



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월16일

(11) 등록번호 10-1603817

(24) 등록일자 2016년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07H 19/10 (2006.01) A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01) C07H 19/073 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7030501

(22) 출원일자(국제) 2010년05월20일

심사청구일자 2013년01월24일

(85) 번역문제출일자 2011년12월20일

(65) 공개번호 10-2012-0034662

(43) 공개일자 2012년04월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/035641

(87) 국제공개번호 WO 2010/135569

국제공개일자 2010년11월25일

(30) 우선권주장

61/179,923 2009년05월20일 미국(US)

61/319,513 2010년03월31일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2008121634 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

길리어드 파마셋 엘엘씨

미국 캘리포니아주 94404 포스터 시티 레이크사이드 드라이브 333 길리어드 사이언시스 인코포레이티드 내

(72) 발명자

로스 브루스 에스.

미국 뉴저지주 08536 플레인스보로 케펠 로드 8

소피아 마이클 조셉

미국 펜실베이니아주 18902 도일스타운 앤틀러 드라이브 3066

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김은영

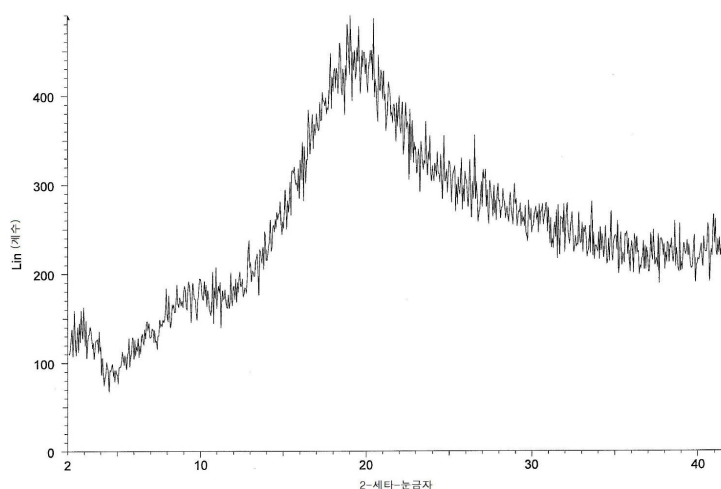
(54) 발명의 명칭 N-[(2'R)-2'-데옥시-2'-플루오로-2'-메틸-P-페닐-5'-우리딜일]-L-알라닌 1-메틸에틸 에스테르 및 이의 생산 방법

(57) 요약

화학식 4의 뉴클레오시드 포스포라미데이트 및 바이러스 질환을 치료하기 위한 작용제로서 그들의 용도가 본 명세서에서 개시된다. 이들 화합물은 RNA-의존성 5 RNA 바이러스 복제의 저해물질이고, 그리고 포유동물에서 HCV NS5B 중합효소의 저해물질로서, HCV 복제의 저해물질로서 및 C형 간염 감염의 치료에 유용하다. 또한, 화학식 4

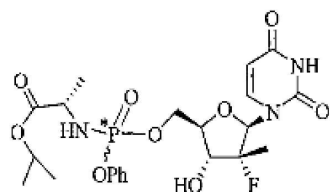
(뒷면에 계속)

대표도



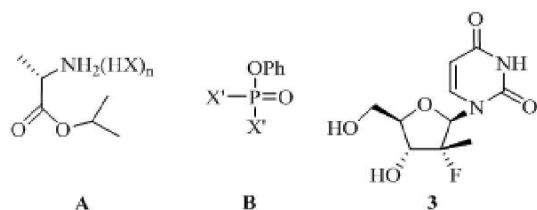
로 표시되는 화합물을 제조하는 방법이 개시되고, 상기 방법은 아래의 단계를 포함한다:

[화학식 4]



여기서 P*는 키랄 인 원자이다.

a) 이소프로필-알라네이트 (화학식 A), 디-X'-페닐포스페이트 (화학식 B), 2'-데옥시-2f-플루오로-2'-C-메틸우리딘 (화학식 3), 그리고 염기를 반응시켜 4를 포함하는 첫 번째 혼합물을 획득하는 단계;



여기서 X는 산의 짝염기이고, n은 0 또는 1이고, 그리고 X'는 할로젠이다.

b) 첫 번째 혼합물을 보호 화합물과 반응시켜 4를 포함하는 두 번째 혼합물을 획득하는 단계; 그리고

c) 4를 획득하기 위하여, 두 번째 혼합물을 선택적으로 결정화, 크로마토그래피, 또는 추출하는 단계.

(72) 발명자

파무라파티 가나파티 레디

미국 뉴저지주 08536 플레인즈보로 헌터스 글렌 드
라이브 4608

라차콘다 수구나

미국 뉴저지주 08691 로빈스빌 버넷 크레센트 144

장 하이-웬

미국 메릴랜드주 21043 엘리컷 시티 마나한 드라이브
8680

천병권

미국 뉴저지주 08691 로빈스빌 헤리티지 스트리트
135

왕페이유안

미국 뉴저지주 07452 글렌 록 라드번 로드 20

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

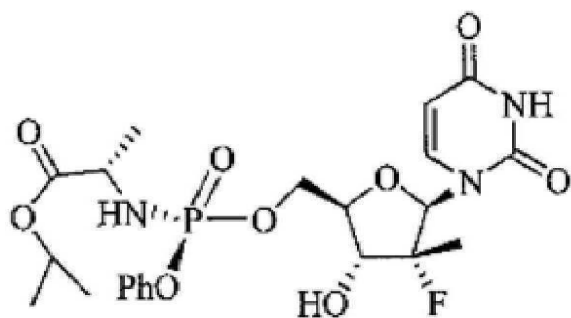
청구항 61

삭제

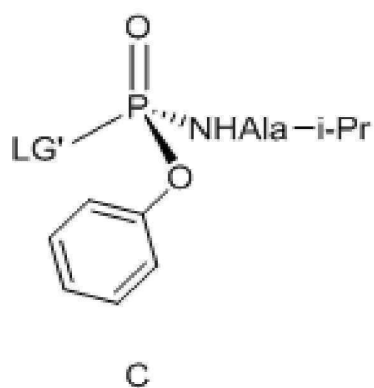
청구항 62

하기 화학식 S_p-4 로 표시되는 화합물을 제조하는 방법에 있어서,

[화학식 S_p-4]

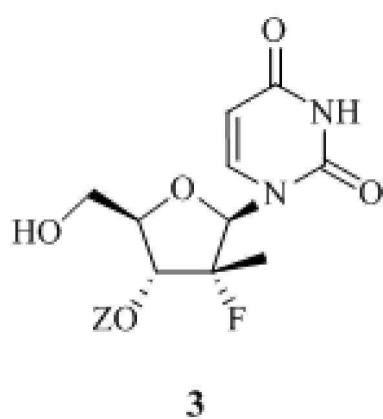


아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:



(여기서 LG'는 p-니트로페녹시드, p-클로로페녹시드, o-클로로페녹시드, 2,4-디니트로페녹시드, 또는 펜타플루오로페녹시드이다)

- i) 상기 화합물 C를 염기성 시약과 함께, Z가 수소인 하기 화합물 3과 반응시켜 S_p-4를 획득하는 단계; 또는
- ii) 상기 화합물 C를 염기성 시약과 함께, Z가 보호기인 하기 화합물 3과 반응시키고, 탈보호하여 S_p-4를 획득하는 단계.



청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

청구항 62에 있어서,

LG'는 p-니트로페녹시드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

청구항 62에 있어서,

LG'는 펜타플루오로페녹시드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 미국을 제외한 모든 지정국에서 출원인으로서 미국 국적 기업인 파마셋 인코포레이티드, 그리고 미국에서만 출원인으로서 미국 시민권자인 마이클 조셉 소피아와 브루스 에스 로스, 인도 시민권자인 가나파티 레디 파무라파티와 수구나 라차콘다, 미국 시민권자인 하이-렌 장, 대한민국 시민권자인 천 병권, 그리고 중국 시민권자인 페이유안 왕의 이름으로, PCT 국제출원으로서 2010년 5월 20일 제출되고, 그리고 2009년 5월 20일 제출된 미국 가출원 번호 61/179,923 및 2010년 3월 31일 제출된 미국 가출원 번호 61/319,513에 우선권을 주장하고, 이들의 요부는 본 발명에 온전히 참조로서 병합된다.

[0002] 본 발명의 기술분야

[0003] 뉴클레오시드 포스포라미데이트 및 바이러스 질환을 치료하기 위한 작용제로서 그들의 용도가 본 명세서에서 개시된다. 이들 화합물은 RNA-의존성 RNA 바이러스 복제의 저해물질이고, 그리고 포유동물에서 HCV NS5B 중합효소의 저해물질로서, HCV 복제의 저해물질로서 및 C형 간염 감염의 치료에 유용하다.

배경 기술

[0004] C형 간염 바이러스 (HCV) 감염은 세계 인구의 2-15%인 것으로 추정되는 상당한 수의 감염된 개체에서, 만성 간 질환, 예를 들면, 간경변증 및 간세포 암종을 유발하는 주요한 보건 문제이다. 미국 질병관리본부에 따르면, 미국에서만 4500만 명의 감염자가 존재하는 것으로 추정된다. 세계보건기구에 따르면, 전세계적으로 2억 명 이상의 감염자가 존재하고, 적어도 3 내지 4백만 명의 사람이 매년 감염되고 있다. 일단 감염되면, 대략 20%의 사람은 바이러스를 제거하지만, 나머지는 그들의 평생 동안 HCV 보균자가 될 수 있다. 만성적으로 감염된 사람의 10 내지 20%는 궁극적으로, 간-과파 경변증 또는 암이 발병한다. 바이러스 질환은 오염된 혈액과 혈액 제품, 오염된 바늘에 의해 비경구로 전염되거나, 또는 성관계로 및 감염된 모체 또는 보균자 모체에서 그들의 자손으로 수직적으로 전염된다. HCV 감염에 대한 현재의 치료 방법들은 재조합 인터페론- α 를 단독으로 사용하거나 뉴클레오시드 유사체인 리바비린과 조합하여 사용하는 면역요법들에 한정되어 있으며 이들의 임상적 이점도 제한되어 있다. 게다가, HCV에 대한 확립된 백신이 존재하지 않는다. 결과적으로, 만성 HCV 감염을 효과적으로 억제하는 향상된 치료제가 시급하게 요구된다.

[0005] HCV 비리온은 대략 3,010개 아미노산의 다중단백질 (polyprotein)을 인코딩하는 대략 9600개 염기의 단일 올리고리보뉴클레오타이드 게놈 서열을 보유하는 외피 양성-가닥 (enveloped positive-strand) RNA 바이러스이다. HCV 유전자의 단백질 산물은 구조 단백질 C, E1, 그리고 E2로 구성되고, 그리고 비-구조 단백질 NS2, NS3, NS4A와 NS4B, 그리고 NS5A와 NS5B로 구성된다. 비구조 (NS) 단백질은 바이러스 복제를 위한 촉진 기구 (catalytic machinery)를 제공하는 것으로 생각된다. NS3 프로테아제는 다중단백질 사슬로부터 RNA-의존성 RNA 중합효소인 NS5B를 방출한다. HCV NS5B 중합효소는 HCV의 복제 주기 (replication cycle)에서 주형으로서 기능하는 단일-가닥 바이러스 RNA로부터 이중-가닥 RNA의 합성에 요구된다. 이런 이유로, NS5B 중합효소는 HCV 복제 복합체에서 필수 성분인 것으로 간주된다 (K. Ishi, et al, *Heptology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118). HCV NS5B 중합효소의 저해는 이중-가닥 HCV RNA의 형성을 예방하고, 따라서 HCV-특이적 항바이러스 치료제의 개발에 매력적인 접근법을 제공한다.

[0006] HCV는 많은 공통 특징을 공유하는 바이러스의 훨씬 큰 과(科)에 속한다.

[0007] 플라비비리데 바이러스

[0008] 플라비비리데과 (flaviviridae family)의 바이러스는 적어도 3가지 상이한 속 (genus)을 포함한다: *페지열병 바이러스 (pestivirus)*, 이들은 소와 돼지에서 질환을 유발한다; *플라비바이러스 (flavivirus)*, 이들은 뎅기열 및 황열과 같은 질환의 주요 원인이다; 그리고 *헤파시바이러스 (hepacivirus)*, 이들의 유일한 구성원은 HCV이다. 플라비바이러스 속에는 혈청학적 관련성 (serological relatedness)에 기초하여 군으로 분리되는 68개 이상의 구성원이 포함된다 (Calisher et al., *J. Gen. Virol.*, 1993, 70, 37-43). 임상적 증상은 다양하고 열병, 뇌염 (encephalitis) 및 출혈열 (hemorrhagic fever)을 포함한다 (*Fields Virology*, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., 그리고 Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). 인간 질환과 연관되는 전세계적으로 우려되는 플라비바이러스에는 뎅기 출혈열 바이러스 (DHF), 황열

바이러스, 쇼크 신드롬 (shock syndrome) 및 일본 뇌염 바이러스가 포함된다 (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).

[0009]

돼지열병 바이러스 속에는 소 바이러스성 설사 바이러스 (BVDV), 고전적인 돼지열 바이러스 (CSFV, 일명 돼지 콜레라 바이러스) 및 양의 경계 질환 바이러스 (BDV)가 포함된다 (Moennig, V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). 가축 (소, 돼지 및 양)의 돼지열병 바이러스 감염은 전세계적으로 상당한 경제적 손실을 유발한다. BVDV는 소에서 점막 질환을 유발하고 축산업에서 경제적으로 상당히 중요하다 (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). 인간 돼지열병 바이러스는 동물 돼지열병 바이러스만큼 광범위하게 특성화되지 않았다. 하지만, 혈청학적 조사는 인간에서 상당한 돼지열병 바이러스 노출을 나타낸다.

[0010]

돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스는 플라비비리대과 내에서 밀접하게 관련된 바이러스 군이다. 플라비비리대과 내에서 다른 밀접하게 관련된 바이러스에는 GB 바이러스 A, GB 바이러스 A-유사 병원체, GB 바이러스-B 및 GB 바이러스-C (일명, G형 간염 바이러스, HGV)가 포함된다. 헤파시바이러스 기 (C형 간염 바이러스; HCV)는 인간을 감염시키는 다수의 밀접하게 관련되지만 유전자형에서 구별되는 바이러스로 구성된다. 적어도 6개 HCV 유전자형 (genotype) 및 50개 이상의 아류형 (subtype)이 존재한다. 세포 배양액에서 효율적으로 성장하는 헤파시 바이러스의 불량한 능력과 함께, 돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스 사이에 유사성으로 인하여, 소 바이러스성 설사 바이러스 (BVDV)는 HCV 바이러스를 연구하기 위한 대용물 (surrogate)로서 종종 이용된다.

[0011]

돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스의 유전적 체계 (genetic organization)는 매우 유사하다. 이들 양성 가닥 RNA 바이러스는 바이러스 복제에 필요한 모든 바이러스 단백질을 인코딩하는 단일의 큰 개방 해독 틀 (open reading frame, ORF)을 보유한다. 이들 단백질은 발현과 동시에 및 발현 이후에 세포 및 바이러스-인코딩된 프로테아제 둘 모두에 의해 가공되는 다중단백질로서 발현되고 성숙 바이러스 단백질이 산출된다. 바이러스 게놈 RNA의 복제를 담당하는 바이러스 단백질은 대략 카르복시-말단 내에 위치한다. ORF의 2/3는 비구조 (NS) 단백질로 명명된다. 돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스에 대한 ORF의 비구조 단백질 부분의 유전적 체계 및 다중단백질 가공은 매우 유사하다. 돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스 둘 모두에서, 성숙 비구조 (NS) 단백질은 비구조 단백질 코딩 영역의 아미노-말단에서 ORF의 카르복시-말단으로 순차적인 순서로, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, 그리고 NS5B로 구성된다.

[0012]

돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스의 NS 단백질은 특정 단백질 기능에 특징적인 서열 도메인을 공유한다. 가령, 양쪽 군에서 바이러스의 NS3 단백질은 세린 프로테아제 및 헬리카아제 (helicase)에 특징적인 아미노산 서열 모티프를 보유한다 (Gorbalenya et al., *Nature*, 1988, 333, 22; Bazan and Fletterick *Virology*, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya et al., *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3889-3897). 유사하게, 돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스의 NS5B 단백질은 RNA-지향된 RNA 중합효소에 특징적인 모티프를 보유한다 (Koonin, E.V. and Dolja, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

[0013]

바이러스의 수명에서 돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스의 NS 단백질의 실제 역할과 기능은 직접적으로 유사하다. 양쪽 경우에서, NS3 세린 프로테아제는 ORF 내에서 그의 위치의 하류에서 다중단백질 전구체의 모든 단백 분해 가공 (proteolytic processing)을 담당한다 (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). 양쪽 경우에서 NS4A 단백질은 NS3 세린 프로테아제와 함께 보조인자로서 기능한다 (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). 양쪽 바이러스의 NS3 단백질은 또한, 헬리카아제로서 기능한다 (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). 최종적으로, 돼지열병 바이러스 및 헤파시바이러스의 NS5B 단백질은 예측된 RNA-지향된 RNA 중합효소 활성을 갖는다 (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).

[0014]

현재, C형 간염 바이러스로 감염된 개체에 대한 치료 옵션이 제한된다. 현재 승인된 치료 옵션은 재조합 인터페

론-α를 단독으로 또는 뉴클레오시드 유사체 리바비린과 조합하여 사용하는 면역요법의 이용이다. 이러한 요법은 임상적 효능이 제한되고, 그리고 치료된 환자 중에서 단지 50%만 치료에 반응한다. 이런 이유로, HCV 감염에 의한 해결되지 않고 있는 의학적 요구를 해소하는 더욱 효과적이고 신규한 치료제가 시급하게 요구된다.

[0015] NS2-NS3 오토프로테아제, N3 프로테아제, N3 헬리카아제 및 NS5B 중합효소가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 항-HCV 치료제로서 직접 작용 항바이러스제의 약물 개발을 위한 다수의 잠재적 분자 표적 (molecular target)이 현재 확인되고 있다. RNA-의존성 RNA 중합효소는 단일-가닥, 양성 센스, RNA 게놈의 복제에 절대적으로 필요하고, 그리고 상기 효소는 의화학자 사이에서 상당한 주목을 받고 있다.

[0016] HCV 감염에 대한 잠재적인 치료제로서 HCV NS5B의 저해물질이 검토되어 왔다: 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. 내성 HCV 변종 (strain)의 출현 가능성 및 폭넓은 유전자형 적용범위 (genetic coverage)를 갖는 작용제를 확인해야 하는 필요성은 HCV NS5B 저해물질로서 신규하고 더욱 효과적인 뉴클레오시드를 확인하는 노력을 지속해야 하는 필요성을 뒷받침한다.

[0017] NS5B 중합효소의 뉴클레오시드 저해물질은 사슬 종결 (chain termination)을 유발하는 비-자연 기질로서, 또는 중합효소에 결합하는 뉴클레오티드와 경쟁하는 경쟁적 저해물질로서 기능할 수 있다. 사슬 종결자 (chain terminator)로서 기능하기 위하여, 뉴클레오시드 유사체는 세포에 의해 흡수되고, 그리고 중합효소 뉴클레오티드 결합 부위에 대하여 경쟁하기 위하여 생체내에서 트리포스페이트로 변환되어야 한다. 트리포스페이트로의 이러한 변환은 통상적으로, 잠재적 뉴클레오시드 중합효소 저해물질에 추가의 구조적 필요조건을 부여하는 세포 키나아제에 의해 매개된다. 유감스럽게도, 이것은 HCV 복제의 저해물질로서 뉴클레오시드의 직접적인 평가를 인 시추 (*in situ*) 포스포릴화가 가능한 세포-기반 분석법으로 한정시킨다.

[0018] 일부 경우에, 뉴클레오시드의 생물학적 활성은 이를 활성 트리포스페이트 형태로 변환시키기 위하여 요구되는 한 가지 이상의 키나아제에 대한 불량한 기질 특성에 의해 방해된다. 뉴클레오시드 키나아제에 의한 모노포스페이트의 형성은 일반적으로, 이들 3가지 포스포릴화 사건의 속도 제한 단계 (rate limiting step)로서 간주된다. 뉴클레오시드의 활성 트리포스페이트 유사체로의 물질대사에서 최초 포스포릴화 단계에 대한 요구를 우회하기 위하여, 안정한 포스페이트 프로드러그의 제조가 보고되었다. 뉴클레오시드 포스포라미데이트 프로드러그는 활성 뉴클레오시드 트리포스페이트의 전구체이고, 그리고 바이러스 감염된 전세포 (whole cell)에 투여될 때 바이러스 복제를 저해하는 것으로 밝혀졌다 (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; 그리고 WO 2007/095269).

[0019] 또한, 실용적인 치료제로서 뉴클레오시드의 유용성은 그들의 불량한 물리화학적 및 약동학적 성질로 인하여 때때로 제한된다. 이들 불량한 성질은 치료제의 장내 흡수를 제한하고 표적 조직 또는 세포 내로 흡수를 제한할 수 있다. 뉴클레오시드의 성질을 향상시키기 위하여, 그들의 프로드러그가 이용되고 있다. 뉴클레오시드 포스포라미데이트의 제조는 뉴클레오시드의 전신 흡수를 향상시키고, 더 나아가 이들 "프로뉴클레오티드 (pronucleotide)"의 포스포라미데이트 모이어티는 세포 내로 흡수와 수송을 최적화시켜 부모 (parent) 뉴클레오시드 단독의 투여에 비하여 뉴클레오시드 모노포스페이트 유사체의 세포내 농도를 극적으로 증강시키기 위하여, 적절한 분배 계수 (partition coefficient)를 획득하는 중성 친유성 기 (neutral lipophilic group)로 얹혀지는 것으로 증명되었다. 포스페이트 에스테르 모이어티의 효소-매개된 가수분해는 뉴클레오시드 모노포스페이트를 생산하고, 여기서 속도 제한 최초 포스포릴화가 불필요하다. 이와 관련하여, WO 2008/121634 및 US 2010/0016251에 상응하는 미국 특허 출원 12/053,015에서는 다수의 포스포라미데이트 뉴클레오시드 프로드러그를 개시하고, 이들 중에서 많은 수가 HCV 분석평가에서 활성을 보인다. US 2010/0016251에서 개시된 여러 화합물이 FDA 승인을 위한 잠재적 임상 후보로서 조사되었다.

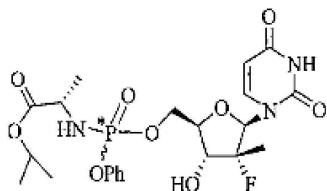
발명의 내용

해결하려는 과제

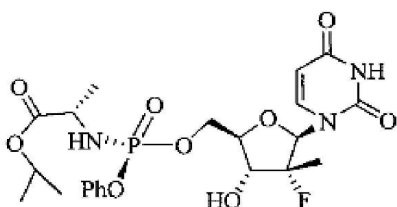
본 발명의 요약

본 명세서에서는 화학식 4로 표시되는 화합물, 그리고 화학식 S-4 및 R-4로 표시되는 상기 화합물 각각의 인계 부분입체이성질체 (phosphorus-based diastereomer)가 개시된다.

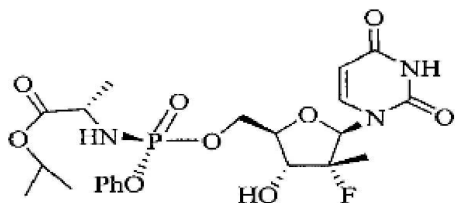
[화학식 4]



[화학식 S-4]



[화학식 R-4]



과제의 해결 수단

본 발명의 상세한 설명

정의

본 명세서에서 단수 존재는 상기 존재의 하나 이상을 지칭한다; 가령, 화합물은 하나 이상의 화합물 또는 적어도 하나의 화합물을 지칭한다. 따라서 단수 표현, "하나 이상", 그리고 "적어도 하나"는 본 명세서에서 동의어로서 이용될 수 있다.

