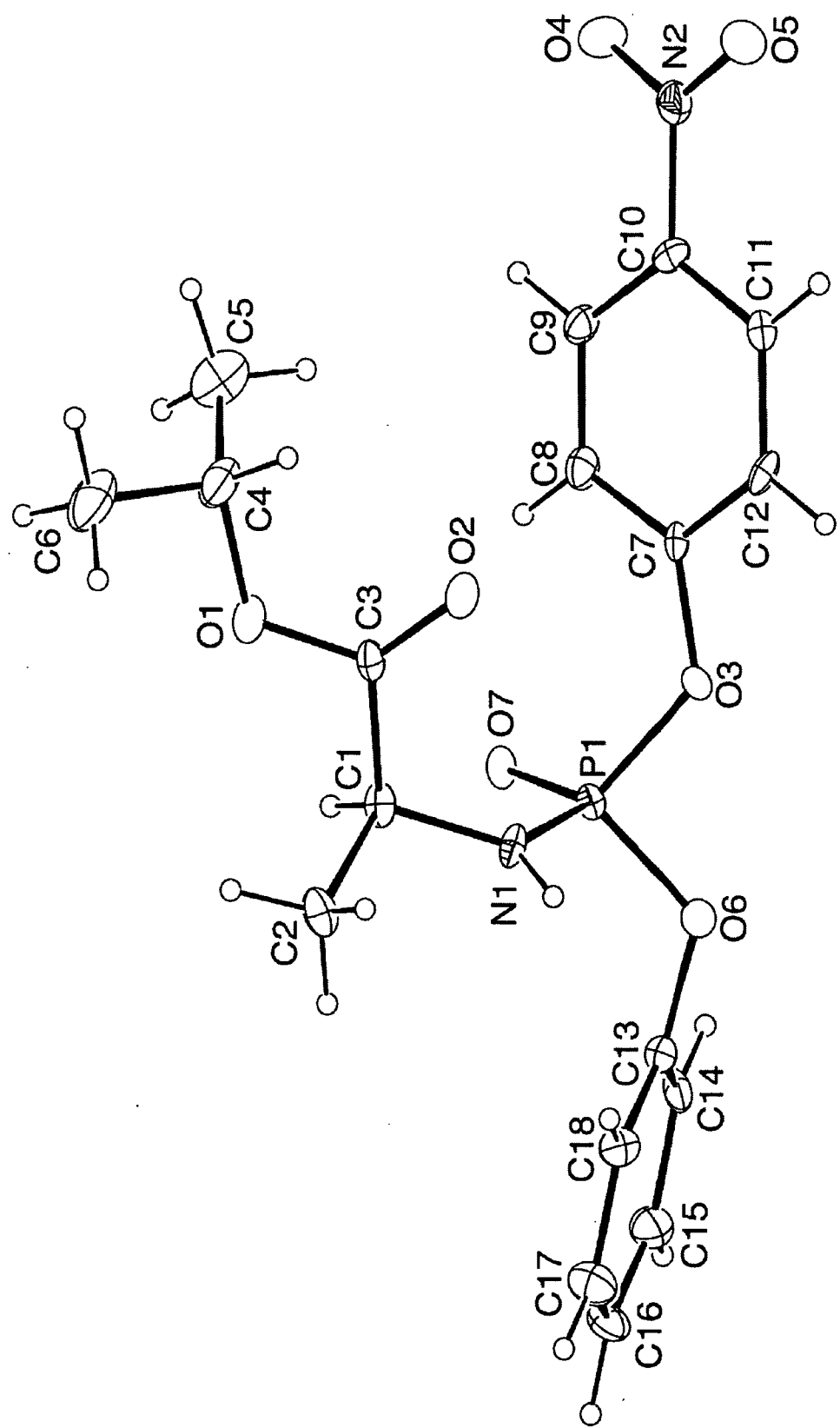
第17圖