본 명세서에서, 용어 "선택적" 또는 "선택적으로"는 하기에 기술된 사건 또는 현상이 일어날 수도 있지만 반드시 일어나는 것은 아니고, 그리고 이러한 설명이 상기 사건 또는 현상이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다. 가령, "선택적 결합"은 상기 결합이 존재하거나 존재하지 않을 수 있고, 그리고 이러한 설명이 단일, 이중, 또는 삼중 결합을 포함한다는 것을 의미한다.

용어 "P*"는 인 원자가 키랄이고, 그리고 인정된 명백한 의미를 갖는 "R" 또는 "S"의 상응하는 Cahn-Ingold-Prelog 명칭을 갖는다는 것을 의미한다.

본 명세서에서, 용어 "정제된"은 소정의 화합물의 순도를 지칭한다. 가령, 화합물은 소정의 화합물이 조성물의 주요 성분일 때, 다시 말하면, 적어도 50% w/w 순수할 때 "정제된" 것이다. 따라서 "정제된"은 적어도 50% w/w

순도, 적어도 60% w/w 순도, 적어도 70% 순도, 적어도 80% 순도, 적어도 85% 순도, 적어도 90% 순도, 적어도 92% 순도, 적어도 94% 순도, 적어도 96% 순도, 적어도 97% 순도, 적어도 98% 순도, 적어도 99% 순도, 적어도 99.5% 순도, 그리고 적어도 99.9% 순도를 포함하고, 여기서 "실질적으로 순수한"은 적어도 97% 순도, 적어도 98% 순도, 적어도 99% 순도, 적어도 99.5% 순도, 그리고 적어도 99.9% 순도를 포함한다.

- [0034] 본 명세서에서, 용어 "대사산물"은 필요한 개체에 투여후 생체내에서 생산된 화합물을 지칭한다.
- [0035] 용어 "대략" (또한, ~로 표시됨)은 인용된 수치 값이 표준 실험 오차 (standard experimental error) 내에서 변하는 범위의 일부라는 것을 의미한다.
- [0036] 표현 "... 특정된 XRPD 패턴에서 제시된 바와 실질적으로"는 상기 XRPD 패턴에서 제시된 피크 위치가 시각적 검사에서 실질적으로 동일하거나, 또는 선별된 피크 목록 ($\pm 0.2^\circ 2\theta$)에 의존한다는 것을 의미한다. 당업자는 이들 강도가 샘플에 따라 달라질 수 있음을 이해할 것이다.
- [0037] 용어 "실질적으로 무수성"은 물질이 기껏해야 10 중량%의 물, 바람직하게는 기껏해야 1 중량%의 물, 더욱 바람직하게는 기껏해야 0.5 중량%의 물, 그리고 가장 바람직하게는 기껏해야 0.1 중량%의 물을 포함한다는 것을 의미한다.
- [0038] 용매 또는 반응매 (반응, 결정화 등에서 이용됨, 또는 격자 및/또는 흡착된 용매)에는 적어도 하나의 C_1 내지 C_8 알코올, C_2 내지 C_8 에테르, C_3 내지 C_7 케톤, C_3 내지 C_7 에스테르, C_1 내지 C_2 염화탄소, C_2 내지 C_7 니트릴, 이종혼합 용매 (miscellaneous solvent), C_5 내지 C_{12} 포화 탄화수소, 그리고 C_6 내지 C_{12} 방향족 탄화수소가 포함된다.
- [0039] C_1 내지 C_8 알코올은 이런 탄소수를 갖는 선형/가지형 및/또는 환형/비환형 알코올을 지칭한다. C_1 내지 C_8 알코올에는 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, 이소부탄올, 헥산올, 그리고 시클로헥산올이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0040] C_2 내지 C_8 에테르는 이런 탄소수를 갖는 선형/가지형 및/또는 환형/비환형 에테르를 지칭한다. C_2 내지 C_8 에테르에는 디메틸 에테르, 디에틸 에테르, 디-이소프로필 에테르, 디-n-부틸 에테르, 메틸-t-부틸 에테르 (MTBE), 테트라히드로푸란, 그리고 디옥산이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0041] C_3 내지 C_7 케톤은 이런 탄소수를 갖는 선형/가지형 및/또는 환형/비환형 케톤을 지칭한다. C_3 내지 C_7 케톤에는 아세톤, 메틸 에틸 케톤, 프로판논, 부타논, 메틸 이소부틸 케톤, 메틸 부틸 케톤, 그리고 시클로헥사논이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0042] C_3 내지 C_7 에스테르는 이런 탄소수를 갖는 선형/가지형 및/또는 환형/비환형 에스테르를 지칭한다. C_3 내지 C_7 에스테르에는 에틸 아세테이트, 프로필 아세테이트, n-부틸 아세테이트 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0043] C_1 내지 C_2 염화탄소는 이런 탄소수를 갖는 염화탄소를 지칭한다. C_1 내지 C_2 염화탄소에는 클로로포름, 염화메틸렌 (DCM), 사염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 그리고 테트라클로로에탄이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0044] C_2 내지 C_7 니트릴은 이런 탄소수를 갖는 니트릴을 지칭한다. C_2 내지 C_7 니트릴에는 아세토니트릴, 프로피오니트릴 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0045] 이종혼합 용매는 유기 화학에 통상적으로 이용되는 용매를 지칭하고, 여기에는 디에틸렌 글리콜, 디글림 (diglyme) (디에틸렌 글리콜 디메틸 에테르), 1,2-디메톡시-에탄, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 에틸렌 글리콜, 글리세린, 헥사메틸포스포라미드, 헥사메틸포스포러스 트리암 (hexamethylphosphorous triame), N-메틸-2-피롤리딘, 니트로메탄, 피리딘, 트리에틸 아민, 그리고 아세트산이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0046] 용어 C_5 내지 C_{12} 포화 탄화수소는 선형/가지형 및/또는 환형/비환형 탄화수소를 지칭한다. C_5 내지 C_{12} 포화 탄화수소에는 n-펜탄, 석유 에테르 (ligroine), n-헥산, n-헵탄, 시클로헥산, 그리고 시클로헵탄이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0047] 용어 C_6 내지 C_{12} 방향족은 그들의 백본 (backbone)으로 페닐 기를 갖는 치환된 및 치환되지 않은 탄화수소를 지칭한다. 바람직한 탄화수소에는 벤젠, 자일렌, 톨루엔, 클로로벤젠, o-자일렌, m-자일렌, p-자일렌, 자일렌들이

포함되고, 톨루엔이 더욱 바람직하다.

[0048] 본 명세서에서, 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 클로로, 브로모, 요오드 및 플루오로를 포함한다.

[0049] 용어 "차단기"는 아래의 특징을 나타내는 화학 기를 지칭한다. "기 (group)"는 "보호 화합물"로부터 유래된다. 2차 히드록실보다 일차 히드록실에 선별적인 기는 포스포라미데이트 (pH 2-8)의 안정성과 일치하는 조건 하에 놓여지고, 그리고 반응되지 않은 원하는 화합물로부터 3'-포스포라미데이트-5'-새로운 기 산물의 더욱 용이한 분리를 가능하게 하는 실질적으로 상이한 물리적 성질을 결과의 산물에 부여할 수 있다. 상기 기는 계획된 반응에 안정한 보호된 기질을 제공하기 위하여, 우수한 수율로 선별적으로 반응해야 한다 (참조: Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed. T. W. Greene and P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1999). 기의 실례에는 벤조일, 아세틸, 페닐-치환된 벤조일, 테트라히드로피라닐, 트리틸, DMT (4,4'-디메톡시트리틸), MMT (4-모노메톡시트리틸), 트리메톡시트리틸, 픽실 (9-페닐산텐-9-일) 기, 티오피실 (9-페닐티옥산텐-9-일) 또는 9-(p-메톡시페닐)산텐-9-일 (MOX) 등; C(O)-알킬, C(O)Ph, C(O)아릴, CH₂O-알킬, CH₂O-아릴, SO₂-알킬, SO₂-아릴, *tert*-부틸디메틸실릴, *tert*-부틸디페닐실릴이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 아세탈, 예를 들면, MOM 또는 THP 등은 가능한 기인 것으로 고려된다. 플루오르화된 화합물 역시, 그들이 화합물에 부착될 수 있고 플루오르성 고체 상 추출 매체 (FluoroFlash[®])를 통과함으로써 선별적으로 제거될 수 있으면, 고려된다. 특정한 실례에는 플루오르화된 트리틸 유사체, 트리틸 유사체 1-[4-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-퍼플루오로데실)페닐]-1,1-디페닐메탄올이 포함된다. 트리틸, BOC, FMOC, CBz 등의 다른 플루오르화된 유사체 역시 고려된다. p-톨루엔설포닐 염화물과 같은 설포닐 염화물은 5' 위치에서 선별적으로 반응할 수 있다. 에스테르, 예를 들면, 아세테이트 및 벤조에이트는 선별적으로 형성될 수 있다. 디카르복실산 무수물, 예를 들면, 숙신산 무수물 및 이의 유도체는 유리 카르복실산과의 에스테르 결합 (linkage)을 산출하는데 이용될 수 있고, 이런 실례에는 옥살릴, 말로닐, 숙시닐, 글루타릴, 아디필, 피멜릴, 수퍼릴, 아젤라일, 세바실, 프탈릴, 이소프탈릴, 테레프탈릴 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 유리 카르복실산은 극성을 극적으로 증가시키고, 또한 반응 산물을 온화한 (mildly) 염기성 수성 상, 예를 들면, 중탄산나트륨 용액으로 추출하기 위한 헐들로서 이용될 수 있다. 포스포라미데이트 기는 산성 매체에서 상대적으로 안정하고, 따라서 산성 반응 조건을 요구하는 기, 예를 들면, 테트라히드로피라닐 역시 이용될 수 있다.

[0050] "보호 화합물"로부터 유래되는 용어 "보호기"는 명백하고 통상의 의미를 갖는다, 다시 말하면, 적어도 하나의 보호기 또는 차단기는 적어도 하나의 다른 기능기 (functional group)의 화학적 변형을 가능하게 하는 적어도 하나의 기능기 (가령, -OH, -NH₂ 등)에 결합된다. 보호기의 실례에는 벤조일, 아세틸, 페닐-치환된 벤조일, 테트라히드로피라닐, 트리틸, DMT (4,4'-디메톡시트리틸), MMT (4-모노메톡시트리틸), 트리메톡시트리틸, 픽실 (9-페닐산텐-9-일) 기, 티오피실 (9-페닐티옥산텐-9-일) 또는 9-(p-메톡시페닐)산텐-9-일 (MOX) 등; C(O)-알킬, C(O)Ph, C(O)아릴, C(O)O(저급 알킬), C(O)O(저급 알킬렌)아릴 (가령, -C(O)OCH₂Ph), C(O)O아릴, CH₂O-알킬, CH₂O-아릴, SO₂-알킬, SO₂-아릴, 적어도 하나의 실리콘 원자를 포함하는 보호기, 예를 들면, *tert*-부틸디메틸실릴, *tert*-부틸디페닐실릴, Si(저급 알킬)₂OSi(저급 알킬)₂OH (가령, -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0051] 본 명세서에서 달리 정의되지 않으면, 용어 "보호 화합물"은 "보호기"를 보유하고, 그리고 보호될 수 있는 기를 보유하는 화합물과 상호작용할 수 있는 화합물을 지칭한다.

[0052] 본 명세서에서, 용어 "이탈기"는 당업자에게 공지된 바와 동일한 의미를 갖고 (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure-Fourth Edition by Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992 pages 351-357), 그리고 기질 분자의 일부이고 기질 분자에 부착되는 기를 나타낸다; 기질 분자가 치환 (displacement) 반응 (예로써, 친핵체 (nucleophile)와의)을 겪는 반응에서, 이탈기는 이후, 치환된다. 이탈기의 실례에는 할로겐 (F, Cl, Br, 그리고 I), 바람직하게는 Cl, Br, 또는 I; 토실레이트, 메실레이트, 트리플레이트, 아세테이트, 캄포설포네이트, 아릴옥시드, 그리고 적어도 하나의 전자 끄는 기로 치환된 아릴옥시드 (가령, p-니트로페녹시드, 2-클로로페녹시드, 4-클로로페녹시드, 2,4-디니트로페녹시드, 펜타플루오로페녹시드 등) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 용어 "전자 끄는 기"는 그의 명백한 의미와 일치된다. 전자 끄는 기의 실례에는 할로겐, -NO₂, -C(O)(저급 알킬), -C(O)(아릴), -C(O)O(저급 알킬), -C(O)O(아릴) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0053] 본 명세서에서, 용어 "염기성 시약"은 히드록실 기를 탈양성자화시킬 수 있는 화합물을 의미한다. 염기성 시약

의 실례에는 알코올성 용매와 조합하여 (저급 알킬)옥시드 ((저급 알킬)OM)이 포함되지만 이에 국한되지 않고, 여기서 (저급 알킬)옥시드에는 MeO^- , EtO^- , $^n\text{PrO}^-$, $^i\text{PrO}^-$, $^t\text{BuO}^-$, $^i\text{AmO}^-$ (이소-아밀옥시드) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 그리고 M은 알칼리 금속 양이온, 예를 들면, Li^+ , Na^+ , K^+ 등이다. 알코올성 용매에는 (저급 알킬)OH, 예를 들면, MeOH , EtOH , $^n\text{PrOH}$, $^i\text{PrOH}$, $^t\text{BuOH}$, $^i\text{AmOH}$ 등이 포함된다. 비-알콕시 염기, 예를 들면, 수소화나트륨, 나트륨 헥사메틸디실라잔, 리튬 헥사메틸디실라잔, 리튬 디이소프로필아미드, 수소화칼슘, 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산세슘, DBU, DBN, Grignard 시약, 예를 들면, (저급 알킬)Mg(할로젠)(여기에는 MeMgCl , MeMgBr , $^t\text{BuMgCl}$, $^t\text{BuMgBr}$ 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않음) 역시 이용될 수 있다.

[0054] 용어 "염기"는 용어 "염기성 시약"을 포함하고, 그리고 양성자 보유 화합물을 탈양성자화시킬 수 있는 화합물, 다시 말하면, Bronsted 염기를 의미한다. 앞서 열거된 실례 이외에, 염기의 다른 실례에는 피리딘, 콜리딘, 2,6-(저급 알킬)-피리딘, 디메틸-아닐린, 이미다졸, N-메틸-이미다졸, 피라졸, N-메틸-피라졸, 트리에틸아민, 디-이소프로필에틸아민 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0055] 용어 "전자 끄는 기"는 그의 명백한 의미와 일치된다. 전자 끄는 기의 실례에는 할로젠 (F, Cl, Br, 또는 I), $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{저급 알킬})$, $-\text{C}(\text{O})(\text{아릴})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{저급 알킬})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{아릴})$ 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0056] 용어 "공동-크리스탈레이트 (co-crystallate)"는 제약학적으로 허용되는 염을 포함하는 염과 조합하여 **4**, R_4 -**4**, 또는 S_4 -**4**의 공동-크리스탈레이트를 포함한다.

[0057] 본 명세서에서, 용어 "염"은 양이온 및 음이온을 포함하는 화합물을 지칭하고, 양성자-수용 모이어티의 양성자화 및/또는 양성자-공여 모이어티의 탈양성자화에 의해 생산될 수 있다. 양성자-수용 모이어티의 양성자화는 전하가 생리학적 음이온의 존재에 의해 균형을 이루는 양이온성 화학종 (cationic species)의 형성을 유발하고, 반면 양성자-공여 모이어티의 탈양성자화는 전하가 생리학적 양이온의 존재에 의해 균형을 이루는 음이온성 화학종 (anionic species)의 형성을 유발한다.

[0058] 구(句) "제약학적으로 허용되는 염"은 제약학적으로 허용되는 염을 의미한다. 제약학적으로 허용되는 염의 실례에는 (1) 무기 산, 예를 들면, 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등으로 형성되거나; 또는 유기 산, 예를 들면, 글리콜산, 피루브산, 젖산, 말론산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 3-(4-히드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄-디설폰산, 2-히드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄포설폰산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 살리실산, 뮤코산 (muconic acid) 등으로 형성된 산 부가염 (acid addition salt), 또는 (2) 앞서 열거된 염의 무기 산의 짝염기 (conjugate base)로 형성된 염기 부가염 (basic addition salt) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 여기서 짝염기는 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ 에서 선택되는 양이온 성분을 포함하고, 여기서 $R^{''}$ 은 C_{1-3} 알킬이고 g는 0, 1, 2, 3, 또는 4에서 선택되는 숫자이다. 제약학적으로 허용되는 염에 대한 모든 언급은 동일한 산 부가염의 본 명세서에 정의된 바와 같은 용매 첨가 형태 (용매화합물) 또는 결정 형태 (다형체)를 포함하는 것으로 이해된다.

[0059] 용어 "알킬"은 1개 내지 30개 탄소 원자를 보유하는 가지화되지 않은 또는 가지화된 사슬, 포화, 1가 탄화수소 잔기를 지칭한다. 용어 " C_{1-M} 알킬"은 1개 내지 M개 탄소 원자를 포함하는 알킬을 지칭하고, 여기서 M은 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, 또는 30의 값을 갖는 정수이다. 용어 " C_{1-4} 알킬"은 1개 내지 4개 탄소 원자를 보유하는 알킬을 지칭한다. 용어 "저급 알킬"은 1개 내지 6개 탄소 원자를 보유하는 선형 또는 가지형 사슬 탄화수소 잔기를 지칭한다. 본 명세서에서, " C_{1-20} 알킬"은 1개 내지 20개 탄소 원자를 보유하는 알킬을 지칭한다. 본 명세서에서, " C_{1-10} 알킬"은 1개 내지 10개 탄소를 보유하는 알킬을 지칭한다. 알킬 기의 실례에는 메틸, 에틸, 프로필, *i*-프로필, *n*-부틸, *i*-부틸, *t*-부틸 또는 펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 헵틸, 그리고 옥틸을 비롯한 저급 알킬 기가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 용어 (아르)알킬 또는 (헤테로아릴)알킬은 알킬 기가 각각, 아릴 또는 헤테로아릴 기에 의해 선택적으로 치환된다는 것을 지시한다.

[0060] 용어 "알케닐"은 1개 또는 2개 올레핀성 이중 결합 (olefinic double bond), 바람직하게는 1개의 올레핀성 이중

결합을 갖는 2개 내지 10개 탄소 원자를 보유하는 치환되지 않은 탄화수소 사슬 라디칼을 지칭한다. 용어 " C_{2-N} 알케닐"은 2개 내지 N개 탄소 원자를 보유하는 알케닐을 지칭하고, 여기서 N은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 값을 갖는 정수이다. 용어 " C_{2-10} 알케닐"은 2개 내지 10개 탄소 원자를 보유하는 알케닐을 지칭한다. 용어 " C_{2-4} 알케닐"은 2개 내지 4개 탄소 원자를 보유하는 알케닐을 지칭한다. 실례에는 비닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐 (알릴) 또는 2-부테닐 (크로틸)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0061] 본 명세서에서, 그리고 달리 명시되지 않으면, 용어 "아릴"은 치환된 또는 치환되지 않은 페닐 (Ph), 비페닐, 또는 나프틸을 지칭하고, 바람직하게는 용어 아릴은 치환된 또는 치환되지 않은 페닐을 지칭한다. 아릴 기는 당업자에게 공지된 바와 같이, 예를 들면, T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999에서 교시된 바와 같이, 보호되지 않은, 또는 필요에 따라 보호된 히드록실, F, Cl, Br, I, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펡산, 설펡이트, 포스폰산, 포스페이트, 그리고 포스포네이트에서 선택되는 하나 이상의 모이어티로 치환될 수 있다.

[0062] 본 명세서에서, 그리고 달리 명시되지 않으면, 용어 "아릴옥시드"는 치환된 또는 치환되지 않은 페녹시드 (PhO-), p-페닐-페녹시드 (p-Ph-PhO-), 또는 나프톡시드를 지칭하고, 바람직하게는 용어 아릴옥시드는 치환된 또는 치환되지 않은 페녹시드를 지칭한다. 아릴옥시드 기는 당업자에게 공지된 바와 같이, 예를 들면, T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999에서 교시된 바와 같이, 보호되지 않은, 또는 필요에 따라 보호된 히드록실, F, Cl, Br, I, $-C(O)$ (저급 알킬), $-C(O)O$ (저급 알킬), 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펡산, 설펡이트, 포스폰산, 포스페이트, 그리고 포스포네이트에서 선택되는 하나 이상의 모이어티로 치환될 수 있다.

[0063] 용어 "제조물 (preparation)" 또는 "제형 (dosage form)"은 활성 화합물의 고형 및 액상 제제 둘 모두를 포함하는 것으로 의도되고, 그리고 당업자는 활성 성분이 원하는 용량 및 약동학 파라미터에 따라 상이한 제조물로 존재할 수 있음을 인지할 것이다.

[0064] 본 명세서에서, 용어 "부형제"는 제약학적 조성물을 제조하는데 이용되고, 그리고 전반적으로 안정하고, 비-독성이고, 생물학적으로도 또한 다른 경우에도 바람직한 화합물을 지칭하고, 그리고 인간 제약학적 용도뿐만 아니라 수의학적 용도에 적합한 부형제를 포함한다.

[0065] 용어 "결정질 (crystalline)"은 S_r-4 또는 R_r-4 의 고형 샘플이 X-선 분말 회절 또는 단일 결정 X-선 기술에 의해 측정될 때, 결정질 특성을 갖는 상황을 지칭한다.

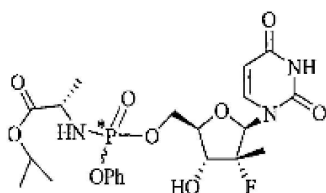
[0066] 용어 "결정성 (crystal-like)"은 S_r-4 또는 R_r-4 의 고형 샘플이 한 가지 수단, 예를 들면, 시각에 의해 또는 광학 또는 편광 현미경 검사에 의해 측정될 때 결정질 특성을 갖지만, 다른 수단, 예를 들면, X-선 분말 회절에 의해 측정될 때 결정질 특성을 갖지 않는 상황을 지칭한다. 시각에 의해 또는 광학 또는 편광 현미경 검사에 의해 고형 샘플의 결정도를 시각적으로 측정하는 방법은 USP <695> 및 <776>에서 개시되고, 이들 둘 모두 참조로서 병합된다. "결정성"인 S_r-4 또는 R_r-4 의 고형 샘플은 특정 조건 하에 결정성이지만 다른 조건에서는 비-결정성일 수 있다.

[0067] 용어 "무정형"은 S_r-4 또는 R_r-4 의 고형 샘플이 결정질도 결정성도 모두 아닌 상황을 지칭한다.

[0068] *구체예*

[0069] 첫 번째 구체예는 화학식 4로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

[0070] [화학식 4]

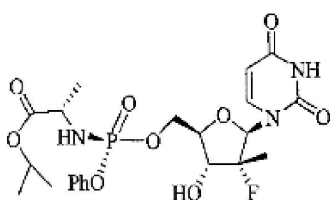


[0071]

[0072] 여기서 P*는 키랄 인 원자이다. 키랄 인 원자로 인하여, 화학식 4로 표시되는 화합물은 R_p-4 및 S_p-4로 명명된 2개의 부분입체이성질체를 포함한다. 화학식 4로 표시되는 화합물은 또한, 용매화합물, 수화물, 또는 혼합된 용매화합물/수화물의 일부일 수 있다. 용매화합물은 4 · nS로 명명되는 반면, 수화물은 4 · mH₂O로서 명명되고, 여기서 S는 격자 용매 (lattice solvent)이고, n은 대략 0에서부터 대략 3까지 정수값 또는 비정수값의 양으로 변하고, 그리고 m은 대략 0에서부터 대략 5까지 정수값 또는 비정수값의 양으로 변한다. 최종적으로, 화학식 4로 표시되는 화합물은 용매화합물 또는 수화물로서 존재하지 않지만, 특정의 유익한 양의 흡착된 용매 (S) 또는 물을 보유할 수도 있다. 어떤 경우든, S 또는 물의 양은 화학식 4로 표시되는 화합물의 중량에 기초하여 대략 0 wt.%에서부터 대략 10 wt.%까지 변할 수 있다. 화학식 4로 표시되는 화합물 및 이의 용매화합물과 수화물은 결정질, 결정성, 또는 무정형이다.

[0073] 두 번째 구체에는 화학식 R_p-4로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

[0074] [화학식 R_p-4]



[0075] 화학식 R_p-4로 표시되는 화합물은 또한, 용매화합물, 수화물, 또는 혼합된 용매화합물/수화물의 일부일 수 있다. 용매화합물은 R_p-4 · nS로 명명되는 반면, 수화물은 R_p-4 · mH₂O로서 명명되고, 여기서 S는 격자 용매이고, n은 대략 0에서부터 대략 3까지 정수값 또는 비정수값의 양으로 변하고, 그리고 m은 대략 0에서부터 대략 5까지 정수값 또는 비정수값의 양으로 변한다. 최종적으로, 화학식 R_p-4로 표시되는 화합물은 용매화합물, 수화물, 또는 혼합된 용매화합물/수화물로서 존재하지 않지만, 특정의 유익한 양의 흡착된 용매 (S) 또는 물, 또는 S와 물 둘 모두를 보유할 수도 있다. 어떤 경우든, S 또는 물의 양은 화학식 R_p-4로 표시되는 화합물의 중량에 기초하여 대략 0 wt.%에서부터 대략 10 wt.%까지 변할 수 있다. 화학식 R_p-4로 표시되는 화합물 및 이의 용매화합물과 수화물은 결정질, 결정성, 또는 무정형이다.

[0077] 두 번째 구체에의 첫 번째 측면은 결정질 R_p-4에 관한 것이다.

[0078] 두 번째 구체에의 두 번째 측면은 대략 6.6, 7.1, 9.0, 11.6, 17.9, 20.7, 24.1, 24.4, 그리고 26.2에서 XRPD 2θ-리플렉션 (reflection) (°)을 갖는 결정질 R_p-4에 관한 것이다.

[0079] 두 번째 구체에의 세 번째 측면은 대략 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, 그리고 28.2에서 XRPD 2θ-리플렉션 (°)을 갖는 결정질 R_p-4에 관한 것이다.

[0080] 두 번째 구체에의 네 번째 측면은 도 2에서 도시된 바와 실질적으로 동일한 XRPD 회절 패턴을 갖는 결정질 R_p-4에 관한 것이다.

[0081] 두 번째 구체에의 다섯 번째 측면은 아래의 FT-IR 피크 (cm⁻¹): 1742, 1713, 1679, 1460, 1377, 1259, 1157, 그리고 1079를 갖는 R_p-4에 관한 것이다.

[0082] 두 번째 구체에의 여섯 번째 측면은 도 15에 도시된 바와 실질적으로 동일한 FT-IR 스펙트럼을 갖는 R_p-4에 관한 것이다.

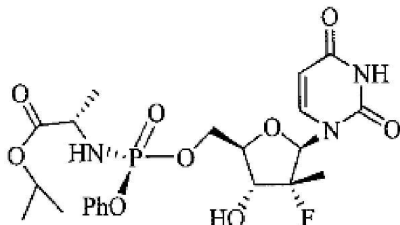
[0083] 두 번째 구체에의 일곱 번째 측면은 실질적으로 순수한 R_p-4에 관한 것이다.

[0084] 두 번째 구체에의 여덟 번째 측면은 실질적으로 순수한 결정질 R_p-4에 관한 것이다.

[0085] 두 번째 구체예의 아홉 번째 측면은 실질적으로 순수한 무정형 R_p-4에 관한 것이다.

[0086] 세 번째 구체예는 화학식 S_p-4로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

[0087] [화학식 S_p-4]



[0088]

[0089] 화학식 S_p-4로 표시되는 화합물은 또한, 용매화합물, 수화물, 또는 혼합된 용매화합물/수화물의 일부일 수 있다. 용매화합물은 S_p-4 · nS로 명명되는 반면, 수화물은 S_p-4 · mH₂O로서 명명되고, 여기서 S는 격자 용매이고, n은 대략 0에서부터 대략 3까지 정수값 또는 비정수값의 양으로 변하고, 그리고 m은 대략 0에서부터 대략 5까지 정수값 또는 비정수값의 양으로 변한다. 최종적으로, 화학식 S_p-4로 표시되는 화합물은 용매화합물 또는 수화물로서 존재하지 않지만, 특정의 유의한 양의 흡착된 용매 (S) 또는 물을 보유할 수도 있다. 어떤 경우든, S 또는 물의 양은 화학식 S_p-4로 표시되는 화합물의 중량에 기초하여 대략 0 wt.%에서부터 대략 10 wt.%까지 변할 수 있다. 화학식 S_p-4로 표시되는 화합물 및 이의 용매화합물과 수화물은 결정질, 결정성, 또는 무정형이다.

[0090] 세 번째 구체예의 첫 번째 측면은 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0091] 세 번째 구체예의 두 번째 측면은 바람직하게는, 아래의 단위 셀 파라미터 (unit cell parameter) a ~ 12.88 Å, b ~ 6.17 Å, c ~ 17.73 Å, 그리고 β ~ 92.05°를 갖는 단사정계 (monoclinic) 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0092] 세 번째 구체예의 세 번째 측면은 바람직하게는, 아래의 단위 셀 파라미터 a ~ 20.09 Å, b ~ 6.10 Å, c ~ 23.01 Å, 그리고 β ~ 112.29°를 갖는 단사정계 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0093] 세 번째 구체예의 네 번째 측면은 바람직하게는, 아래의 단위 셀 파라미터 a ~ 12.83 Å, b ~ 6.15 Å, c ~ 17.63 Å, 그리고 β ~ 91.75°를 갖는 단사정계 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0094] 세 번째 구체예의 다섯 번째 측면은 바람직하게는, 아래의 단위 셀 파라미터 a ~ 12.93 Å, b ~ 6.18 Å, c ~ 18.01 Å, 그리고 β ~ 96.40°를 갖는 단사정계 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0095] 세 번째 구체예의 여섯 번째 측면은 대략 5.2, 7.5, 9.6, 16.7, 18.3, 22.2에서 XRPD 2θ-리플렉션 (°)을 갖는 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0096] 세 번째 구체예의 일곱 번째 측면은 대략 5.0, 7.3, 9.4, 그리고 18.1에서 XRPD 2θ-리플렉션 (°)을 갖는 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0097] 세 번째 구체예의 여덟 번째 측면은 대략 4.9, 6.9, 9.8, 19.8, 20.6, 24.7, 그리고 26.1에서 XRPD 2θ-리플렉션 (°)을 갖는 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0098] 세 번째 구체예의 아홉 번째 측면은 대략 6.9, 9.8, 19.7, 20.6, 그리고 24.6에서 XRPD 2θ-리플렉션 (°)을 갖는 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0099] 세 번째 구체예의 아홉 번째 측면은 대략 5.0, 6.8, 19.9, 20.6, 20.9, 그리고 24.9에서 XRPD 2θ-리플렉션 (°)을 갖는 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

[0100] 세 번째 구체예의 열 번째 측면은 대략 5.2, 6.6, 7.1, 15.7, 19.1, 그리고 25.0에서 XRPD 2θ-리플렉션 (°)을 갖는 결정질 S_p-4에 관한 것이다.

- [0101] 세 번째 구체예의 열한 번째 측면은 도 3, 도 4, 도 5, 도 6, 도 7, 그리고 도 8 중에서 한 가지에서 도시된 바와 실질적으로 동일한 XRPD 회절 패턴을 갖는 결정질 S_p-4에 관한 것이다.
- [0102] 세 번째 구체예의 열두 번째 측면은 대략 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208, 그리고 1082에서 FT-IR 피크 (cm⁻¹)를 갖는 S_p-4에 관한 것이다.
- [0103] 세 번째 구체예의 열세 번째 측면은 도 7에 도시된 바와 실질적으로 동일한 FT-IR 스펙트럼을 갖는 S_p-4에 관한 것이다.
- [0104] 세 번째 구체예의 열네 번째 측면은 실질적으로 순수한 S_p-4에 관한 것이다.
- [0105] 세 번째 구체예의 열다섯 번째 측면은 실질적으로 순수한 결정질 S_p-4에 관한 것이다.
- [0106] 세 번째 구체예의 열여섯 번째 측면은 실질적으로 순수한 무정형 S_p-4에 관한 것이다.
- [0107] 용량, 투여, 그리고 용도
- [0108] 네 번째 구체예는 화합물 4, R_p-4, 또는 S_p-4 중에서 한 가지를 이용하여 임의의 바이러스 병원체의 치료 및/또는 예방을 위한 조성물에 관한 것이다. 가능한 바이러스 병원체에는 C형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, A형 간염 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 리노바이러스, 폴리오 바이러스, 소 바이러스성 설사 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 또는 돼지열병 바이러스, 헤파시바이러스, 또는 플라비바이러스의 군에 속하는 바이러스가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0109] 이러한 구체예의 한 측면은 본 명세서에서 개시된 임의의 바이러스 병원체의 치료를 위한 조성물에 관한 것이고, 상기 조성물은 부형제, 담체, 희석제 및 동등한 매체에서 선택되는 제약학적으로 허용되는 매체, 그리고 화합물 4, R_p-4, 또는 S_p-4의 수화물, 용매화합물, 그리고 임의의 결정질 형태를 포함하는 것으로 의도되는 임의의 화합물 4, R_p-4, 또는 S_p-4를 포함한다.
- [0110] 화합물 4, R_p-4, 또는 S_p-4는 매우 다양한 경구 투여 제형 및 담체에서 독립적으로 조제될 수 있다. 경구 투여는 정제, 코팅된 정제, 경성과 연성 젤라틴 캡슐, 용액, 에멀전, 시럽, 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 화합물 4, R_p-4, 또는 S_p-4는 다른 투여 경로 중에서 좌약 투여로 투여될 때 효과적이다. 가장 편리한 투여 방식은 일반적으로, 질환의 심각도 및 항바이러스 약제에 대한 환자의 반응에 따라 조정될 수 있는 편리한 일일 투약 계획 (daily dosing regimen)을 이용한 경구 투여이다.
- [0111] 한 가지 이상의 전통적인 부형제, 담체, 또는 희석제와 함께 화합물 4, R_p-4, 또는 S_p-4는 제약학적 조성물 및 단위 제형의 형태로 배치될 수 있다. 제약학적 조성물 및 단위 제형은 추가의 활성 화합물과 함께 또는 이들 활성 화합물 없이, 전통적인 비율로 전통적인 성분으로 구성될 수 있고, 그리고 단위 제형은 이용되는 의도된 일일 용량 범위 (daily dosage range)에 상응하는 적절한 효과량의 활성 성분을 포함할 수 있다. 제약학적 조성물은 고체, 예를 들면, 정제 또는 충전된 캡슐, 반고체, 분말, 서방형 제제, 또는 액체, 예를 들면, 현탁액, 에멀전, 또는 경구 이용을 위한 충전된 캡슐로서; 또는 직장 또는 질 투여를 위한 좌약의 형태로 이용될 수 있다. 전형적인 제조물은 대략 5% 내지 대략 95%의 활성 화합물(들) (w/w)을 포함할 것이다.
- [0112] 화합물 4, R_p-4, 또는 S_p-4는 단독으로 투여될 수 있지만, 일반적으로 의도된 투여 경로 및 표준 제약학적 규칙 (standard pharmaceutical practice)과 관련하여 선택되는 한 가지 이상의 적절한 제약학적 부형제, 희석제 또는 담체와의 혼합물로 투여될 것이다.
- [0113] 고형 형태 제조물에는 예로써, 분말, 정제, 알약, 캡슐, 좌약, 그리고 분산가능 과립이 포함된다. 고형 담체는 희석제, 붕미제, 용해제, 윤활제, 현탁제, 결합제, 보존제, 정제 봉해제, 또는 캡슐화 물질로서 기능할 수도 있는 한 가지 이상의 물질일 수 있다. 분말 내에서, 담체는 일반적으로, 미세하게 분할된 활성 성분과의 혼합물인 미세하게 분할된 고체이다. 정제 내에서, 활성 성분은 일반적으로, 적절한 비율로 필요한 결합 능력 (binding capacity)을 갖는 담체와 혼합되고 원하는 형상과 크기로 압축된다. 적절한 담체에는 탄산마그네슘, 스테아르산 마그네슘, 활석, 당류, 락토오스, 펙틴, 텍스트린, 전분, 젤라틴, 트레거캔스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복

시메틸셀룰로오스, 저융점 왁스, 코코아 버터 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 고형 형태 제조물은 활성 성분 이외에, 착색제, 풍미제, 안정화제, 완충제, 인공 및 자연 감미료, 분산제, 증점제, 용해보조제(solubilizing agent) 등을 포함할 수 있다. 고형 제제의 실례는 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; 그리고 US 7,462,608에서 예시되고, 이들 각각은 참조로서 병합된다.

[0114] 액상 제제 역시 경구 투여에 적합하고, 여기에는 에멀전, 시럽, 엘릭시르 및 수성 현탁액이 포함된다. 이들에는 사용 직전에 액상 형태 제조물로 전환되도록 의도되는 고형 형태 제조물이 포함된다. 액상 제제의 실례는 U.S. 특허 No. 3,994,974; 5,695,784; 그리고 6,977,257에서 예시된다. 에멀전은 용액, 예를 들면, 수성 프로필렌 글리콜 용액에서 제조되거나, 또는 유화제(emulsifying agent), 예를 들면, 레시틴, 소르비탄 모노올레에이트, 또는 아카시아를 포함할 수 있다. 수성 현탁액은 물에서 미세하게 분할된 활성 성분을 점성 물질, 예를 들면, 천연 또는 합성 검, 수지, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 그리고 다른 널리 공지된 현탁제와 함께 분산시킴으로써 제조될 수 있다.

[0115] 화합물 4, R₁-4, 또는 S₁-4는 좌약으로서 투여를 위하여 독립적으로 조제될 수 있다. 저융점 왁스, 예를 들면, 지방산 글리세리드 또는 코코아 버터의 혼합물이 먼저 용융되고, 그리고 활성 성분은 예로써, 교반에 의해 균질하게 분산된다. 용융된 균질한 혼합물은 이후, 편의한 크기의 주형 내로 부어지고, 냉각되고, 그리고 응고된다.

[0116] 화합물 4, R₁-4, 또는 S₁-4는 질 투여를 위하여 독립적으로 조제될 수 있다. 활성 성분 이외에 이런 담체를 포함하는 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 폼(foam) 또는 스프레이가 당분야에서 적합한 것으로 알려져 있다. 또한, 이들 중에서 일정한 제제는 살정자제(spermicidal agent)를 포함하거나 포함하지 않고, 콘돔과 함께 이용될 수 있다.

[0117] 제약학적 담체, 희석제 및 부형제와 함께 적절한 제제는 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995*, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pennsylvania에서 기술되고, 이는 본 발명에 참조로서 병합된다. 숙련된 제제 과학자는 본 발명에서 예상되는 화합물을 포함하는 조성물을 불안정하게 만들거나, 또는 그들의 치료 활성을 약화시키지 않으면서 특정 투여 경로를 위한 다수의 제제를 제공하기 위하여, 본 명세서의 교시 내에서 제제를 변경할 수 있다.

[0118] 부가적으로, 정제된 화합물 4, R₁-4, 또는 S₁-4는 리포솜 또는 미셀(micelle)과 함께 독립적으로 조제될 수 있다. 리포솜과 관련하여, 정제된 화합물은 U.S. 특허 No. 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; 그리고 7,070,801에서 개시된 바와 같은 방식으로 조제될 수 있는 것으로 예상되고, 이들 각각은 참조로서 병합된다. 교질입자와 관련하여, 정제된 화합물은 U.S. 특허 No. 5,145,684 및 5,091,188에서 개시된 바와 같은 방식으로 조제될 수 있는 것으로 예상되고, 이들 둘 모두 참조로서 병합된다.

[0119] 다섯 번째 구체에는 아래의 바이러스 병원체 중에서 임의의 한 가지에 의한 감염의 결과인 임의의 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 화합물 4, R₁-4, 또는 S₁-4 중에서 한 가지의 용도에 관한 것이다: C형 간염 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 리노바이러스, 폴리오 바이러스, A형 간염 바이러스, 소 바이러스성 설사 바이러스 및 일본 뇌염 바이러스.

[0120] 용어 "약제"는 이를 필요로 하는 개체의 치료 및/또는 예방의 방법에 이용되는 물질을 의미하고, 여기서 상기 물질에는 화합물 4, R₁-4, 또는 S₁-4 중에서 한 가지를 포함하는 조성물, 제제, 제형 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에서 개시된 임의의 항바이러스 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서, 단독으로 또는 본 명세서에서 개시된 다른 화합물과 공동으로, 화합물 4, R₁-4, 또는 S₁-4 중에서 한 가지의 용도가 예상된다. 약제에는 본 명세서에서 개시된 네 번째 구체에 의해 예상되는 조성물 중에서 임의의 한 가지가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0121] 여섯 번째 구체에는 필요로 하는 개체에서 치료 및/또는 예방의 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 화합물 4,

R₀-4, 또는 S₀-4 중에서 한 가지의 치료 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

- [0122] 이를 필요로 하는 개체는 C형 간염 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 리노바이러스, 폴리오 바이러스, A형 간염 바이러스, 소 바이러스성 설사 바이러스 또는 일본 뇌염 바이러스, 플라비비리대 바이러스 또는 돼지열병 바이러스 또는 헤파시바이러스, 또는 앞서 열거된 임의의 바이러스에 동등한 또는 필적하는 증상을 유발하는 바이러스 병원체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 본 명세서에서 개시된 임의의 바이러스 병원체에 의한 감염의 결과인 임의의 질환을 앓는 개체인 것으로 의도된다.
- [0123] 용어 "개체"는 소, 돼지, 양, 닭, 칠면조, 물소, 라마, 타조, 개, 고양이, 그리고 인간이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 포유동물을 의미하고, 바람직하게는 개체는 인간이다. 아홉 번째 구체예의 개체를 치료하는 방법에서, 본 발명에서 예상되는 임의의 화합물이 단독으로 또는 본 명세서에서 개시된 다른 화합물과 함께 이용될 수 있다.
- [0124] 본 명세서에서, 용어 "치료 효과량"은 개체에서 질환의 증상을 감소시키는데 필요한 양을 의미한다. 치료 효과량은 각각의 특정 경우에서 개별적인 필요조건에 맞게 조정될 것이다. 치료 효과량은 다수의 인자, 예를 들면, 치료되는 질환의 심각도, 환자의 연령과 전반적인 건강 상태, 환자가 치료를 받고 있는 다른 약제, 투여 경로와 형태, 그리고 관련된 의료 관계자의 선호와 경험에 따라 폭넓은 범위 내에서 변할 수 있다. 경구 투여의 경우에, 일일 대략 0.001 내지 대략 10 g, 또는 그 사이에 모든 값, 예를 들면, 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, 그리고 9.5를 비롯한 일일 용량이 단일요법 (monotherapy) 및/또는 복합 요법 (combination therapy)에서 적합할 것이다. 특정한 일일 용량은 일일 대략 0.01 내지 대략 1 g, 또는 그 사이에 모든 0.01 g (즉, 10 mg)의 증분값 (incremental value), 바람직하게는 일일 대략 0.01 내지 대략 0.8 g, 더욱 바람직하게는 일일 대략 0.01 내지 대략 0.6 g, 그리고 가장 바람직하게는 일일 대략 0.01 내지 대략 0.25 g의 일일 용량이고, 이들 각각은 그 사이에 0.01 g의 증분값을 포함한다. 일반적으로, 치료는 바이러스를 신속하게 감소시키거나 제거한 다음에 용량을 감염의 재발을 예방할 만큼 충분한 수준까지 감소시키기 위하여 큰 최초 "부하 용량 (loading dose)"으로 시작된다. 본 명세서에서 기술된 질환의 치료에서 당업자는 과도한 실험 없이, 그리고 통상의 지식, 경험 및 본 출원의 교시에 기준하여, 소정의 질환 및 환자에 대한 본 명세서에서 개시된 화합물의 치료 효과량을 확정할 수 있을 것이다.
- [0125] 치료 효능은 단백질 수준, 예를 들면, 혈청 단백질 (가령, 알부민, 응고 인자, 알칼리성 포스파타아제, 아미노 트랜스퍼라아제 (가령, 알라닌 트랜스아미나아제, 아스파르테이트 트랜스아미나아제), 5'-뉴클레오시다아제, γ-글루타미닐트랜스펩티다아제 등), 빌리루빈의 합성, 콜레스테롤의 합성, 그리고 담즙산의 합성이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 간 기능; 탄수화물 물질대사, 아미노산 및 암모니아 물질대사가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 간 물질대사 기능의 검사로부터 확인될 수 있다. 대안으로, 치료 효능은 HCV-RNA를 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 이들 검사의 결과는 용량 최적화를 가능하게 할 것이다.
- [0126] 여섯 번째 구체예의 첫 번째 측면은 병든 개체에서 치료 및/또는 예방의 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 화합물 4, R₀-4, 또는 S₀-4 중에서 한 가지로 표시되는 화합물의 치료 효과량 및 다른 항바이러스제의 치료 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다; 여기서 상기 투여는 동시 투여 또는 교대 투여이다. 교대 투여 사이의 기간은 1-24 시간 범위일 수 있고, 상기 범위에는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 그리고 23 시간을 비롯한 그 사이에 임의의 하위-범위 (sub-range)가 포함되는 것으로 이해된다.
- [0127] "다른 항바이러스제"의 실례에는 HCV NS3 프로테아제 저해물질 (참조: 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, 그리고 WO 2008010921); HCV NS5B 저해물질 (참조: 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, 그리고 WO2007095269); HCV NS4 저해물질 (참조: WO 2005067900 및 WO 2007070556); HCV NS5a 저해물질 (참조: US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO

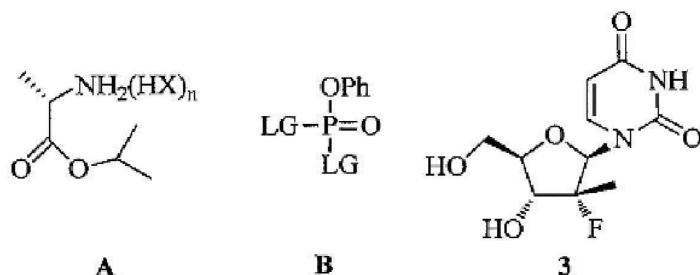
2006120251, 그리고 WO 2006120252); 톨-유사 수용체 작용약 (참조: WO 2007093901); 그리고 기타 저해물질 (참조: WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852, 그리고 WO 2004035571); 그리고 2008년 3월 21일 제출된 U.S. 특허 출원 No. 12/053,015 (US 2010/0016251)에서 개시된 화합물 (이들의 내용은 참조로서 병합된다), 인터페론- α , 인터페론- β , 폐결핵화된 인터페론- α , 리바비린, 레보비린 (levovirin), 비라미딘 (viramidine), 다른 뉴클레오시드 HCV 중합효소 저해물질, HCV 비-뉴클레오시드 중합효소 저해물질, HCV 프로테아제 저해물질, HCV 헬리카아제 저해물질 또는 HCV 융합 저해물질이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0128] 화합물 **4**, R_p -**4**, 또는 S_p -**4** 중에서 한 가지가 다른 항바이러스제와 함께 투여될 때, 활성이 부모 화합물에 비하여 증가될 수 있다. 치료가 복합 요법일 때, 이런 투여는 뉴클레오시드 유도체의 투여에 대하여 동시 또는 순차적일 수 있다. 따라서 본 명세서에서 "동시 투여"는 동일한 시점에 또는 상이한 시점에 작용제의 투여를 포함한다. 동일한 시점에 2가지 이상의 작용제의 투여는 2가지 이상의 활성 성분을 포함하는 단일 제제에 의해, 또는 단일 활성제를 포함하는 2가지 이상의 제형의 실질적으로 동시 투여에 의해 달성될 수 있다.