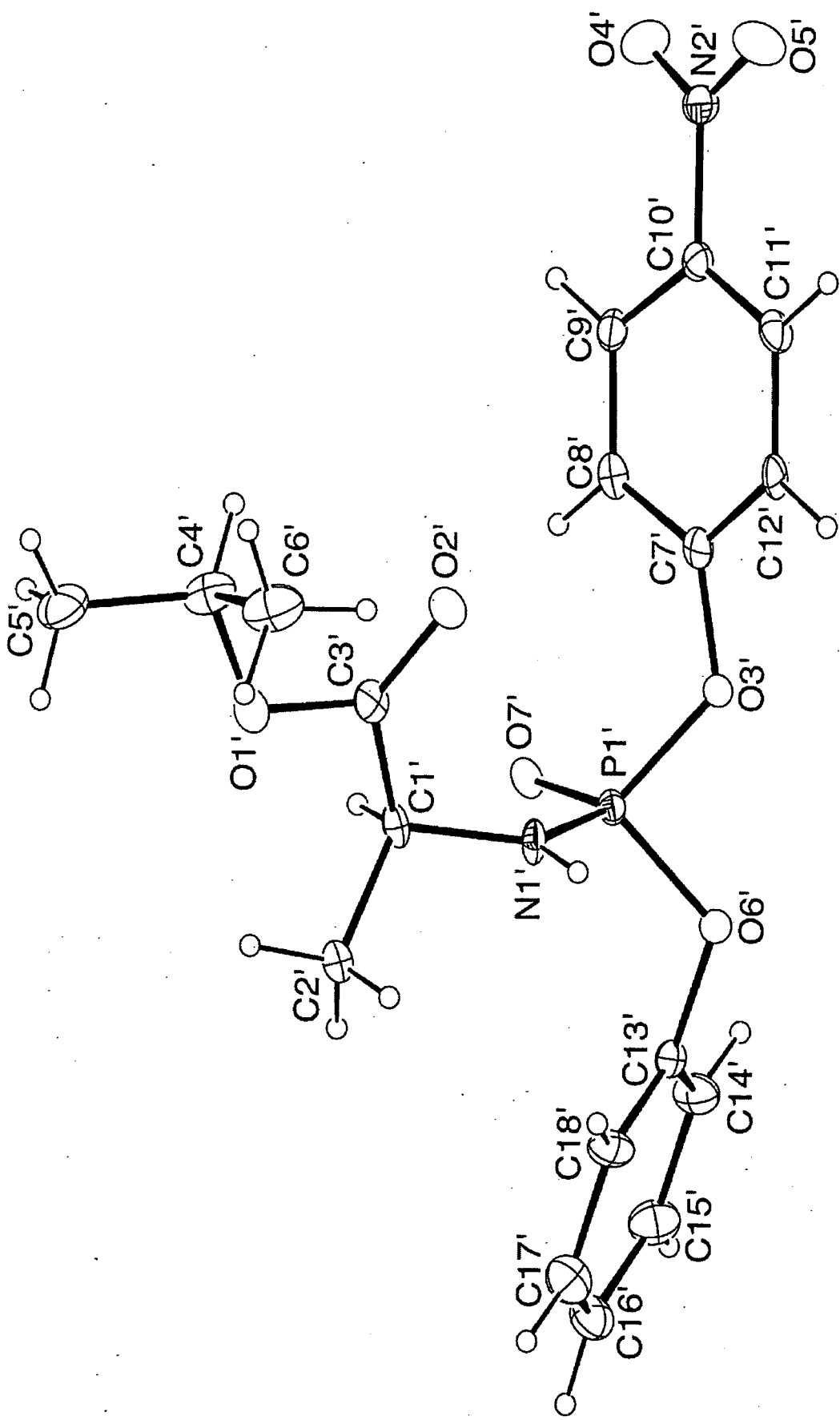
第18圖



第19圖



第20A圖



第20B圖