[0129] 본 명세서에서 치료에 대한 언급은 현재 질환의 질환뿐만 아니라 예방까지 확대되는 것으로 이해될 것이다. 게다가, 본 명세서에서, HCV 감염의 "치료"에는 HCV 감염과 연관되거나 HCV 감염에 의해 매개되는 질환 또는 이상, 또는 이들의 임상적 증상의 치료 또는 예방 역시 포함된다.

[0130] 제조

[0131] 일곱 번째 구체예는 화합물 **4**, R_p -**4**, 또는 S_p -**4** 중에서 임의의 한 가지의 제조 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 a) 이소프로필-알라네이트, **A**, 디-LG-페닐포스페이트, **B**, 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘, **3**, 그리고 염기를 반응시켜 S_p -**4** 및 R_p -**4** 중에서 적어도 한 가지를 포함하는 첫 번째 혼합물을 획득하는 단계;



[0132] 여기서 X는 산의 짝염기이고, n은 0 또는 1이고, 그리고 LG는 이탈기이고; b) 첫 번째 혼합물을 보호 화합물과 반응시켜 보호된 S_p -**4** 및 보호된 R_p -**4** 중에서 적어도 한 가지를 포함하는 두 번째 혼합물을 획득하는 단계; 그리고 c) **4**, R_p -**4**, 또는 S_p -**4**를 획득하기 위하여, 두 번째 혼합물을 선택적으로 결정화, 크로마토그래피, 또는 추출하는 단계를 포함한다.

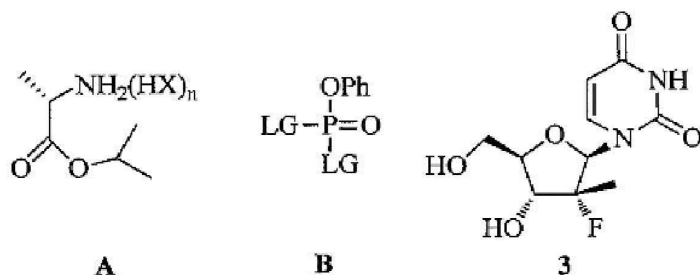
[0134] 일곱 번째 구체예의 첫 번째 측면에서, 이소프로필 알라네이트는 바람직하게는, 실질적으로 무수성인 염화수소산 염으로 존재한다.

[0135] 일곱 번째 구체예의 두 번째 측면에서, 염기는 N-메틸이미다졸이다.

[0136] 일곱 번째 구체예의 세 번째 측면에서, **A**-대(對)-**B**-대(對)-**3**의 몰 비율은 대략 1.6-대(對)-1.3-대(對)-1이다.

[0137] 일곱 번째 구체예의 네 번째 측면에서, 보호 화합물은 t-부틸-디메틸-실릴-염화물이다.

[0138] 여덟 번째 구체예는 S_p -**4** 또는 R_p -**4**를 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 a) 이소프로필-알라네이트, **A**, 디-LG-페닐포스페이트, **B**, 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘, **3**, 그리고 염기를 반응시켜 S_p -**4** 및 R_p -**4** 중에서 적어도 한 가지를 포함하는 첫 번째 혼합물을 획득하는 단계;



[0139]

[0140]

여기서 X는 산의 짝염기이고, n은 0 또는 1이고, 그리고 LG는 이탈기이고; 그리고 b) 정제된 S_p-4 또는 R_p-4를 획득하기 위하여, 두 번째 혼합물을 선택적으로 결정화, 크로마토그래피, 또는 추출하는 단계를 포함한다.

[0141]

R_p-4를 제조하기 위한 여덟 번째 구체예의 첫 번째 측면은 두 번째 혼합물 또는 정제된 R_p-4 혼합물을 용매에 용해시키거나 현탁시킴으로써 두 번째 혼합물 또는 정제된 R_p-4를 더욱 정제하는 단계; 선택적으로, 그 이후에 결정성 R_p-4로 시딩 (seeding)하는 단계; 그리고 충분한 반응매를 첨가하여 결정성 R_p-4를 획득하는 단계를 부가적으로 포함한다.

[0142]

S_p-4를 제조하기 위한 여덟 번째 구체예의 두 번째 측면은 두 번째 혼합물 또는 정제된 S_p-4를 용매에 용해시키거나 현탁시킴으로써 두 번째 혼합물 또는 정제된 S_p-4를 더욱 정제하는 단계; 그 이후에 대략 실온에서 결정성 S_p-4로 시딩하는 단계; S_p-4를 다수로 포함하는 첫 번째 고체를 수집하는 단계; 첫 번째 고체를 환류 온도에서 용매에 용해시키는 단계; 그리고 냉각하거나, 또는 반응매를 첨가하여 두 번째 고체를 획득하는 단계를 부가적으로 포함한다.

[0143]

S_p-4를 제조하기 위한 여덟 번째 구체예의 세 번째 측면은 두 번째 혼합물 또는 정제된 S_p-4 혼합물을 첫 번째 용매에 용해시키거나 현탁시킴으로써 S_p-4를 더욱 정제한 다음에 첫 번째 조성물을 획득하기 위하여 반응매를 첨가하고, 여기서 잔여 용매/반응매는 디캔팅 (decanting)에 의해 제거되어 잔류물이 획득되는 단계; 잔류물을 첫 번째 용매 및 반응매를 포함하는 용액으로 처리하여 두 번째 조성물을 산출하고, 여기서 상기 조성물은 압력이 감소하면, 첫 번째 고체를 제공하는 단계; 세 번째 조성물을 획득하기 위하여 두 번째 용매를 이용하여 첫 번째 고체를 용해시키거나 현탁시키는 단계; S_p-4의 시드 결정 (seed crystal)을 세 번째 조성물에 첨가하는 단계; 두 번째 고체를 수집하는 단계; 두 번째 고체를 세 번째 용매에 용해시키거나 현탁시키고, 그리고 필요하면 세 번째 용매를 환류 온도로 선택적으로 가열하여 네 번째 조성물을 획득하는 단계; 그리고 필요하면 네 번째 조성물을 냉각하여 S_p-4를 포함하는 세 번째 고체를 획득하고, 상기 고체는 여과에 의해 수집되는 단계를 부가적으로 포함한다.

[0144]

S_p-4를 제조하기 위한 여덟 번째 구체예의 네 번째 측면에서, S_p-4는 두 번째 혼합물 또는 정제된 S_p-4에 실리카 겔을 첨가한 다음에 용매 증발로 건식 슬러리를 제공하는 단계; 건식 슬러리를 첫 번째 용매/반응매 조합에서 교반하여 첫 번째 습식 슬러리를 획득하는 단계; 첫 번째 습식 슬러리로부터 첫 번째 용매/반응매 조합을 디캔팅하여 두 번째 습식 슬러리 및 첫 번째 조성물을 획득하는 단계; 두 번째 습식 슬러리에 두 번째 용매/반응매 조합을 첨가한 다음에 교반하는 단계; 두 번째 습식 슬러리로부터 두 번째 용매/반응매 조합을 디캔팅하여 세 번째 습식 슬러리 및 두 번째 조성물을 획득하는 단계; 세 번째 습식 슬러리 또는 추가의 습식 슬러리에서 단계 g)-h)를 선택적으로 반복하는 단계; 두 번째 조성물, 그리고 선택적 단계 i)로부터 획득된 선택적으로 임의의 추가의 조성물로부터 용매를 증발시켜 첫 번째 고체를 획득하는 단계; 첫 번째 고체를 세 번째 용매 및 선택적으로 네 번째 용매를 포함하는 용액에 용해시키거나 현탁시켜 세 번째 조성물을 획득하는 단계; S_p-4의 시드 결정을 세 번째 조성물에 선택적으로 첨가하는 단계; 세 번째 조성물로부터 S_p-4를 포함하는 두 번째 고체를 획득하는 단계; 그리고 세 번째 용매를 이용하여 두 번째 고체를 선택적으로 재결정화시켜 S_p-4를 포함하는 세 번째 고체를 획득하는 단계에 의해, 두 번째 혼합물 또는 정제된 S_p-4에 의해 더욱 정제된다.

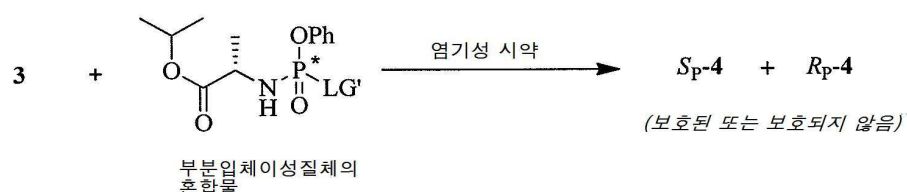
[0145]

당업자는 이들 화합물이 전통적인 추출, 전통적인 결정화 또는 전통적인 크로마토그래피 기술에 의해 분리될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 전통적인 크로마토그래피 기술에는 한 가지 이성질체를 증강된 수준 (50-100%)으로

산출하고, 이후 이를 결정화시키기 위한 실리카 겔 (예로써, DCM 내의 3-5% 메탄올 또는 DCM 내의 4-6% 이소프로판올 이용) 상에서 크로마토그래피가 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 대안으로, 역상 크로마토그래피 (예로써, 1-30% 아세트니트릴-수성 이동상 이용)가 이용될 수 있다. 게다가, 화합물은 바람직하게는, 적절한 키랄 매체, 예를 들면, Daicel Chiralpack IA를 이용하여, 이산화탄소를 주요 용매로서, 그리고 알코올, 예를 들면, 메탄올을 변형자 (modifier)로서 이용하는 초임계 유체 크로마토그래피 SFC에 의해 분리될 수 있다. 대안으로, 적절한 키랄 매체, 예를 들면, Daicel ChiralPack IA를 이용하여, 용매 혼합물, 예를 들면, 헥산/이소프로판올 또는 단일 용매, 예를 들면, 에틸 아세테이트를 이용한 SMB 크로마토그래피가 이용될 수 있다.

[0146]

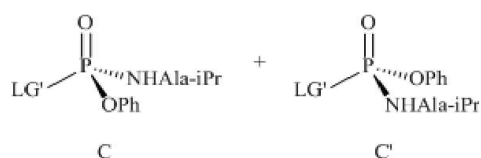
아홉 번째 구체예는 S_p-4를 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 a) 이소프로필-알라닐-포스포라미데이트를 3'-O-보호된 또는 보호되지 않은 **3**, 그리고 염기성 시약과 반응시켜 보호된 또는 보호되지 않은 S_p-4를 포함하는 조성물을 획득하는 단계를 포함하고:



[0147]

[0148]

여기서 이소프로필-알라닐-포스포라미데이트는 아래의 구조로 표시되는 부분입체이성질체의 혼합물로 구성되고:



[0149]

[0150]

여기서 C:C'의 비율은 대략 1:1이다.

[0151]

첫 번째 측면에서, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 C:C'의 비율은 대략 1:1보다 크거나, 또는 대략 1:1에 동등하다

[0152]

두 번째 측면에서, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 C:C'의 비율은 대략 1:1보다 크다.

[0153]

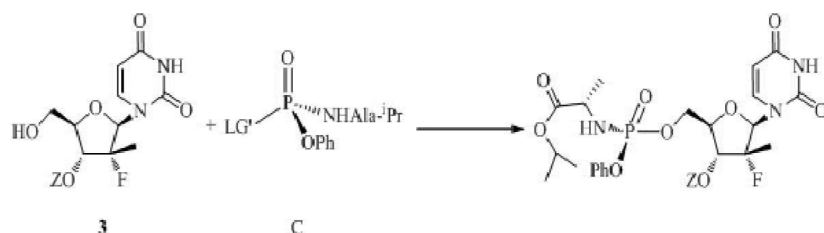
세 번째 측면에서, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 C:C'의 비율은 적어도 대략 1.5:1, 대략 2.3:1, 대략 4:1, 대략 5.7:1, 대략 9:1, 대략 19:1, 대략 32.3:1, 대략 49:1, 또는 대략 99:1이다.

[0154]

네 번째 측면에서, LG'는 p-니트로페녹시드 (nitrophenoxide)이고, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 C:C'의 비율은 적어도 대략 1.5:1, 대략 2.3:1, 대략 4:1, 대략 5.7:1, 대략 9:1, 대략 19:1, 대략 32.3:1, 대략 49:1, 또는 대략 99:1이다.

[0155]

S_p-4를 제조하기 위한 다섯 번째 측면은 a) 이소프로필-알라닐-포스포라미데이트 (C)를 3'-O-보호된 또는 보호되지 않은 **3**, 그리고 염기성 시약과 반응시켜 보호된 또는 보호되지 않은 S_p-4를 포함하는 조성물을 획득하는 단계:



[0156]

[0157]

여기서 Z는 보호기 또는 수소이고, 그리고 LG'는 이탈기이고; 그리고 c) 정제된 보호된 또는 보호되지 않은 S_p-

4를 획득하기 위하여, 획득된 보호된 또는 보호되지 않은 S_p -4를 선택적으로 결정화, 크로마토그래피, 또는 추출하는 단계를 포함한다. 하위-구체예에서, LG'는 토실레이트 (tosylate), 캄포설포네이트 (camphorsulfonate), 또는 적어도 하나의 전자 끄는 기 (electron withdrawing group)로 치환된 아릴옥시드 (aryloxide)이다; 더욱 바람직하게는, LG'는 p-니트로페녹시드, 2,4-디니트로페녹시드, 그리고 펜타플루오로페녹시드에서 선택된다. 다른 하위-구체예에서, S_p -4가 보호될 때, 다시 말하면, Z가 수소가 아닐 때, 아홉 번째 구체예의 방법은 또한 보호된 S_p -4를 탈보호하는 단계에 관한 것이다. 다른 하위-구체예에서, 반응은 극성 비양성자성 용매, 예를 들면, 테트라히드로푸란 또는 다른 에테르성 용매에서, 단독으로, 또는 서로 또는 C_2 내지 C_7 니트릴, 예를 들면, 아세토니트릴과 공동으로 수행된다.

[0158] 아홉 번째 구체예의 방법은

[0159] 1) $(LG')P(O)(LG)_2$ (여기서 LG는 LG'와 독립적으로, 이탈기이다)를

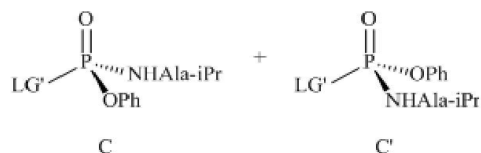
[0160] (i) 이소프로필-알라네이트 및 첫 번째 염기와 반응시켜 $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ 를 획득한 다음에 $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ 를 페놀 및 두 번째 염기와 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하거나,

[0161] (ii) 페놀 및 첫 번째 염기와 반응시켜 $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ 를 획득한 다음에 $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ 를 이소프로필-알라네이트 및 두 번째 염기와 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하거나, 또는

[0162] (iii) 이소프로필-알라네이트, 페놀, 그리고 적어도 하나의 염기를 조합한 것과 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하는 단계; 또는

[0163] 2) $(PhO)P(O)(LG)_2$ (여기서 LG'는 LG와 독립적으로, 이탈기이다)를

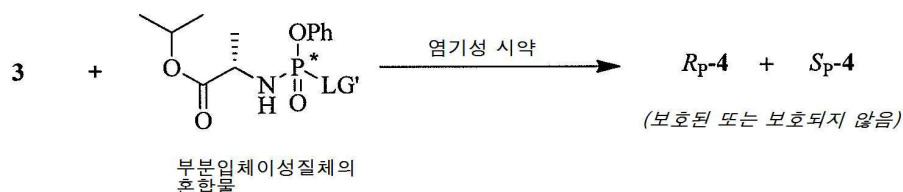
[0164] (i) 이소프로필-알라네이트 및 첫 번째 염기와 반응시켜 $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ 를 획득한 다음에 $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ 를 이탈기 전구체 및 두 번째 염기와 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하고: 그리고



[0165]

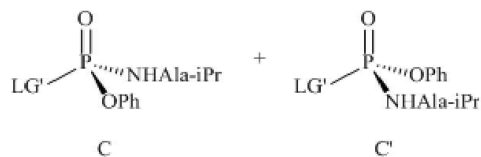
[0166] 상기 혼합물을 크로마토그래피, 또는 결정화시켜 **C**를 획득하는 단계를 더욱 포함한다. 아홉 번째 구체예의 한 측면에서, 이소프로필 알라네이트는 바람직하게는, 실질적으로 무수성인 염화수소산 염으로서 존재한다.

[0167] 열 번째 구체예는 R_p -4를 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 a) 이소프로필-알라닐-포스포라미데이트를 3'-O-보호된 또는 보호되지 않은 **3**, 그리고 염기성 시약과 반응시켜 보호된 또는 보호되지 않은 R_p -4를 포함하는 조성물을 획득하는 단계를 포함하고:



[0168]

[0169] 여기서 이소프로필-알라닐-포스포라미데이트는 아래의 구조로 표시되는 부분입체이성질체의 혼합물로 구성되고:



[0170]

[0171]

여기서 $\text{C}' : \text{C}$ 의 비율은 대략 1:1이다.

[0172]

첫 번째 측면에서, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 $\text{C}' : \text{C}$ 의 비율은 대략 1:1보다 크거나, 또는 대략 1:1에 동등하다

[0173]

두 번째 측면에서, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 $\text{C}' : \text{C}$ 의 비율은 대략 1:1보다 크다.

[0174]

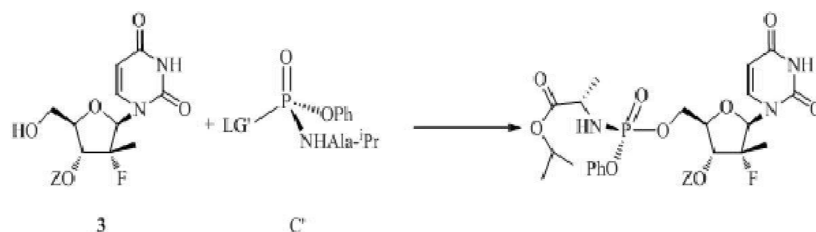
세 번째 측면에서, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 $\text{C}' : \text{C}$ 의 비율은 적어도 대략 1.5:1, 대략 2.3:1, 대략 4:1, 대략 5.7:1, 대략 9:1, 대략 19:1, 대략 32.3:1, 대략 49:1, 또는 대략 99:1이다.

[0175]

네 번째 측면에서, LG' 는 p-니트로페녹시드이고, 염기성 시약은 t-부틸마그네슘 염화물이고, 그리고 $\text{C}' : \text{C}$ 의 비율은 적어도 대략 1.5:1, 대략 2.3:1, 대략 4:1, 대략 5.7:1, 대략 9:1, 대략 19:1, 대략 32.3:1, 대략 49:1, 또는 대략 99:1이다.

[0176]

R_4 -4를 제조하기 위한 다섯 번째 측면은 a) 이소프로필-알라닐-포스포라미데이트 (C')를 3'-O-보호된 또는 보호되지 않은 **3**, 그리고 염기성 시약과 반응시켜 보호된 또는 보호되지 않은 R_4 -4를 포함하는 조성물을 획득하는 단계:



[0177]

[0178]

여기서 Z는 보호기 또는 수소이고, 그리고 LG' 는 이탈기이고; 그리고 c) 정제된 보호된 또는 보호되지 않은 R_4 -4를 획득하기 위하여, 획득된 보호된 또는 보호되지 않은 R_4 -4를 선택적으로 결정화, 크로마토그래피, 또는 추출하는 단계를 포함한다. 하위-구체에서, LG' 는 토실레이트, 캄포설포네이트, 또는 적어도 하나의 전자 끄는기로 치환된 아릴옥시드이다; 더욱 바람직하게는, LG' 는 p-니트로페녹시드, 2,4-디니트로페녹시드, 그리고 펜타플루오로페녹시드에서 선택된다. 다른 하위-구체에서, R_4 -4가 보호될 때, 다시 말하면, Z가 수소가 아닐 때, 열 번째 구체에서의 방법은 보호된 R_4 -4를 탈보호하는 단계에 더욱 관한 것이다. 다른 하위-구체에서, 반응은 극성 비양성자성 용매, 예를 들면, 테트라히드로퓨란 또는 다른 에테르성 용매에서, 단독으로, 또는 서로 또는 C_2 내지 C_7 니트릴, 예를 들면, 아세토니트릴과 공동으로 수행된다.

[0179]

열 번째 구체에서의 방법은

[0180]

1) $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})_2$ (여기서 LG 는 LG' 와 독립적으로, 이탈기이다)를

[0181]

(i) 이소프로필-알라네이트 및 첫 번째 염기와 반응시켜 $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{Ala-}i\text{Pr})$ 를 획득한 다음에 $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{Ala-}i\text{Pr})$ 를 페놀 및 두 번째 염기와 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하거나,

[0182]

(ii) 페놀 및 첫 번째 염기와 반응시켜 $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{OPh})$ 를 획득한 다음에 $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{OPh})$ 를 이소프로필-알라네이트 및 두 번째 염기와 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하거나, 또는

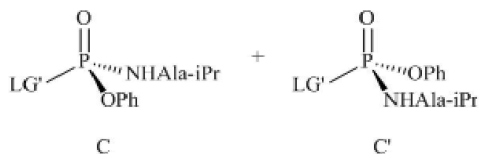
[0183]

(iii) 이소프로필-알라네이트, 페놀, 그리고 적어도 하나의 염기를 조합한 것과 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하는 단계; 또는

[0184]

2) $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})_2$ (여기서 LG 는 LG' 와 독립적으로, 이탈기이다)를

(i) 이소프로필-알라네이트 및 첫 번째 염기와 반응시켜 $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{Ala-}^i\text{Pr})$ 를 획득한 다음에 $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{Ala-}^i\text{Pr})$ 를 이탈기 전구체 및 두 번째 염기와 반응시켜 **C** 및 **C'**를 포함하는 혼합물을 획득하고: 그리고

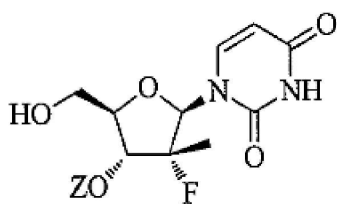


상기 혼합물을 크로마토그래피, 또는 결정화시켜 **C'**를 획득하는 단계를 더욱 포함한다. 열 번째 구체예의 한 측면에서, 이소프로필 알라네이트는 바람직하게는, 실질적으로 무수성인 염화수소산 염으로서 존재한다.

열한 번째 구체예는 일곱 번째 구체예, 여덟 번째 구체예, 아홉 번째 구체예 또는 열 번째 구체예에서 열거된 방법에 의해 획득된 조성물 및 그들의 개별 측면에 관한 것이다. 열한 번째 구체예의 한 측면은 하기에 예시된 구체예 중에서 임의의 한 가지에 의해 획득된 조성물에 관한 것이다. 이렇게 획득된 조성물은 결정질, 결정성, 무정형, 또는 이들의 조합일 수 있다.

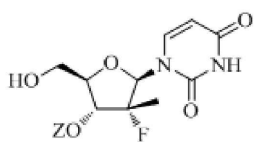
열두 번째 구체예는 R_f -4 또는 S_f -4의 제조에 유용한 화합물 **3**에 관한 것이다.

[화합물 3]



여기서 Z는 보호기 또는 수소이다.

열두 번째 구체예의 첫 번째 측면은 아래의 구조를 갖는 화합물에서 선택된다:



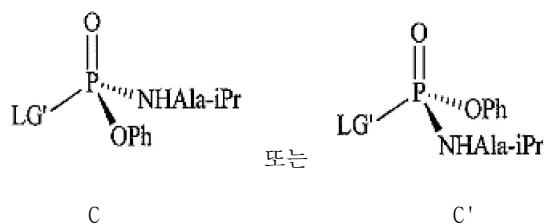
3a: Z = $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$

3b: Z = $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{Ph}$

3c: Z = $-\text{Si}(\text{Me})_2^i\text{Bu}$

3d: Z = $-\text{Si}(^i\text{Pr})_2\text{OSi}(^i\text{Pr})_2\text{OH}$

열세 번째 구체예는 아래의 구조로 표시되고 R_f -4 또는 S_f -4의 제조에 유용한 화합물, 염, 수화물, 용매화합물, 또는 이들의 조합에 관한 것이다:



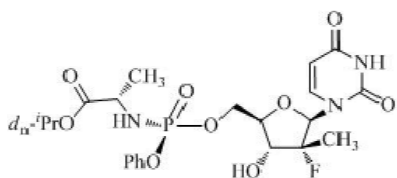
여기서 LG'는 이탈기이다.

[0199] 열세 번째 구체예의 첫 번째 측면에서, LG'는 토실레이트, 캄포설포네이트, 아릴옥시드, 또는 적어도 하나의 전자 끄는 기로 치환된 아릴옥시드이다.

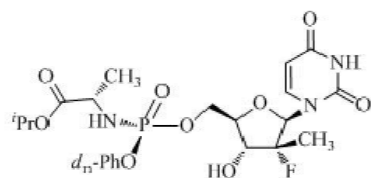
[0200] 열세 번째 구체예의 두 번째 측면에서, LG'는 p-니트로페녹시드, 2,4-디니트로페녹시드, 그리고 펜타플루오로페녹시드에서 선택된다.

[0201] 열네 번째 구체예는 R_p-4 또는 S_p-4의 동위원소-표지된 유사체에 관한 것이다. 용어 "동위원소-표지된" 유사체는 "중수소화 (deuteration)된 유사체", "¹³C-표지된 유사체", 또는 "중수소화된/¹³C-표지된 유사체"인 R_p-4 또는 S_p-4의 유사체를 지칭한다. 용어 "중수소화된 유사체"는 ¹H-동위원소, 다시 말하면, 수소 (H)가 ²H-동위원소, 즉, 중수소 (D)에 의해 치환된 본 명세서에서 기술된 화합물을 의미한다. 중수소 치환은 일부 또는 전부일 수 있다. 일부 중수소 치환은 적어도 하나의 수소가 적어도 하나의 중수소에 의해 치환되는 것을 의미한다. 가령, R_p-4 또는 S_p-4의 경우에, 적어도 아래의 일부 중수소화된 유사체 (여기서 "d_n"은 n-숫자의 중수소 원자를 나타낸다, 예를 들면, 이소프로필 기의 경우에 n = 1-7, 반면 페닐 기의 경우에, n = 1-5), 그리고 하기에 묘사된 것들을 예상할 수 있다.

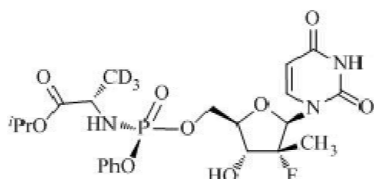
[0202]



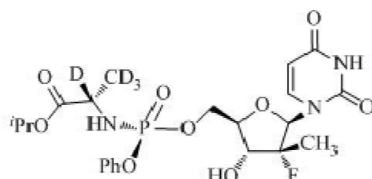
[0203]



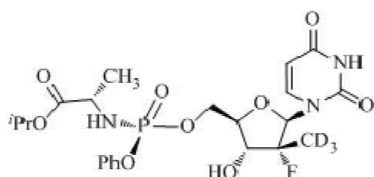
[0204]



[0205]



[0206]



[0207] 비록 상기에 묘사된 메틸 기가 완전하게 중수소화되는 것으로 도시되지만, 당업자는 일부-중수소화된 변형, 예를 들면, -CDH₂ 및 -CD₂H 역시 가능하다는 것을 인지할 것이다. 푸라노오스 및 염기에서 동위원소 라벨 역시 예상된다. 유사하게, 용어 "¹³C-표지된 유사체" 및 "중수소화된/¹³C-표지된 유사체"는 탄소 원자가 ¹³C-동위원소로 농축되는 본 명세서에서 기술된 화합물을 지칭하고, 농축의 정도가 대략 1.1%의 통상적인 자연 존재비 (natural abundance)를 초과한다는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0208]

도 1. 4의 고해상도 XRD 회절도 (diffractogram).

도 2. R_p-4의 고해상도 XRD 회절도.

도 3. S_p-4 (형태 1)의 고해상도 XRD 회절도.

- 도 4. S_p-4 (형태 1)의 고해상도 XRD 회절도.
- 도 5. $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (형태 2)의 고해상도 XRD 회절도.
- 도 6. $S_p-4 \cdot CHCl_3$ (형태 3)의 고해상도 XRD 회절도.
- 도 7. S_p-4 (형태 4)의 고해상도 XRD 회절도.
- 도 8. S_p-4 (형태 5)의 고해상도 XRD 회절도.
- 도 9. S_p-4 (무정형)의 고해상도 XRD 회절도.
- 도 10. S_p-4 (형태 1)에 대한 X-선 결정 구조.
- 도 11. $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (형태 2)에 대한 X-선 결정 (등방성) 구조.
- 도 12. $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (형태 2)에 대한 X-선 결정 (이방성) 구조.
- 도 13. $S_p-4 \cdot CHCl_3$ (형태 3)에 대한 X-선 결정 구조.
- 도 14. 4의 FT-IR 스펙트럼.
- 도 15. R_p-4 의 FT-IR 스펙트럼.
- 도 16. S_p-4 의 FT-IR 스펙트럼.
- 도 17. 4의 TGA 및 DSC 분석.
- 도 18. R_p-4 의 TGA 및 DSC 분석.
- 도 19. S_p-4 의 TGA 및 DSC 분석.
- 도 20a. 8 (S_p -이성질체) (비대칭 단위의 분자 no. 1)에 대한 X-선 결정 구조.
- 도 20b. 8 (S_p -이성질체) (비대칭 단위의 분자 no. 2)에 대한 X-선 결정 구조.

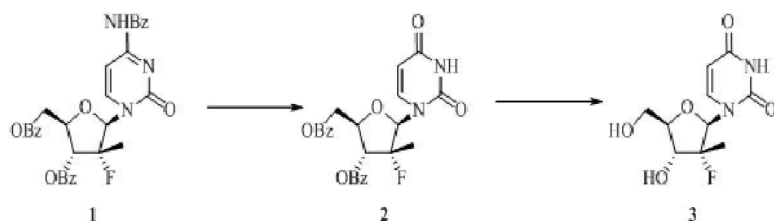
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

단지 실례로써, 아래의 실시예는 본 발명의 더욱 이해하는데 조력하는 역할을 하고, 본 발명의 범위를 한정하지 않는다.

합성 측면

우리딘 뉴클레오시드를 제조하기 위하여, 파일럿 플랜트 규모에서 이미 효율적으로 생산된 **3**의 특정 3',5'-디아실화된 유사체 (하기 참조)의 합성에서의 고순도 (advanced) 트리벤조일화된 시티딘 중간물질을 이용할 수 있다 (참조: WO 2006/031725 또는 US 2006/0122146, 둘 모두 본 발명에 순전히 참조로서 병합된다). 아래의 방법은 확대-축소가능 (scalable)하고 비용-효과적인 것으로 밝혀졌다.

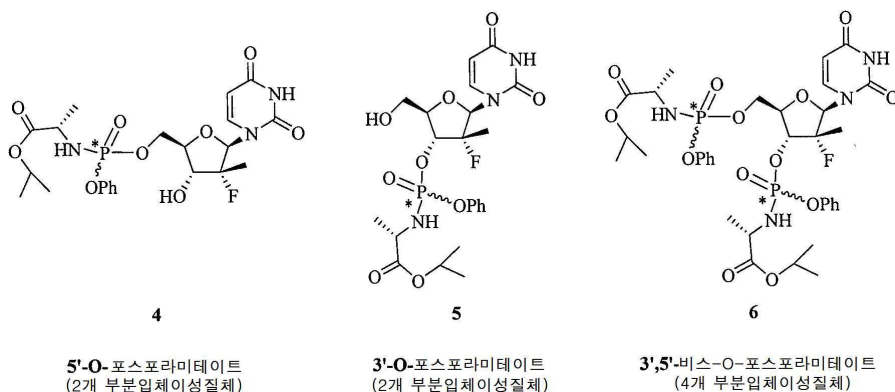


[0214]

3',5'-O-디벤조일-2'-테옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸-N⁴-벤조일시티딘 (1)은 본 발명에 순전히 참조로서 병합되는 WO 2006/031725 및 WO 2008/045419에서 개시된 방법에 의해 획득된다. 1은 70% 수성 아세트산으로 처리되어 3',5'-O-디벤조일-2'-테옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸-우리딘 (2)이 형성된다. 이들 벤조일 에스테르는 다양한 방법, 예를 들면, 알코올성 용매에서 알콕시드, 예를 들면, 메탄올에서 나트륨 메톡시드, 메탄올 또는 에탄올 유사체에서 탄산칼륨, 알킬아민, 예를 들면, 메탄올에서 메틸아민, 부틸아민 등에 의해 가수분해될 수 있다. 메탄올성 암모니아는 더욱 큰 규모 작업을 위하여 선택되었다. 우리딘 산물 (3)은 결정화에 의해 정제되어 트리벤조일화된 시티딘 (1)으로부터 70% 수율을 얻을 수 있다.

[0215]

다수의 기존 문헌의 절차는 여러 배수적 당량의 시약을 이용하여 포스포라미데이트를 만드는 상이한 경로와 조건을 상술한다. 예로써, McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 3504-3515 및 McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7215를 참조한다. 공정 규모 작업의 경우에, 현재 한 가지 실례만 알려져 있는데, 이는 Lehsten et al., *Org. Process Res. Dev.* 2002, 6, 819-822 ("Lehsten")에서 개시된다. 상기 참고문헌에서, 저자들은 "원-팟 절차 (one-pot procedure)"의 개념을 도입하는데, 여기에서 아미노산 염산염 및 페닐 디클로로포스페이트가 디클로로메탄에서 N-메틸이미다졸과 함께 반응된다. 이후, 뉴클레오시드가 첨가되어 원하는 5'-O-포스포라미데이트 산물이 형성되고, 이는 이 경우에, 화학식 4로 표시되는 화합물을 산출할 것이다. 유감스럽게도, Lehsten 절차는 약점을 안고 있었다. 가령, Lehsten 절차는 필요한 것보다 훨씬 과량의 시약을 이용하였고, 이는 비용 및 크로마토그래피 정제의 어려움을 가중시켰다. 게다가, Lehsten은 더욱 낮은 온도 및 뉴클레오시드의 느린 첨가를 이용함으로써 기존 문헌과 비교하여 3'-히드록실보다 5'-히드록실에 대한 반응 선택성 (reaction selectivity)을 제어할 수 있다고 제안하였다.



[0216]

[0217]

본 명세서에서 개시된 화합물에 대하여 Lehsten 절차를 이용하면, 대략 1-5%의 단일-치환된 3'-O-포스포라미데이트 부분입체이성질체 (5) 및 대략 10-30%의 비스-치환된 산물 (6)이 제공되었다. 3'-부분입체이성질체의 극성이 원하는 5'-부분입체이성질체 (4)에서와 매우 유사하기 때문에, 크로마토그래피 분리가 매우 난해하였다. 이러한 공정의 규모 확대 (scale-up)는 극성이 덜한 5'-부분입체이성질체 (4)의 상당 부분을 폐기하거나, 또는 3'-부분입체이성질체 (5)의 더욱 높은 수준의 오염을 수용하지 않고서는 거의 불가능하였다. 최초 50 g 규모 확대에서, 결과의 산물은 대략 3%의 3'-부분입체이성질체 (5) 오염을 포함하였고, 이는 극성이 덜한 5'-부분입체이성질체 (4)와 공동 용리되었다.

[0218]

더욱 적은 양의 시약을 이용하는 반응 조건 및 더욱 용이한 크로마토그래피 분리로 불순물 3'-O-포스포라미데이트 부분입체이성질체 (5)를 선별적으로 제거하여 원하는 5'-O-포스포라미데이트 부분입체이성질체 (4)를 훨씬 높은 순도로 제공하는 방법이 본 명세서에서 개시된다.

[0219]

시약 화학량론 (reagent stoichiometry)의 경우에, 시약의 화학량론이 체계적으로 변경되는 연구가 수행되었고, 그리고 그 결과는 Lehsten가 보고한 바와 같은 가공되지 않은 반응물의 인 NMR에 의해 모니터링되었다. 더욱 성공적인 실행에서, 원하는 산물의 분리된 수율 및 순도가 비교되었다. 1차 5'-히드록실은 2차 3'-히드록실보다 더욱 빠른 속도로 반응하는 것으로 관찰되었다. 이것은 모든 출발 뉴클레오시드를 소모하고 5'- 및 3'-단일치환된 산물 (4 및 5)을 5',3'-비스 치환된 산물 (6)로 변환시키는 반응 과정 간에 경쟁 상황을 발생시킨다. 3'-단일치환된 산물은 5'-단일치환된 산물보다 더욱 빠른 속도로 비스 산물로 변환되고, 따라서 반응을 비스-치환된 산물 쪽으로 더욱 강요함으로써 3'-부분입체이성질체 오염 수준을 감소시키는 것이 가능하다. 하지만, 3'-부분입체이성질체를 제거하는 효과적인 방법으로, 반응은 그만큼의 5'-부분입체이성질체가 비스-치환된 것 (6)으로

변환되어야 하는 희생 없이 더욱 많은 원하는 5'-부분입체이성질체를 생산하도록 최적화될 수 있다. 또한, 아미노산 염산염은 강한 흡습성 (hygroscopic)인 것으로 관찰되었다. 존재하는 임의의 물이 동등량의 페닐 디클로로포스페이트 시약을 소모할 수 있기 때문에, 아미노산이 실질적으로 무수성으로 유지되도록 주의하거나, 또는 사용에 앞서 실질적으로 무수성으로 만들어져야 한다. 간단히 말하면, Lehsten은 아미노산 대 페닐 디클로로포스페이트 대 뉴클레오시드의 최적 비율이 각각, 3.5:2.5:1이라고 보고하였다. 대략 1.6 대 대략 1.3 대 대략 1의 아미노산 대 페닐 디클로로포스페이트 대 뉴클레오시드의 최적 비율이 3'-부분입체이성질체가 효율적으로 제거될 수 있는 조건 하에, 그리고 아미노산 염산염이 실질적으로 무수성일 때 최적인 것으로 관찰되었다. 더욱 적은 양의 시약을 이용함으로써, 시약 부산물로부터 및 감소된 수준의 비스 부분입체이성질체로부터 원하는 산물의 크로마토그래피 분리의 단순화와 결부된 비용 절감이 현실화된다.

[0220] 대안적 절차에서, 3의 3'-히드록시-차단된 유도체는 2 단계에서 t-부틸디메틸실릴 차단기를 이용하여 제조되었다. 이것은 이후, 5'-포스포라미데이트 유도체로 변환되었다. 바람직하게는, 실릴 기는 이후, 제거될 수 있고, 그리고 3' 이성질체 (5) 또는 3',5'-비스 포스포라미데이트 (6)가 존재하지 않을 것이다. 유사한 접근법은 알킬 포스포라미데이트에서 낮은 전체 수율로, Borch 및 Fries (U.S. 특허 5,233,031)에 의해 설명되었다.

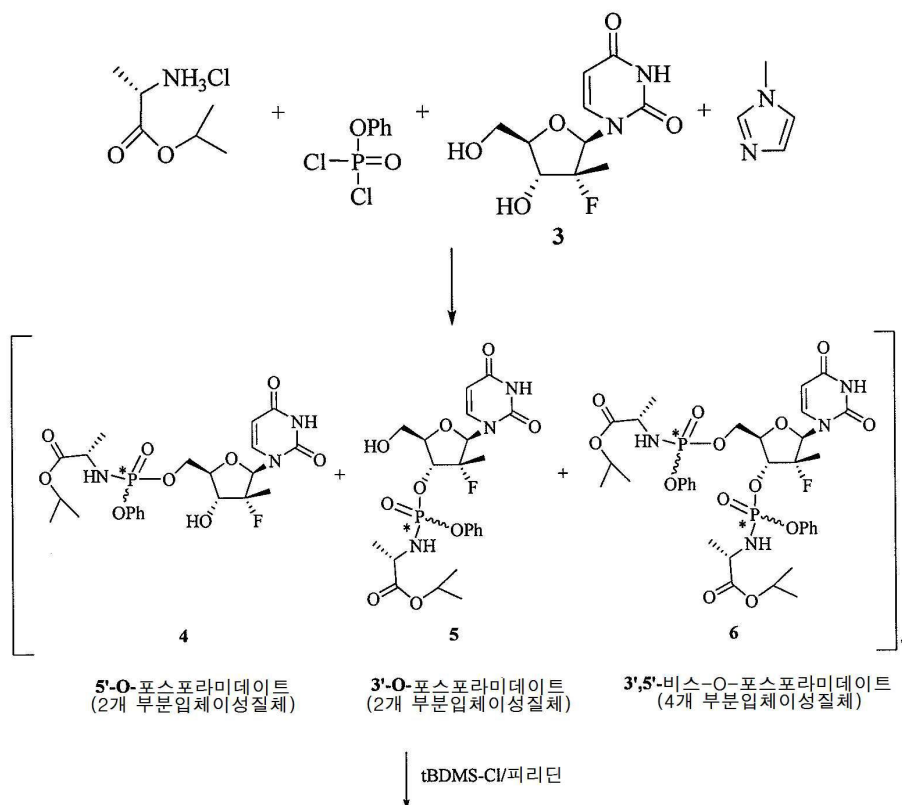
[0221] 다른 대안적 접근법은 직접 합성을 이용하고, 이후 분리를 돕기 위하여 원하는 5'-부분입체이성질체 4로부터 3'-부분입체이성질체 불순물 5를 구별하는데 도움이 되는 화학을 이용하는 것이었다. 원하는 5'-0-포스포라미데이트 4의 유리 2차 히드록실보다 3'-0-포스포라미데이트 불순물 5의 유리 1차 히드록실과 선별적으로 반응하는 기가 요망되었다. 또한, 차단기가 원하는 5'-0-포스포라미데이트 4로부터 결과의 5'-0-차단된 3'-0-포스포라미데이트 산물의 극성을 현저하게 변화시키는 것이 요망되었다. 원하는 5'-부분입체이성질체 4는 변하지 않을 것이기 때문에, 차단기를 제거하는데 필요한 추가 단계가 없을 것이다. 화학적으로 변경된 3'-부분입체이성질체는 이후, 특수한 소거 서포트 (scavenging support)에 의한 또는 추출에 의한 더욱 용이한 크로마토그래피 분리 또는 분리를 가능하게 할 것이다.

[0222] 구체적으로, 차단기 tert-부틸디메틸실릴 (tBDMS)은 이들 기준을 충족하였고, 그리고 증명되고 차후에 멀티-킬로그램 규모로 이용된 첫 번째 것이었다. 용매로서 피리딘 및 염기에서와 같은 일정한 조건 하에, tBDMS 기는 3' 2차 히드록실 위치에서보다 1차 히드록실 위치에서 매우 선별적으로 반응한다. 이러한 포스포라미데이트 반응은 N-메틸이미다졸 (NMI)을 염기로서 이용한다. NMI의 존재에서, 실릴화는 덜 선별적이다. 바람직하게는, NMI의 양은 감소되어야 한다. 이것은 포스포라미데이트 반응 이후에, 반응 용액을 1 N 염화수소산으로 세척함으로써 용이하게 달성될 수 있다. NMI 및 남아있는 출발 뉴클레오시드는 제거되고, 단일 및 비스 치환된 산물 및 시약 부산물의 가공되지 않은 혼합물이 남겨진다. 이것은 이후, 피리딘에 용해되고 tert-부틸디메틸실릴 염화물로 처리된다. 3'-단일치환된 산물 5는 수시간 이내에 5'-0-tBDMS-3'-0-포스포라미데이트 7로 변환된다. 반응 진행은 HPLC에 의해 모니터링될 수 있다. 이러한 실릴화된 산물 7의 극성은 비스-포스포라미데이트 6보다 덜하고 크로마토그래피에 의해 쉽게 제거된다. 이러한 방법을 이용하면, 3'-모노포스포라미데이트 5의 수준을 실릴 처리가 없는 경우의 1-3%와 비교하여 0.1% 이하의 5'-산물 4로 감소시키는 것이 가능하였다. 유사하게, 동일한 조건 하에 디메톡시트리페닐메틸 염화물 (DMT-C1)로 처리 역시 적절하게 작동하였다. 또한, DMT 반응 산물을 TLC에 의해, 가열 또는 산에 노출 시에 밝은 오렌지색으로 착색되는 DMT 보유 분자로서 확인하는 것이 더욱 용이하였다. 또한, 앞서 언급된 바와 같이, 많은 다른 차단기를 계획할 수 있다.

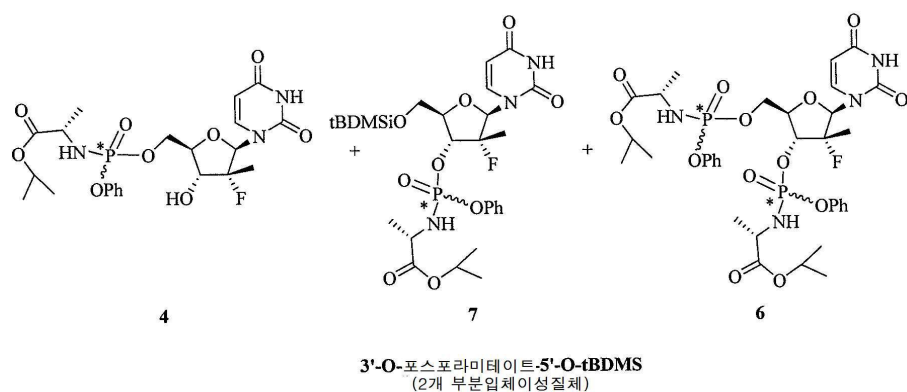
[0223] 이들 반응 조건 및 3'-불순물의 소거 (scavenging) 둘 모두 일반적인 방법이고, 그리고 유리 3' 히드록실을 보유하는 대부분의 뉴클레오시드 포스포라미데이트에 적용될 수 있다. 포스포라미데이트 모이어티는 아미노산 에스테르 및 방향족 알코올의 임의의 조합일 수 있다. 뉴클레오시드 모이어티는 5' 포스포라미데이트가 5'-모노포스페이트를 발생시키고 5'-트리포스페이트 형태로 더욱 물질대사될 수 있는 임의의 뉴클레오시드일 수 있다.

[0224] 아래의 반응식은 원하는 5'-0-포스포라미데이트 (4, 2개의 부분입체이성질체)를 주요 산물로서, 그리고 3'-0-포스포라미데이트 (5, 2개의 부분입체이성질체) 및 3',5'-비스-0-포스포라미데이트 (6, 4개의 부분입체이성질체)를 소량 산물로서 산출하는, 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘의 이소프로필 L-알라네이트 페닐 포스포라미데이트를 만들기 위한 예시적인 주요 반응식이다. 이들 시약은 제조 방법 섹션에서 기술된 바와 같은 화학량론 비율로 첨가된다. 반응은 박층 크로마토그래피 (TLC)에서 UV 가시화 (visualization)에 의해 판단될 때 대략 5%의 출발 물질이 남을 때까지 진행된다. 또한, UPLC/MS는 원하는 5'-산물과 비교하여, 대략 10%의 3',5' 비스-포스포라미데이트 6이 형성된다는 것을 보여주었다. 퀸칭 (quenching) 및 산성 수성 워크업 (workup) 이후에, 유기 층으로부터 가공되지 않은 잔류물은 실릴화를 위해 준비되었다. 기술된 반응 조건 하에, 실릴 기는 3'-0-포스포라미데이트의 유리 5'-히드록실과 선택적으로 반응하여 7이 형성되었다. 반응은 3'-0-포스포라미데이트

가 UPLC/MS에 의해 더 이상 검출되지 않을 때까지 지속되었다.



[0225]



[0226]

[0227] 실릴화 반응 작업 후, 원하는 산물은 실리카 겔에서 크로마토그래피를 수행하고 디클로로메탄 (1-4%)에서 메탄올의 구배로 용리된다. 원하는 5'-모노포스포라미데이트 **4**가 마지막으로 용리된다.

[0228] 제조 방법

[0229] 실시예 1. 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘 (**3**)의 제조

[0230] 10 ℓ 플라스크에서, 3',5'-O-디벤조일-2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸-N⁴-벤조일시티딘 (500 g, 0.874 mol) 및 70% 수성 아세트산 (7.5 ℓ)이 첨가되었다. 생성된 용액은 20시간 동안 환류 (110℃)로 가열되었다. TLC는 완전한 반응을 지시하였다 (디클로로메탄 (DCM) 내 5% 메탄올에서 R_f 0.6). 혼합물은 주변 온도로 냉각되고 물 (2 ℓ)로 희석되었다. 2시간 동안 교반한 이후, 결과의 침전물은 여과에 의해 수집되고, 그리고 고체는 물 (5 ℓ)로 헹군되고 대기 중에 주변 온도에서 12시간 동안 건조되어 360 g (88%)이 제공되었다. 이러한 디벤조일우리딘 중간물질은 0℃에서, 새로 제조된 메탄올성 암모니아 (5.4 ℓ, ca 25%)에 모두 첨가됨으로써 다음 단계에 직접 이용되었다. 상기 온도는 3시간 동안 유지되고, 이후 24시간 동안 15℃로 가온되었다. TLC는 완전한 반응

(DCM 내의 10% 메탄올에서 Rf 0.4)을 지시하였다. 반응 혼합물은 Celite 베드를 통해 여과되고 감압 하에 농축되어 가공되지 않은 산물 (crude product) (216 g)이 제공되었다. 가공되지 않은 산물은 주변 온도에서 3시간 동안 에틸 아세테이트 (325 ml)와 함께 교반되었다. 결과의 고체는 여과에 의해 수집되고 에틸 아세테이트 (216 ml)로 세척되었다. 상기 고체는 진공 하에 주변 온도에서 4시간 동안 건조되어 160 g (78%)의 원하는 산물이 98.7% HPLC 순도로 제공되었다. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) 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.

[0231] **실시예 2. (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로-2H-피리미딘-1-일)-4-(R)-플루오로-3-히드록시-4-메틸-테트라히드로-푸란-2-일메톡시]-페녹시-포스포릴아미노)-프로피온산 이소프로필 에스테르 (4)의 제조**

[0232] 동의어: 5'-O-(이소프로필-L-알라네이트, 페닐 포스포라미딜)-2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸-우리딘 부분임 체이성질성 혼합물.

[0233] 5 ℓ 3-구 플라스크는 기계적 교반기, 염수 열음 수조, 내부 온도계, 그리고 질소 대기가 구비되었다. 플라스크는 L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (82.0 g, 0.490 mole) 및 무수성 디클로로메탄 (0.80 ℓ)으로 채워졌다. 교반되는 동안, 페닐 디클로로포스페이트 (85.0 g, 0.40 mole)가 한꺼번에 첨가되고 교반되었다. 내부 온도를 -5 내지 5°C로 유지하면서, 디클로로메탄 (250 ml) 내의 N-메틸이미다졸 (NMI, 250 g, 3.07 mole) 용액이 30분에 걸쳐 첨가되었다. 생성된 용액은 이러한 온도 범위에서 1시간 동안 교반되었다. 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸-우리딘 (3, 80.0 g, 0.307 mole)이 0°C에서 한꺼번에 첨가되고, 이후 반응 플라스크는 염수 조 (brine bath)에서 천천히 가온되었다. 1시간 시점에, 내부 온도는 최대 -2°C이었다. 1시간 시점에 TLC (DCM 내의 5% 메탄올)는 50% 이상의 뉴클레오시드가 소모되었음을 제시하였다. 염수 조는 제거되고, 그리고 반응 플라스크는 1시간 이상에 걸쳐 주변 온도에 도달하였다. 3시간후 및 5시간 시점에 TLC 모두 95%의 출발 뉴클레오시드가 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물은 메탄올 (100 ml)을 첨가하고 5분 동안 교반함으로써 켄칭되었다.

[0234] 반응 혼합물은 1N HCl (2 X 500 ml), 그 이후에 포화 중탄산나트륨 용액 (2 X 500 ml)으로 세척되었다. 분리된 유기 층은 무수성 황산나트륨 (50 g)에서 건조되고 여과되었다. 생성된 용액은 감압 하에, 이후 높은 진공 하에 증발 건조되어 가공되지 않은 산물이 점성 오일 (170 g)로서 제공되었다. 가공되지 않은 산물의 NMR (^{31}P 및 ^1H)이 획득되었다. $^{31}\text{P-NMR}$ 은 전체 인 통합 중에서 대략 1%가 3' 이성질체 5의 존재에 기인한다는 것을 지시하였다.

[0235] 가공되지 않은 산물에 무수성 피리딘 (1700 ml)이 첨가되었다. 상기 용매는 동시-증발을 통해 가공되지 않은 혼합물의 물 함량을 감소시키기 위하여 감압 하에, 이후 높은 진공 하에 증발되었다. 결과의 오일은 무수성 피리딘 (500 ml)에서 재-용해되고, 이후 과량의 t-부틸디메틸실릴 염화물 (9.0 g, 60mM)이 첨가되었다. 반응물은 주변 온도에서 교반되었다. 반응 진행은 UPLC/MS에 의해 모니터링되었다. 3시간후, 3' 불순물 5는 더 이상 검출되지 않았고, 그리고 반응물은 메탄올 (50 ml)의 첨가로 켄칭되었다.

[0236] 반응물은 감압 하에 오일로 증발되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트 (1.5 ℓ)에 용해되고 1N HCl (2X 500 ml), 그 이후에 포화 중탄산나트륨 용액 (2 X 500 ml)으로 세척되었다. 유기 층은 무수성 황산나트륨 (50 g)에서 건조되고, 여과되고, 감압 하에 증발되어 가공되지 않은 산물이 연한 황색 오일로서 제공되었다.

[0237] 가공되지 않은 오일은 동일한 부피의 디클로로메탄으로 희석되고, 그리고 100 psi의 기압에서 방사상 압축 모듈 (radial compression module) 내에 2.5 kg 실리카 겔 카트리지로 로딩 (loading)되었다. 60 psi 및 400 ml/min의 유속에서 구배 펌프 (gradient pump)를 이용하여, 카트리는 염화메틸렌 (4 ℓ), 그 이후에 염화메틸렌 (48 ℓ)내의 1-4% 구배 메탄올로 세척되었다. 대부분의 주요 불순물 (디-(이소프로필알라닐)페닐 포스페이트, 3',5'-비스 포스포라미테이트 (6), 3'-포스포라미테이트-5'-TBDMS 부가물 (7))은 ~3% 구배에서 용리되었다. 원하는 산물은 3% 내지 4% 메탄올에서 용리되었다. 산물 포함 분획물은 2개의 로트 (lot)로 분류되었다. 첫 번째는 소량의 상위 불순물을 포함하고, 그리고 후자는 순수한 산물이었다. 첫 번째 세트의 분획물은 소량의 극성이 덜한 불순물 (상위 불순물), 예를 들면, 3',5'-비스 포스포라미테이트 및 디-알라닐페닐 포스페이트, 그리고 주로 R_b 부분임체이성질체를 포함하고 2차 칼럼 정제를 필요로 하였다 (상대적 용어, 상위 대(對) 하위는 표준-단계 실리카-겔 크로마토그래피에서 용리를 지칭하고, 여기서 "상위 이성질체"는 첫 번째 용리 이성질체를 의미한

다). 두 번째 세트의 분획물은 불순물의 양이 미미하였다 - 단지 남아있는 R_p 및 주로 S_p 부분입체이성질체. 이것은 이후에, 2회-칼럼처리 (columning)된 분획물과 다시 합쳐졌다. 상기 용매는 감압 하에 증발되고, 그리고 결과의 백색 폼은 1시간 동안 더욱 건조되어 (0.20 mmHg) 42 g의 불순한 로트 (^{31}P -NMR에 기초된 4:1 상위 대 하위 이성질체) 및 38 g의 순수한 로트 (1:3 상위 대 하위 이성질체)가 제공되었다. 불순한 로트는 유사한 방식으로 재칼럼처리되어 3.8 g의 97% 순수한 상위 이성질체 (분획물 비축 (fraction set aside) 및 36 g의 순수한 산물이 4:1 비율로 제공되었다. 2가지 주요 로트는 DCM에 용해되고, 합쳐지고, 감압 하에 증발되고, 건조되어 (50°C, 0.2 mmHg, 24 h) 74 g (45.7%)의 순수한 산물 **4** (48: 51의 부분입체이성질성 비율)이 백색 폼으로서 수득되었다, mp 대략 75-85°C.

[0238]

부분입체이성질성 혼합물의 무정형 고체를 생산하기 위하여, 74 g의 백색 폼은 t-부틸 메틸 에테르 (750 ml)와 함께 교반되어 부분 용액 및 점착성 고형 잔류물이 산출되었다. 교반하는 동안, 헵탄 (750 ml)이 천천히 첨가되고, 그리고 현탁액은 대부분의 고무질이 백색 고체로 변환될 때까지, 1시간 동안 기계적으로 교반되었다. 고체는 주걱으로 긁어 내어지고, 그리고 결과의 슬러리는 여과되었다. 고체는 헵탄 (4 X 50 ml)으로 세척되고 진공 하에 건조되어 (50°C, 0.2 mmHg, 24 h) ca 70-80°C의 넓은 용융 범위 (melting range)를 갖는 백색의 무정형 분말 (64 g)이 제공되었다. ^1H 및 ^{31}P NMR은 구조에 적합하고, 그리고 HPLC는 99.8%의 순도 및 46:54의 부분입체 이성질성 비율 (역시 ^{31}P NMR에 의해 확증됨)을 제시하였다.

[0239]

4의 고형 혼합물을 만드는 대안적 방법. 크로마토그래피 이후에, 잔류물은 디클로로메탄 (5 ml/g)과 함께 2회 동시-증발되고 35-40°C에서 35-45 mTorr에서 24시간 동안 건조되었다. 폼 잔류물은 250 마이크론 (micron) 스크린을 통해 걸러지고, 그리고 헤드스페이스 GC에 의한 측정에서 잔여 디클로로메탄이 400 ppm 미만으로 감소할 때까지 동일한 조건 하에 더욱 건조되었다. 결과의 미세한 회백색 내지 백색 무정형 분말은 53.7 내지 63.5°C의 유리 전이 온도 범위를 갖는다.

[0240]

이성질체 (**4**)의 혼합물의 특성화: ^1H -NMR (CDCl_3) δ 10.05 (br s, 1H, NH, S_p), 10.00 (br s, 1H, NH, R_p), 7.49 (d, 1H, C6-H, S_p), 7.36 (m, 5H, C6-H, R_p , 방향족), 7.23-7.14 (m, 6H, R_p/S_p , 방향족), 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, all CH₃, R_p/S_p).

[0241]

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ 3.60 (R_p), -17.80 ppm에서 트리페닐포스페이트에 상대적인 3.20 Sp. ES-MS M+1 530.2. 원소 분석: 계산된% (Karl Fisher 분석에 의한 관찰에서 0.29% 물 포함) C, 49.75; H, 5.54; N, 7.90, F, 3.58, P, 5.84. Found %: C, 49.50; H, 5.44; N, 7.85; F, 3.62; P, 6.05.

[0242]

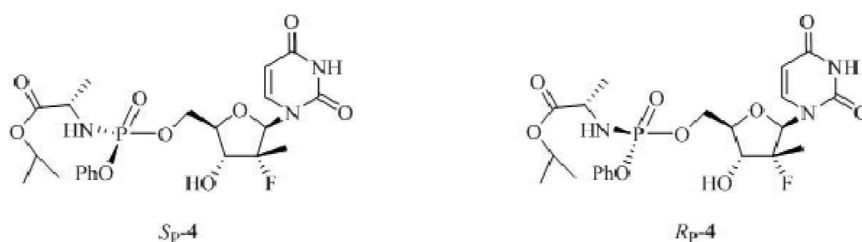
이성질체의 분리에 관한 논의

[0243]

화합물 **4**는 인에서 키랄성 (chirality)으로 인하여, 2개의 부분입체이성질체로 구성되고, 이들은 S_p -**4** 및 R_p -**4**로 명명된다. 이러한 입체화학적 지정 (stereochemical assignment)은 S_p -**4**의 단일 결정 X-선 분석에 기초되었다. R_p -**4** 및 S_p -**4** 둘 모두 결정성 산물을 제공하였다.

[0244]

결정화를 위한 절차는 아래에 요약된다.



[0245]

[0246] **실시예 3.** R_p -4 이성질체의 결정화. 첫 번째 용리되고, 극성이 덜한 R_p -4 이성질체 (3.8 g, 97% 순도)를 포함하는 크로마토그래피된 분획물은 이소프로판올 (36 g)에 용해되고, 그리고 흐려질 때까지 헵탄 (72 g)으로 희석되었다. 생성된 용액은 시딩되고 주변 온도에서 5시간 동안 교반되었다. 결과의 고체는 진공 여과에 의해 수집되고, 헵탄 (2x20 ml)으로 세척되고, 2.3 g의 극히 작은 백색 침상 결정체 (mp 136.2-137.8°C)로 건조되었다 (50 °C, 0.2 mm, 24 h). 결과의 물질의 HPLC 순도는 99.02%인 것으로 밝혀졌다.

[0247] R_p -4: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.10 (br s, 1H, NH), 7.36 (m, 2H, σ -방향족), 7.26-7.16 (m, 4 H, C6-H, m,p -방향족), 6.16 (br d, 1H, C1'-H), 5.58 (d, 1H, C5-H), 5.01 (sept, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 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, all CH₃).

[0248] **실시예 4. S_p -4의 제조 및 결정화**

[0249] 방법 1: 가공되지 않은 4로부터 직접적인 침전: 디클로로메탄 (100 ml) 내의 L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (10.5g, 61.5mmol, 각각 50 ml의 톨루엔으로 2회 공비 건조됨)의 교반된 용액에 실온에서 페닐디클로로포스페이트 (7.5 ml, 50 mmol)가 첨가되었다. 혼합물은 -10°C로 냉각되고, 이후 30분 동안 30 ml의 디클로로메탄 내의 NMI (30.5 ml, 384.3 mmol) 용액이 첨가되었다. 첨가 완료 후 혼합물은 -10 내지 -15°C에서 1시간 동안 교반되었다. 상기 혼합물에 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘 (3) (10g, 38.4mmol)이 한꺼번에 첨가되고, 그리고 혼합물은 -10°C 미만에서 3시간 동안 교반되고, 이후 20°C로 천천히 가온되었다 (6h). 혼합물은 상기 온도에서 하룻밤 (15h) 동안 교반되고, 이후 10 ml의 메탄올로 키텅되었다. 상기 용매는 증발되고, 그리고 잔류물은 EtOAc (200 ml)에서 재-용해되었다. EtOAc 층은 물 (100 ml), 1N HCl (3x75 ml), 2% 수성 NaHCO₃ 용액 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척되었다. 유기 층은 Na₂SO₄에서 건조되고, 여과되고, 농축되었다. 잔류물은 높은 진공 하에 2시간 동안 건조되어 백색 폼 (22 g)이 제공되었다.

[0250] 상기 폼은 33 ml의 DCM에 용해되고, 이후 65 ml의 IPE (이소프로필 에테르)가 첨가되어 포화된 용액이 제공되었다. 생성된 용액은 Celite의 소형 패드를 통해 여과되고, 그리고 여과액은 주변 온도 (대략 22°C - 주의: 현탁액을 0°C로 냉각하면 가공되지 않은 산물이 오일링 아웃 (oiling out)된다)에서 72시간 동안 S_p -4 시드와 함께 교반되었다. 백색 고체는 여과되고, IPE (20 ml)로 세척되고, 건조되어 4.58g의 백색 분말 (^{31}P NMR에 의한 측정에서 각각, S_p -4: R_p -4의 ~85:15 혼합물)이 제공되었다. 상기 고체는 23 ml의 DCM에 현탁되고, 이후 3시간 동안 환류되었다. 혼합물은 실온으로 냉각되고 15시간 동안 교반되었다. 백색 고체는 여과되고, 4.5 ml의 차가운 DCM으로 세척되고, 높은 진공 하에 45°C에서 건조되어 순수한 S_p -4가 제공되었다, mp 93.9-104.7°C, HPLC 순도 99.74% (3.11g, 우리딘 뉴클레오시드로부터 15.2 %).

[0251] 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, σ -방향족), 7.26-7.18 (m, 3H, m,p -방향족), 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, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

[0252] 방법 2: 가공되지 않은 4로부터 오일링 아웃: 디클로로메탄 (200 ml) 내의 L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (20.6g, 123mmol, 각각 75 ml의 톨루엔으로 2회 공비 건조됨)의 교반된 용액에 실온에서 페닐디클로로포스페이트 (14.9 ml, 100mmol)가 첨가되었다. 혼합물은 -10°C로 냉각되고, 이후 30분 동안 60 ml의 디클로로메탄 내의 NMI (61.3 ml, 769mmol) 용액이 첨가되었다. 첨가 완료 후 혼합물은 -10°C 내지 -15°C에서 1시간 동안 교반되었다. 상기 혼합물에 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘 (3) (20g, 76.9mmol)이 한꺼번에 첨가되고, 그리고 혼합물은 -10°C 미만에서 3시간 동안 교반되고, 이후 20°C로 천천히 가온되었다 (6h). 혼합물은 상기 온도에서 하룻밤 (15h) 동안 교반되고, 이후 10 ml의 메탄올로 키텅되었다. 상기 용매는 증발되고, 그리고 잔류물은 EtOAc (400 ml)에 재-용해되었다. EtOAc 층은 물 (200 ml), 1N HCl (3x100 ml), 2% 수성 NaHCO₃ 용액 (100 ml)

및 염수 (50 ml)로 세척되었다. 유기 층은 Na_2SO_4 에서 건조되고, 여과되고, 농축되었다. 잔류물은 높은 진공 하에 2시간 동안 건조되어 백색 폼 (43 g)이 제공되었다. 상기 폼은 기계적 교반기가 구비된 2-구 둥근 바닥 플라스크에서 86 ml의 EtOAc에 용해되었다. 교반 동안, 100 ml의 헵탄이 천천히 첨가되고, 그리고 현탁액은 1시간 동안 교반되었다. 정상 층은 디캔팅되고, 그리고 잔류물은 50 ml의 2:3 EtOAc/헵탄 용액과 함께 10분 동안 다시 교반되고, 이후 디캔팅되었다. 잔류물은 높은 진공 하에 건조되어 백색 폼 (31g)이 제공되었다.

[0253]

상기 폼은 46 ml의 DCM에 용해되고, 이후 95 ml의 IPE가 첨가되어 포화된 용액이 제공되었다. 생성된 용액은 Celite의 소형 패드를 통해 여과되고, 그리고 여과액은 주변 온도에서 72시간 동안 S_p -4 시드와 함께 교반되었다. 백색 고체는 여과되고, IPE (30 ml)로 세척되고, 건조되어 7.33g의 백색 분말 (^{31}P NMR에 의한 측정에서 각각, S_p -4 : R_p -4의 ~85:15 혼합물)이 제공되었다. 상기 고체는 36 ml의 DCM에 현탁되고, 이후 3시간 동안 환류되었다. 혼합물은 실온으로 냉각되고 15시간 동안 교반되었다. 백색 고체는 여과되고, 7.5 ml의 차가운 DCM으로 세척되고, 높은 진공 하에 45°C에서 건조되어 >99% 순수한 S_p -4 (4.78g, 우리딘 뉴클레오시드로부터 11.6 %)가 제공되었다.

[0254]

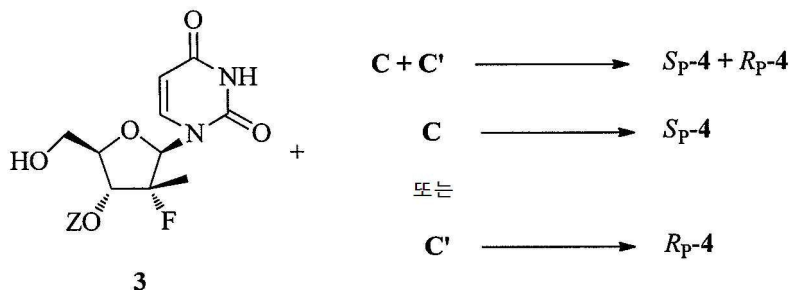
방법 3: 가공되지 않은 4의 실리카 겔 로딩: 5.0 g의 가공되지 않은 4는 대략 2.5 g의 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘 (3)으로 시작되는 칼럼 크로마토그래피 단계 직전에, 부분임체이성질체의 혼합물로서 동일한 방식으로 생산되었다. 가공되지 않은 물질은 10 ml의 DCM에 용해되고, 그리고 10 g의 실리카 겔이 상기 용액에 첨가되었다. 상기 용매는 증발되어 건식 슬러리가 제공되었다. 슬러리는 40 ml의 50% EtOAc/헵산과 함께 15분 동안 교반되고, 이후 여과되었다. 실리카 겔은 추가의 10 ml의 50% EtOAc/헵산으로 세척되었다. 실리카 겔은 이후, 15% MeOH/DCM (100 ml)으로 세척되고 개별적으로 수집되었다. 상기 용매는 증발되고 높은 진공 하에 건조되어 4.0 g의 잔류물 (폼)이 제공되었다. 잔류물은 DCM (6 ml)에 용해되고, 이후 ~9 ml의 IPE가 첨가되어 포화된 용액이 만들어졌다. 혼합물은 이후, 주변 온도에서 S_p -4 시드와 함께 하룻밤동안 부드럽게 교반되었다. 백색 고체는 여과되고 IPE (5 ml)로 세척되어 1.28 g의 산물이 제공되었다. ^{31}P NMR은 상기 산물이 각각, S_p -4 : R_p -4의 77:23 혼합물을 포함한다는 것을 제시하였다. 이것은 20 ml의 DCM으로부터 재결정화되어 0.75 g의 >99% 순수한 S_p -4 (우리딘 뉴클레오시드로부터 대략 12%)가 획득되었다. S_p -4의 이러한 제조물은 혼합물의 경우에 수행되는 실험화를 필요로 하지 않고, 따라서 전체 반응 절차가 상기에 제시된다. S_p -4의 단일 결정성 및 다형성 형태의 측면은 하기에 제공된다.

[0255]

방법 4: 4의 40.0 g의 1:1 혼합물은 90 ml의 디클로로메탄에 용해되었다. 디이소프로필에테르 (70 ml)가 상기 용액에 첨가되어 포화된 용액이 제공되었다 (디이소프로필 에테르의 양은 산물의 순도에 기초하여 변할 수 있다). 상기 용액은 순수한 S_p -4 (> 99%)가 시딩되고, 그리고 혼합물은 실온에서 20시간 동안 교반 막대와 함께 부드럽게 교반되었다 (2시간후 고체의 형성이 관찰되었다). 상기 고체는 여과되고, 40 ml의 디이소프로필에테르/디클로로메탄 (1:1) 혼합물로 세척되고, 건조되어 백색 고체 (16.6 g, NMR에 의해 89.35% 순수한 S_p -4)가 제공되었다. 상기 고체는 83 ml 디클로로메탄에 현탁되고 3시간 동안 환류되었다. 현탁액은 실온으로 냉각되고 하룻밤동안 교반되었다. 고체는 여과되고 10 ml의 차가운 DCM으로 세척되었다. 고체는 진공 하에 건조되어 S_p -4 (13.1 g, HPLC에 의해 99.48% 순수)가 제공되었다. 11g의 상기 고체는 뜨거운 조건 하에 330 ml의 DCM에 재용해되었다. 생성된 용액은 실온으로 냉각되고 상기 온도에서 하룻밤동안 방치되었다. 결정성 산물은 여과되고 건조되어 10.5 g의 S_p -4 (HPLC에 의한 99.74 %)가 제공되었다.

[0256]

화합물 S_p -4 및 R_p -4는 하기 반응식에서 제시된 바와 같이, 9번째 또는 10번째 구체예에 따라서 뉴클레오시드 (보호된 또는 보호되지 않은) 3을 이소프로필-알라닐-포스포라미데이트 (C 및 C'의 혼합물, C 또는 C')와 반응 시킴으로써 교대로 제조될 수도 있다.



[0257]

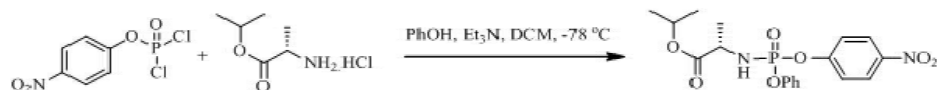
[0258]

P.D. Howes et al. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2003, Vol. 22, Nos. 5-8, pp. 687-689 ("Howes")에서는 t-부틸마그네슘 염화물로 반응에 의해 획득된 2'- 및 5'-포스포라미데이트를 개시한다. 여기에서, Howes는 3'-데옥시-시티딘 뉴클레오시드가 1.2 당량의 t-부틸마그네슘 염화물의 존재에서 (S)-2-[클로로-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 메틸 에스테르와 반응될 때, 2'-위치에서 선별적 포스포릴화가 발생하지만, 추가 당량의 t-부틸마그네슘 염화물로 5'-위치에서 선별적 포스포릴화가 발생한다는 것을 개시한다. 이러한 발효는 반응식 1에서 개시되는 것과 상반된다.

[0259]

[0260]

실시예 5-1. (S)-2-[(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르의 제조



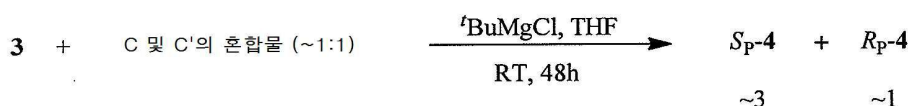
[0261]

[0262]

디클로로메탄 (100 ml) 내의 4-니트로페닐 포스포로디클로리데이트 (12.8g, 50 mmol)의 교반된 용액에 디클로로메탄 (100 ml) 내의 페놀 및 트리에틸아민 (7.7 ml, 55 mmol) 용액이 -78℃에서 20분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 상기 온도에서 30분 동안 교반되고, 이후 0℃에서, 디클로로메탄 (100 ml) 내의 L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (8.38g, 50mmol)을 포함하는 다른 등근 바닥 플라스크에 이전되었다. 혼합물에 두 번째 분량 (portion)의 트리에틸아민 (14.6 ml, 105 mmol)이 15분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 0℃에서 1시간 동안 교반되고, 이후 상기 용매는 증발되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트 (150 ml)로 분쇄되고, 그리고 백색 고체는 여과되었다. 여과액은 감압 하에 농축되어 연한 황색 오일이 제공되었다. 가공되지 않은 화합물은 0-20% 에틸 아세테이트/헥산 구배를 이용하여 크로마토그래피되어 산물 (17g, 83% 수율)이 대략 1:1 비율에서 부분입체이성질체의 혼합물로서 제공되었다. 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)+.

[0263]

실시예 5-2. Sp-4/Rp-4의 제조.



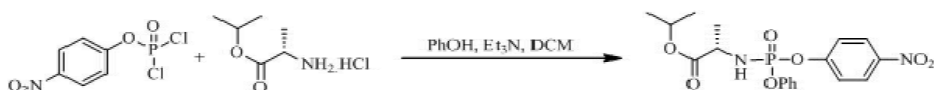
[0264]

[0265]

건성 THF (1.5 ml) 내의 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2,4-디온 (130mg, 0.5mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (1.05 ml, 1.05 mmol, 2.1 당량)의 1.0M 용액이 실온에서 5분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (1.5 ml) 내의 (S)-2-[(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (이성질체의 1:1 혼합물, 408 mg, 1 mmol)

용액이 5분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 48시간 동안 교반되고, 이후 포화된 수성 NH_4Cl (20 ml)로 켄칭되었다. 혼합물은 에틸 아세테이트 (50 ml) 및 물 (20 ml) 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 추출물은 무수성 황산나트륨에서 건조되고, 여과되고, 감압 하에 농축되어 연한 황색 잔류물이 제공되었다. 0-2% MeOH/디클로로메탄 구배를 이용한 잔류물의 칼럼 크로마토그래피는 백색의 폼 같은 고체 (125 mg, 47% 수율, 대략 3.05:1.0 비율로 S_p -4/ R_p -4의 혼합물)가 제공되었다.

실시예 6. (S)-2-[(S)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르의 제조 및 비-크로마토그래피 분리



L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (330 g, 1.97 mol)은 감압 하에 톨루엔 (2 x 400 ml)과 함께 동시-증발로 미리 건조되고, 이후 진공 오븐에서 건조되었다 (50°C, 0.2 mmHg, 17 h). 무수성 디클로로메탄 (3.0 l) 내의 4-니트로페닐 포스포로디클로리데이트 (500.0 g, 1.953 mol)의 교반된 용액에 디클로로메탄 (900 ml) 내의 페놀 (183.8 g, 1.953 mol) 및 트리에틸아민 (300 ml, 2.15 mol) 용액이 -60°C 내부 온도에서 3시간에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 상기 온도에서 추가의 30분 동안 교반되고, 이후 2.5시간 동안 -5°C로 가온되었다. 미리 건조된 아미노산 에스테르가 질소 공기 하에 -5~0°C에서 10분에 걸쳐 첨가되었다. 첨가 플라스크에서 아미노에스테르 염의 잔류물은 디클로로메탄 (2 x 100 ml)으로 행굼에 의해 반응 혼합물로 이전되었다. 혼합물은 0°C에서 40분 동안 교반되고 두 번째 분량의 트리에틸아민 (571 ml, 4.10 mol)이 0°C에서 40분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 0~10°C에서 3시간 동안 교반되고, 이후 백색 고체 (트리에틸아민 염산염)는 여과되고 디클로로메탄 (3 x 300 ml)으로 행굼되었다. 여과액은 감압 하에 농축되고, 그리고 잔류물은 메틸 t-부틸 에테르 (MTBE, 4 l)로 분쇄되었다. 이렇게 형성된 추가의 고체 염은 여과되고 MTBE (3 x 150 ml)로 행굼되었다. 여과액은 감압 하에 농축되어 투명하고 밝은 갈색 오일이 제공되었다. 잔류물은 헥산 (2 x 140 ml)과 함께 동시-증발되어 임의의 잔여 MTBE가 제거되고, 그리고 진공 하에 40°C에서 2시간 동안 더욱 건조되었다. 건성 잔류물은 디이소프로필 에테르 (IPE, 1.1 l)와 혼합되고 5°C에서 얼음-수조에서 교반되었다. 산물의 원하는 S_p -이성질체의 소량의 결정 시드가 상기 용액에 첨가되고, 그리고 혼합물은 5°C에서 22시간 동안 교반되어 중간 두께 슬러리가 형성되었다. 이것은 냉동 장치 (-10°C)에서 44시간 동안 방치되었다. 침전된 산물은 여과에 의해 수집되고 IPE 및 헥산 (1:1, 3 x 190 ml)의 미리 냉각된 혼합 용매로 행굼되었다. 고체는 백색 분말 고체로서 227.23 g (수율: 28.5%)을 제공하는 일정한 중량이 획득될 때까지 주변 온도에서 진공 하에 건조되었다 (0.5 mm Hg). 2개의 부분입체이성질체 S_p : R_p 의 비율은 ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ -0.31 (S_p), -0.47)에 기초하여 9.65/1이었다. 산물은 60°C 조 (bath)에서 가열하면서 IPE (840 ml)에 용해시킴으로써 재결정화되었다. 상기 용액은 실온에서 1시간 동안 교반되고, 이후 소량의 결정 S_p 이성질체 시드가 첨가되었다. 백색 분말 고체가 2시간 이내에 형성되고, 그리고 플라스크는 냉동 장치 (-10°C)에서 16시간 동안 보관되었다. 획득된 백색의 미세한 결정성 고체는 여과되고, 미리 냉각된 IPE (3x 50 ml)로 세척되고, 진공 하에 일정한 중량으로 건조되어 (주변, 0.5 mm Hg) ^{31}P -NMR에 기초하여 48/1의 부분입체이성질성 비율을 갖는 백색의 솜털 같은 (fluffy) 고체 (177.7 g, S_p 이성질체의 이론적 수율에 기초하여 22% 전체 수율 또는 44% 전체 수율)가 제공되었다. Mp 62-66°C.

^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -0.31; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.30-8.27 (m, 2H), (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);

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -2.05; (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -0.31; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 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, $\text{DMSO}-d_6$): 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)

[0271]

MS (ESI) m/z (M-1)⁺.

[0272]

8 (S_R-이성질체)의 입체화학은 하기에 상세하게 제시된 바와 같이, 단일 결정 X-선 결정학에 의해 확인되었다,

[0273]

실시예 7. SFC에 의한 부분입체이성질성 혼합물 (S)-2-[(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르의 분리

[0274]

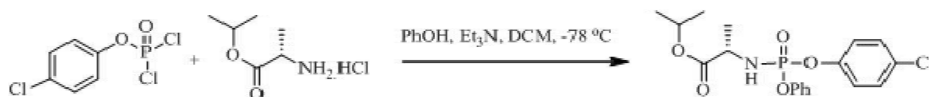
R_P-이성질체가 풍부한 부분입체이성질체 (4.8 g)의 혼합물의 샘플은 ChiralPak AD-H (2x15 cm) 칼럼을 이용한 SFC를 수행하고, 그리고 100 bar에서 이산화탄소에서 35% 이소프로판올로 용리되었다. 17 mg/ml의 메탄올의 농도에서 4 ml의 샘플의 주입 로딩 (injection loading)이 이용되었다. R_P-이성질체 [(S)-2-[(R)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르]가 먼저 용리되었다. 복수 실행의 적절한 분획물은 합쳐지고 감압 하에 농축되어 2.9 g의 R_P-이성질체 [(S)-2-[(R)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르]가 밝은 황색 점성 오일로서, 그리고 1.9 g의 S_R-이성질체 [(S)-2-[(S)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르]가 백색 고체로서 제공되었다. R_P-이성질체의 분석 데이터는 상기 결정화 방법에 의해 분리된 산물에서와 유사하다.

[0275]

(S)-2-[(R)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (8, R_P-이성질체)에 대한 분석 데이터: ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0.47; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.46-7.38 (m, 4H), 7.27-7.20 (m, 3H), 6.68 (dd, J=13.8, 10.2Hz, 1H), 4.86-4.77 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.20 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.10(dd, J=6.2, 2.2Hz, 6H); MS (ESI) m/z 407 (M-1)⁺.

[0276]

실시예 8-1. 라세미 2-[(4-클로로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (±)의 제조:



[0277]

[0278]

디클로로메탄 (20 ml) 내의 4-클로로-페닐 포스포로디클로리데이트 (2.45g, 10.0 mmol)의 교반된 용액에 디클로로메탄 (20 ml) 내의 페놀 (0.94 g, 10 mmol) 및 트리에틸아민 (1.56 ml, 11 mmol) 용액이 -78°C에서 20분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 상기 온도에서 30분 동안 교반되고, 이후 0°C에서, 디클로로메탄 (50 ml) 내의 L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (1.67 g, 10 mmol)을 포함하는 다른 둥근 바닥 플라스크로 이전되었다. 혼합물에 두 번째 로트의 트리에틸아민 (2.92 ml, 21 mmol)이 15분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 0°C에서 1시간 동안 교반되고, 이후 상기 용매는 증발되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트 (30 ml)로 분쇄되고, 그리고 백색 고체는 여과되었다. 여과액은 감압 하에 농축되어 연한 황색 오일이 제공되었다. 가공되지 않은 화합물은 10-20% 에틸 아세테이트/헥산 구배를 이용하여 크로마토그래피되어 대략 1:1 비율에서 부분입체이성질체의 혼합물로서 산물 (2.0 g, 50% 수율)이 제공되었다. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -1.58, -1.62; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.06-7.51 (m, 8H), 7.15-7.28 (m, 2H), 7.29-7.47(m, 2H), 4.0-4.10(m, 1H), 3.82-3.88 (m, 3H), 1.35-1.36 (dd, 6H); 1.19-1.22 (m, 3H). MS (ESI) m/z 398 (M-1)⁺. 결과의 산물은 앞서 언급된 바와 같이, 추출, 결정화, 또는 크로마토그래피에 의해 정제된다.

[0279]

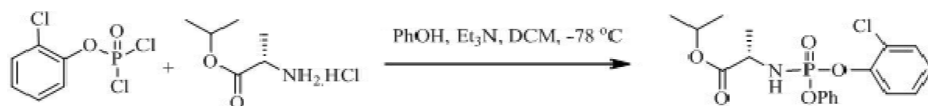
실시예 8-2. (S)-이소프로필 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-플루오로-3-히드록시-4-메틸테트라히드로푸란-2 일)메톡시(페녹시)-포스포릴아미노)프로파노에이트 (4)의 제조.

[0280]

건성 THF (50 ml) 내의 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-

일)-1H-피리미딘-2,4-디온 (3, 2.6 g, 10 mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (12.4 ml, 21 mmol, 2.1 당량)의 1.7 M 용액이 실온에서 15분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (15 ml) 내의 라세미 2-[(4-클로로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (4.08g, 10mmol) 용액이 10분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 72시간 동안 교반되었다. 켄칭 산물과의 TLC 공동-스팟 (co-spot)은 출발 뉴클레오시드와 비교하여 대략 5%의 원하는 산물이 형성된다는 것을 제시하였다.

실시예 9-1. 라세미 2-[(2-클로로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (±)의 제조.

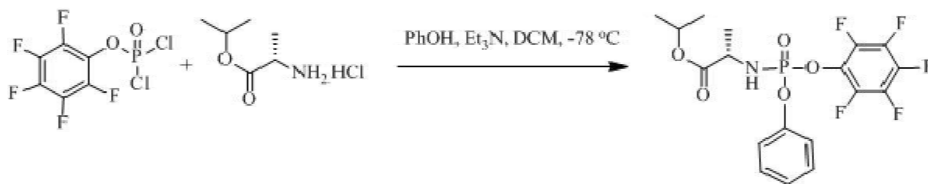


디클로로메탄 (80 ml) 내의 2-클로로-페닐 포스포로디클로리데이트 (9.8 g, 40 mmol)의 교반된 용액에 디클로로메탄 (80 ml) 내의 페놀 (3.76 g, 40 mmol) 및 트리에틸아민 (6.16 ml, 44 mmol) 용액이 -78℃에서 20분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 상기 온도에서 30분 동안 교반되고, 이후 0℃에서, 디클로로메탄 (150 ml) 내의 L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (6.7 g, 40 mmol)을 포함하는 다른 둥근 바닥 플라스크에 이전되었다. 혼합물에 15분 동안 두 번째 분량의 트리에틸아민 (11.6 ml, 84 mmol)이 첨가되었다. 혼합물은 0℃에서 1시간 동안 교반되고, 이후 상기 용매가 증발되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트 (100 ml)로 분쇄되고, 그리고 백색 고체는 여과되었다. 여과액은 감압 하에 농축되어 연한 황색 오일이 제공되었다. 가공되지 않은 화합물은 10-20% 에틸 아세테이트/헥산 구배를 이용하여 크로마토그래피되어 대략 1:1 비율에서 부분입체이성질체의 혼합물로서 산물 (11.3g, 72% 수율)이 제공되었다. ^{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 ($\text{M}-1$) $^+$. 결과의 산물은 앞서 언급된 바와 같이, 추출, 결정화, 또는 크로마토그래피에 의해 정제된다.

실시예 9-2. (S)-이소프로필 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-플루오로-3-히드록시-4-메틸테트라히드로푸란-2 일)메톡시)-(페녹시)-포스포릴아미노)프로파노에이트의 제조.

건성 THF (50 ml) 내의 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2,4-디온 (3, 2.6 g, 10 mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (12.4 ml, 21 mmol, 2.1 당량)의 1.7 M 용액이 실온에서 15분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (15 ml) 내의 (2-[(2-클로로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (라세미 4.08 g, 10 mmol) 용액이 10분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 72시간 동안 교반되었다. 켄칭 산물과의 TLC 공동-스팟은 출발 뉴클레오시드와 비교하여 대략 5-10%의 원하는 산물이 형성된다는 것을 제시하였다.

실시예 10-1. 라세미 2-[(2,3,4,5,6-펜타플루오로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (±)의 제조.



디클로로메탄 (40 ml) 내의 펜타플루오로페닐 포스포로디클로리데이트 (6.0 g, 20 mmol)의 교반된 용액에 디클로로메탄 (40 ml) 내의 페놀 및 트리에틸아민 (3.08 ml, 22 mmol) 용액이 -78℃에서 20분에 걸쳐 첨가되었다.

혼합물은 상기 온도에서 30분 동안 교반되고, 이후 0℃에서, 디클로로메탄 (100 ml) 내의 L-알라닌 이소프로필 에스테르 염산염 (3.35 g, 20 mmol)을 포함하는 다른 둥근 바닥 플라스크로 이전되었다. 혼합물에 두 번째 로트의 트리에틸아민 (5.84 ml, 42 mmol)이 15분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 0℃에서 1시간 동안 교반되고, 이후 상기 용매가 증발되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트 (60 ml)로 분쇄되고, 그리고 백색 고체는 여과되었다. 여과액은 감압 하에 농축되어 대략 1:1 비율에서 부분입체이성질체의 혼합물로서 연한 황색 오일이 제공되었다. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -0.49, -0.58. 결과의 산물은 앞서 언급된 바와 같이, 추출, 결정화, 또는 크로마토그래피에 의해 정제된다.

[0289]

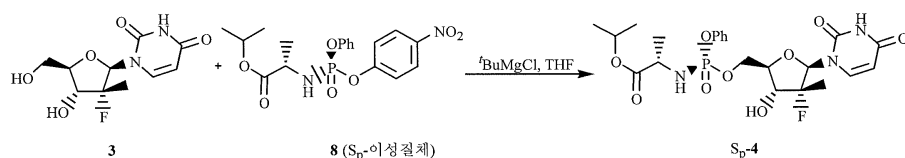
실시예 10-2. (S)-이소프로필 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-플루오로-3-히드록시-4-메틸테트라히드로푸란-2 일)메톡시)-(페녹시)-포스포릴아미노)프로피온산 이소프로필 에스테르의 제조.

[0290]

건성 THF (50 ml) 내의 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2,4-디온 (3, 2.6g, 10mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (12.4mL, 21mmol, 2.1 당량)의 1.7M 용액이 실온에서 15분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (15 ml) 내의 가공되지 않은 라세미 (2-[(2,3,4,5,6-펜타플루오로 페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (4.08g, 10mmol) 용액이 10분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 72시간 동안 교반되었다. 켄칭 산물과의 TLC 공동-스팟은 출발 뉴클레오시드와 비교하여 대략 40-50%의 원하는 산물이 형성된다는 것을 제시하였다.

[0291]

C 또는 C'의 제조 및 정제는 하기 실시예에서 예증되는 바와 같이, S_p-4 또는 R_p-4에 대한 직접적인 접근을 제공한다.



[0292]

[0293]

실시예 11. S_p-4 (32 mg-규모)의 제조: 건성 THF (1 ml) 내의 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2,4-디온 3 (32 mg, 0.12 mmol)의 교반된 용액에 t-부틸마그네슘 염화물 (0.26 ml, 0.26 mmol, 2.1 당량)의 1M 용액이 실온에서 3분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (0.5 ml) 내의 (S)-2-[(S)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (8, S_p-이성질체) 용액이 3분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 42시간 동안 교반되고, 이후 포화된 수성 NH₄Cl (10 ml)로 켄칭되었다. 혼합물은 에틸 아세테이트 및 물 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 추출물은 무수성 황산나트륨에서 건조되고 농축되었다. 잔류물은 0-4% 메탄올/디클로로메탄 구배를 이용하여 크로마토그래피되어 폼 같은 고체로서 S_p-4 (29mg, 44.5% 수율)가 제공되었다. ¹H 및 ³¹P NMR은 본 명세서에서 개시된 것과 일치한다.

[0294]

실시예 12. S_p-4 (2.6 g-규모, 크로마토그래피 없음)의 제조: 건성 THF (50 ml) 내의 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2,4-디온 (2.6 g, 10 mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (12.4 ml, 21 mmol, 2.1 당량)의 1.7 M 용액이 실온에서 15분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (15 ml) 내의 (S)-2-[(S)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (8, S_p-이성질체, 4.08g, 10mmol) 용액이 10분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 60시간 동안 교반되고, 이후 포화된 수성 NH₄Cl (20 ml)로 켄칭되었다. 혼합물은 에틸 아세테이트 (150 ml) 및 순차적으로, 10% 수성 Na₂CO₃ (3 x 20 ml) 및 물 (20 ml) 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 추출물은 무수성 황산나트륨에서 건조되고, 여과되고, 감압 하에 농축되어 연한 황색 잔류물 (3.8 g)이 제공되었다. 잔류물은 디클

로로메탄 (7.6 ml)에 용해되고, 이후 실온에서 20시간 동안 교반되었다. 백색 고체는 여과되고, 1:1 IPE/디클로로메탄 (5 ml)으로 세척되고 진공 하에 건조되어 백색 고체로서 순수한 산물 (1.85 g, 35% 수율)이 제공되었다.

[0295]

실시예 13. NaHMDS를 이용한 S_h-4의 제조:

[0296]

건성 THF (2.0 ml) 내의 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2,4-디온 (71 mg, 0.27 mmol)의 교반된 용액에 THF (270 μ l, 0.54 mmol)에서 나트륨 비스(트리메틸실릴)아미드 (NaHMDS)의 2.0 M 용액이 -78°C에서 2분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (1 ml) 내의 (S)-2-[(S)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노]-프로피온산 이소프로필 에스테르 (8, S_h-이성질체, 111 mg, 0.27 mmol) 용액이 혼합물에 첨가되었다. 반응 혼합물은 상기 온도에서 2시간 동안 교반되고, 이후 -20°C로 가온되며, 상기 온도에서 이것은 추가로 20시간 동안 교반되었다. TLC는 ~30%의 반응되지 않은 뉴클레오시드 출발 물질을 지시하였다. 따라서 THF (0.5 ml)에서 추가의 0.5 당량의 시약 (55 mg, 0.14 mmol)이 반응 혼합물에 첨가되고 추가로 6시간 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 포화된 수성 염화암모늄 용액으로 켄칭되고, 이후 에틸 아세테이트 및 물 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 추출물은 무수성 황산나트륨에서 건조되고 농축되어 밝은 갈색 잔류물이 제공되었다. 0-5% 메탄올/디클로로메탄 구배를 이용한 가공되지 않은 산물의 칼럼 크로마토그래피는 S_h-4 (22 mg, 15% 수율), 3'-포스포라미데이트 (5, S_h-이성질체, 11.5 mg, 16% 수율) 및 비스 포스포라미데이트 (6, S_h, S_h-이성질체, 12.6mg)를 제공하였다.

[0297]

실시예 14. R_h-4 (260 mg-규모)의 제조:

[0298]

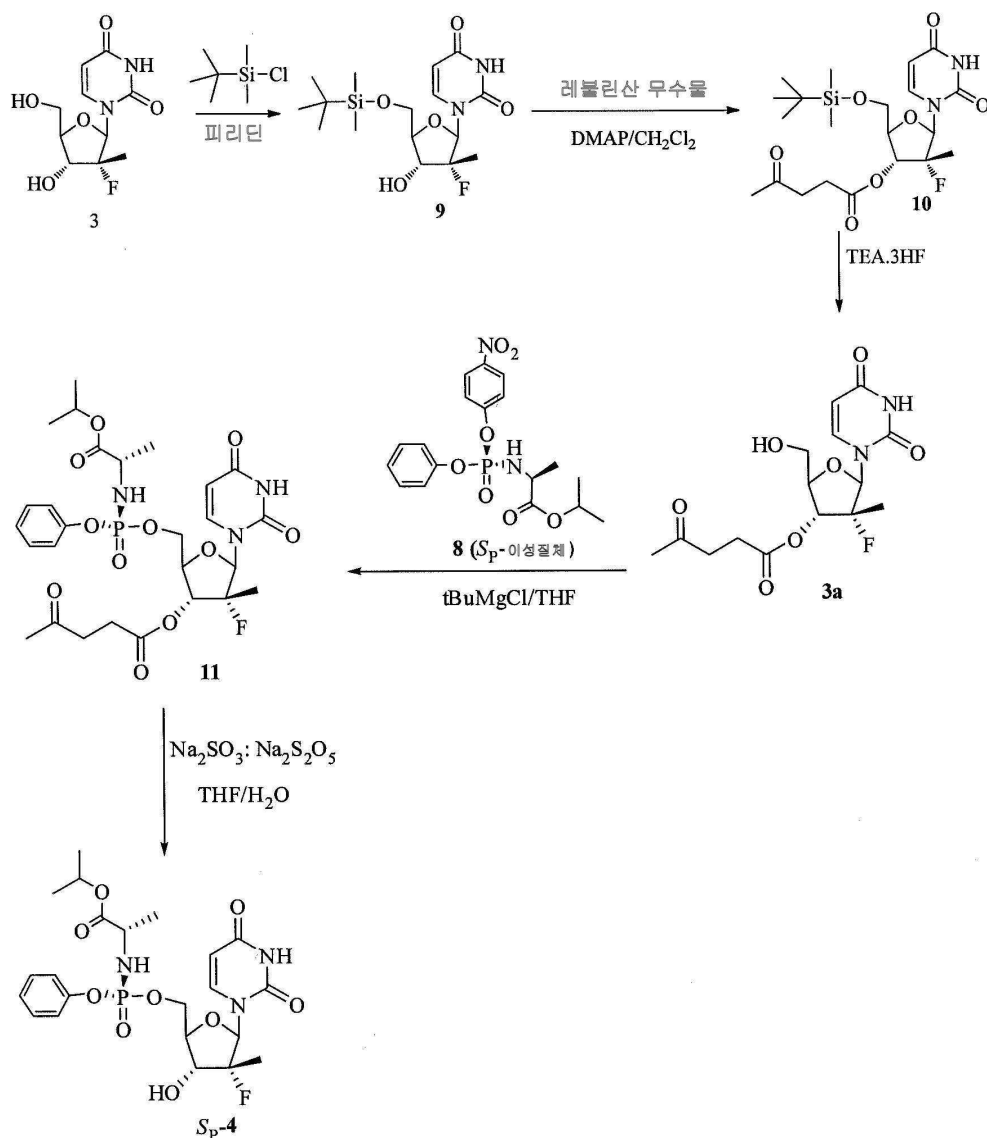
건성	THF	(6	ml)	내의
----	-----	----	-----	----

1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2,4-디온 (260 mg, 1 mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (1.23 ml, 2.1 mmol, 2.1 당량)의 1.7 M 용액이 실온에서 5분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (3 ml) 내의 (S)-2-[(R)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (8, R_h-이성질체) 용액이 3분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 96시간 동안 교반되고, 이후 포화된 수성 NH₄Cl (10 ml)로 켄칭되었다. 혼합물은 에틸 아세테이트 (50 ml) 및 물 (2 x 20 ml) 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 추출물은 무수성 황산나트륨에서 건조되고, 여과되고, 감압 하에 농축되어 연한 황색 잔류물 (490 mg)이 제공되었다. 잔류물은 0-5% 메탄올/디클로로메탄 구배를 이용하여 크로마토그래피되어 백색 고체로서 산물 (160 mg, 30% 수율)이 제공되었다.

[0299]

S_h-4 또는 R_h-4의 제조는 또한, 하기 실시예에서 예증된 바와 같이, 3'-보호된 3을 적절한 시약 C 또는 C', 또는 C 및 C'를 포함하는 혼합물과 반응시킴으로써 달성될 수 있다.

[0300] 실시예 15. 합성 중간물질로서 3a를 이용한 Sp-4의 제조



[0301]

[0302] 실시예 15-1. 5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시-2'-플루오로-2'-*C*-메틸우리딘 (**9**)의 합성:

[0303]

건성 피리딘 (750 ml) 내의 2'-데옥시-2'-플루오로-2'-*C*-메틸우리딘 (**3**, 81.1 g, 312 mmol)의 교반된 용액에 건성 피리딘 (500 ml) 내의 TBDMS-Cl (103.19 g, 685.6 mmol) 용액이 주변 온도에서 45분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 반응물은 주변 온도에서 24시간 동안 교반되었다. 메탄올 (85 ml)이 반응 혼합물에 첨가되고, 그리고 혼합물은 10분 동안 교반되고, 이후 이들 용매가 감압 하에 증류되었다. 뜨거운 물 (45℃) (1 ℓ)이 반응물에 첨가되고, 그리고 혼합물은 에틸 아세테이트 (2 x 500 ml)로 추출되고, 물 (1 x 500 ml)로 세척되었다. 유기 층은 무수성 황산나트륨에서 건조되었다. 에틸 아세테이트는 증류되고, 그리고 획득된 잔류물은 톨루엔 (2 x 500 ml)과 함께 동시-증발되어 가공되지 않은 **9**가 백색 폼으로서 제공되었다. 수율 = 116.9 g (정량적). 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).

[0304] 실시예 15-2. 5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-3'-O-레부리닐-2'-데옥시-2'-플루오로 2'-C-메틸-우리딘 (10)의 합성:

[0305] DCM (1 ℓ) 내의 뉴클레오시드 9 (116.9 g, 312.1 mmol)의 교반된 용액에 DMAP (30.5 g, 249.7 mmol)가 첨가되고, 그리고 이것은 RT에서 20분 동안 교반되었다. DCM (200 ml) 내의 레불린산 무수물 (133.6 g, 642.3 mmol) 용액이 혼합물에 첨가되고 24시간 동안 교반되었다. 혼합물의 TLC는 반응의 완결을 지시하였다. 차가운 물 (500 ml)이 첨가되고, 그리고 혼합물은 20분 동안 교반되었다. 층은 분리되고, 그리고 유기 층은 포화 중탄산나트륨 용액 (2 x 250 ml)으로 세척되고, 무수성 황산나트륨에서 건조되고, 이후 상기 용매는 감압 하에 증류되어 황색 오일이 제공되었다. 가공되지 않은 수율: 197.6 g (135 %). 상기 물질은 다음 단계에 그대로 이용되었다. 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).

[0306] 실시예 15-3. 3'-O-레부리닐-2'-데옥시-2'-플루오로 2'-C-메틸-우리딘 (3a)의 합성:

[0307] 가공되지 않은 10 (197.6 g, ~312.1 mmol)은 DCM (1 ℓ)에 용해되고, 여기에 TEA.3HF (50.3 g, 312.1 mmol)가 첨가되고 주변 온도에서 하룻밤동안 교반되었다. 혼합물의 TLC는 반응의 대략 50% 완결을 지시하였다. 다른 다량의 TEA.3HF (50.3 g, 312.1 mmol)가 첨가되고, 그리고 반응 혼합물은 6시간 동안 교반되었다. 이 시점에서, TLC는 대략 10%의 반응되지 않은 출발 물질을 지시하였다. 다른 0.25 eq의 TEA.3HF (12.5 g, 78.0 mmol)가 첨가되고, 그리고 반응 혼합물은 하룻밤동안 교반되었다. 반응 혼합물은 농축 건조되어 황색 오일이 제공되었다. 모든 배치 (batch)로부터 가공되지 않은 물질은 실리카 겔 (DCM 내의 0-2% MeOH)에서 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 백색 폼 고체로서 124.1 g의 3'-레불리네이트 (2'-데옥시-2'-플루오로-2'-C-메틸우리딘으로부터 3 단계에 걸쳐 90% 정제된 수율)가 제공되었다. 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).

[0308] 실시예 15-4. (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로-2H-피리미딘-1-일)-4-(R)-플루오로-3-(4-옥소펜타노일)-4-메틸-테트라히드로-푸란-2-일메톡시]-페녹시-포스포릴아미노)-프로피온산 (S)-이소프로필 에스테르 (11)의 입체선택적 합성:

[0309] 0°C로 냉각된 5 ml 무수성 THF 내의 뉴클레오시드 (3a, 1.00 mmol, 358 mg) 용액에 tBuMgCl (THF에서 1.7 M, 2 eq)이 첨가되고 주변 온도로 가온되고 30분 동안 교반되었다. 생성된 혼합물에 시약 (ca. 97% 키랄 순도) (S)-2-[(S)-(4-니트로-페녹시)-페녹시-포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (8, S_p-이성질체) (408 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq.)가 한꺼번에 첨가되고 RT에서 교반되었다. 16시간후, ~30% 출발 물질이 남겨졌다. 반응 혼합물은 포화된 NH₄Cl 용액 10 ml로 채워지고, 그리고 수성 상은 에틸 아세테이트 (3 x 25 ml)로 추출되었다. 합쳐진 유기 층은 염수로 세척되고, 무수성 황산나트륨에서 건조되고, 증발 건조되어 연한 황색 폼 (500 mg)이 제공되었다. 이것은 염화메틸렌 내의 2-5% 메탄올을 이용한 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 백색 폼으로서 대략 97% P 키랄 순도의 산물 (275 mg) 및 반응되지 않은 출발 물질 (162 mg)이 제공되었다. 소모된 출발 물질에 기초하여, 수율은 76%이었다. ³¹P(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).

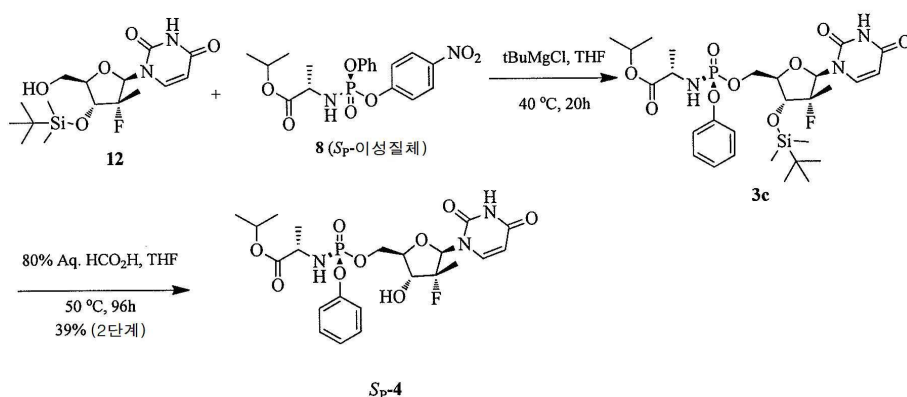
[0310] 실시예 15-5. (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로-2H-피리미딘-1-일)-4-(R)-플루오로-3-히드록시-4-메틸-테트라히드로-푸란-2-일메톡시]-페녹시-포스포릴아미노)-프로피온산 (S)-이소프로필 에스테르 (S-4)의 합성

[0311] 아황산나트륨의 용액은 물 (25 ml)에 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1.51 g) 및 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0.57 g)를 첨가함으로써 제조되었다. 무수성 THF (2.5 ml) 내의 레불리네이트 (11, 250 mg, 0.40 mmol) 용액에 1.0 ml의 아황산나트륨 용액이 첨가되었다. 이것은 실온에서 4시간 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 물 (15 ml)에 부어지고, 에틸 아세테이트 (3x25 ml)로 추출되고, 건조되고, 증발되어 보호되지 않은 뉴클레오시드로부터 직접적으로 생산된 Sp-4 의 물리 특성 및 스펙트럼 특성에 정합하는 대략 97% P 키랄 순도를 갖는 백색 고형 산물이 정량적으로 제공되었다.

[0312] **실시예 16. 3a로부터 Sp-4 를 제조하기 위한 대안적 절차.**

[0313] 건성 THF (1.5 ml) 내의 4-옥소-펜탄산 (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로-2H-피리미딘-1-일)-4-플루오로-2-히드록시메틸-4-메틸-테트라히드로-푸란-3-일 에스테르 (3a, 210 mg, 0.59 mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (1.07 ml, 1.82 mmol)의 1.7 M 용액이 실온에서 2분에 걸쳐 첨가되었다. 처음에, 백색 침전물이 관찰되고, 그리고 10분 후, 반응 혼합물은 짙은 황색 용액으로 변화했다. 30분 후, THF (1.5 ml) 내의 (S)-2-[(S)-(4-니트로페녹시)-페녹시-포스포릴아미노]-프로피온산 이소프로필 에스테르 (8 (Sp-이성질체), 382mg, 0.94mmol) 용액이 3분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 40°C에서 5시간 동안 가열되고, 이 시점에서 TLC 및 ^1H NMR은 2% 이하의 반응되지 않은 출발 물질을 지시하였다. 반응물은 포화된 수성 염화암모늄으로 키텅되고, 이후 에틸 아세테이트 및 물 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 층은 10% 수성 Na_2CO_3 용액 (3 x 10 ml), 그 이후에 물로 세척되었다. 유기 층은 무수성 황산나트륨에서 건조되고 농축되어 갈색 잔류물 (410 mg)이 제공되었다. 가공되지 않은 산물은 테트라히드로푸란 (1.0 ml)에 용해되고, 이후 1 ml의 물에서 아황산나트륨 (37 mg, 0.295 mmol) 및 메타아황산나트륨 (sodium metabisulfite, 224 mg, 1.18 mmol)의 혼합물의 수성 용액이 첨가되었다. 혼합물은 45°C에서 20시간 동안 가열되고, 이 단계에서 TLC에 의해 대략 10% 변환만 관찰되고, 따라서 추가의 아황산나트륨 (74 mg) 및 메타아황산나트륨 (448 mg)이 첨가되고, 그리고 추가로 52시간 동안 가열이 지속되었다. 이 시점에서, TLC에 의해 대략 40% 변환만 관찰되었다. 반응 혼합물은 물 및 에틸 아세테이트 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 층은 무수성 황산나트륨에서 건조되고 농축되어 갈색 잔류물 (210 mg)이 제공되었다. 0-5% MeOH/DCM 구배를 이용한 잔류물의 칼럼 크로마토그래피는 반응되지 않은 출발 물질 (89mg) 및 Sp-4 (57mg, 18% 수율, 회수된 출발 물질에 기초하여 24%)를 제공하였다.

[0314] **실시예 17. 합성 중간물질로서 3c를 이용한 Sp-4 의 제조**



[0315]

[0316] **실시예 17-1. 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)-3-플루오로-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일]-1H-피리미딘-2,4-디온, 12의 제조.**

[0317] 피리딘 (50 ml) 내의 3 (10.0g, 38.43 mmol) 용액에 디클로로메탄 (50 ml)이 첨가되었다. 생성된 용액은 0°C로 냉각되었다. 상기 용액에 4,4'-디메톡시트리틸 염화물 (14.32 g, 42.27 mmol)이 첨가되고, 그리고 생성된 용액은 0°C에서 5시간 동안 교반되었다. 반응을 키텅시키기 위하여 메탄올 (5 ml)이 첨가되었다. 생성된 용액은 감압 하에 농축 건조되고, 그리고 잔류물은 에틸 아세테이트 (500 ml) 및 물 (50 ml) 사이에 분할되었다. 유기 용액은 염수 (50 ml)로 세척되고 건조되었다 (황산나트륨, 4 g). 상기 용매는 감압 하에 제거되고, 그리고 잔류물

은 디클로로메탄 (100 ml)에 용해되었다. 생성된 용액에 이미다졸 (7.83 g, 115 mmol) 및 t-부틸디메틸실릴 염화물 (8.68 g, 57.6 mmol)이 첨가되었다. 생성된 용액은 주변 온도에서 16시간 동안 교반되었다. 반응을 켜치기 위하여 메탄올 (5 ml)이 첨가되고, 그리고 상기 용매가 감압 하에 제거되고, 그리고 잔류물은 에틸 아세테이트 (500 ml) 및 물 (50 ml) 사이에 분할되었다. 유기 용액은 건조되고 (황산나트륨, 4 g) 감압 하에 증발되었다. 잔류물은 칼럼 크로마토그래피 (헥산 내의 10-40% EtOAc)에 의해 정제되어 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS 중간물질 산물이 제공되었다. 이것은 차례로, 디클로로메탄 (200 ml) 내의 1% 트리플루오로아세트산으로 처리되었다. 생성된 용액은 주변 온도에서 1시간 동안 교반되었다. 물 (20 ml)이 첨가되고, 그리고 생성된 용액은 주변 온도에서 추가로 1시간 동안 교반되었다. 메탄올 (5 ml)이 천천히 첨가되고, 그리고 생성된 용액은 주변 온도에서 추가로 1시간 동안 교반되었다. 용액 pH를 7로 조정하기 위하여 수산화암모늄이 첨가되었다. 유기 용액은 분리되고, 건조되고 (황산나트륨, 4 g), 감압 하에 증발 건조되었다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (디클로로메탄에서 1-5% 메탄올)에 의해 정제되어 3단계에 걸쳐 50% 수율에서 백색 고체로서 **12** (7.5g)가 제공되었다. 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).

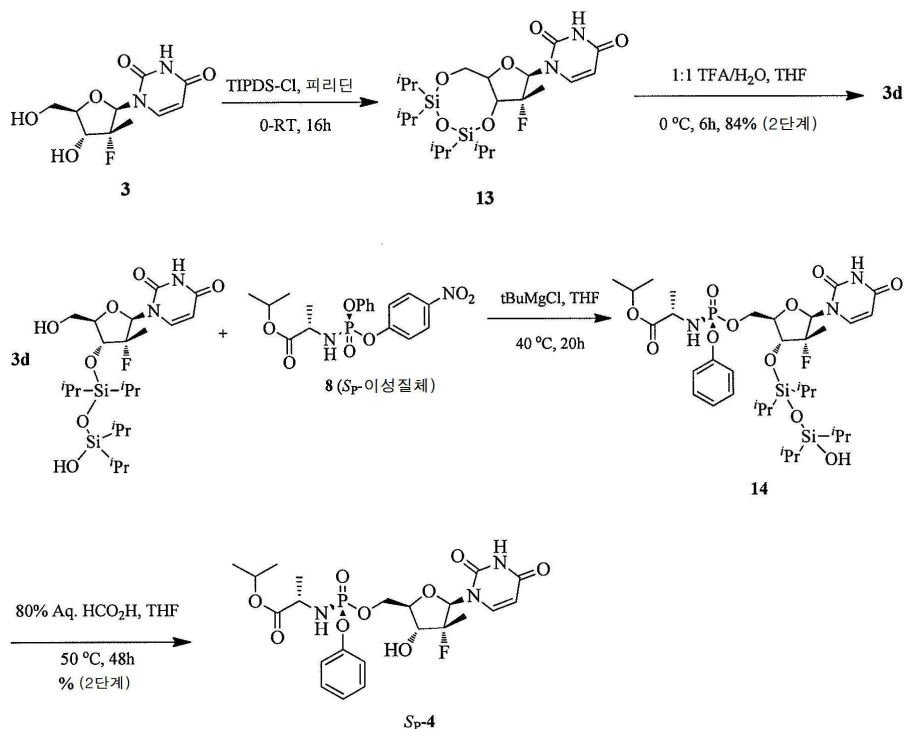
[0318]

실시예 17-2. 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)-3-플루오로-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일]-1H-피리미딘-2,4-디온 (3c)을 이용한 S_p-4의 제조.

[0319]

건성 THF (3 ml) 내의 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)-3-플루오로-5-히드록시메틸-3-메틸-테트라히드로-푸란-2-일]-1H-피리미딘-2,4-디온 (**12**, 374 mg, 1 mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (1.8 ml, 3.1 mmol)의 1.7 M 용액이 실온에서 2분에 걸쳐 첨가되었다. 처음에, 백색 침전물이 관찰되고, 그리고 10분후, 반응 혼합물은 투명하고 짙은 황색 용액으로 변화하였다. 30분후, THF (2.5 ml) 내의 (S)-2-[(S)-(4-니트로페녹시)-페녹시-포스포릴아미노]-프로피온산 이소프로필 에스테르 (**8**, S_p-이성질체, 653 mg, 1.6 mmol) 용액이 3분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 40℃에서 20시간 동안 가열되고, 이 시점에서 TLC 및 ¹H NMR은 5% 이하의 반응되지 않은 출발 물질을 지시하였다. 반응 혼합물은 포화된 수성 염화암모늄으로 켜치고, 이후 에틸 아세테이트 및 물 사이에 분할되었다. 유기 층은 10% 수성 Na₂CO₃ 용액 (3 x 10 ml), 그 이후에 물 (20 ml)로 세척되었다. 유기 층은 무수성 황산나트륨에서 건조되고 농축되어 **3c** (850 mg)를 포함하는 갈색 잔류물이 제공되었다. 가공되지 않은 산물은 테트라히드로푸란 (2 ml)에 용해되고 실온에서 0.8 ml의 80% 수성 포름산이 첨가되었다. 반응 혼합물은 50℃에서 96시간 동안 가열되었다. TLC에 의해 대략 70% 변환이 관찰되었다. 반응 혼합물은 차가운 포화된 수성 중탄산나트륨 내로 부어지고, 이후 에틸 아세테이트 및 물 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 층은 무수성 황산나트륨에서 건조되고 농축되어 갈색 잔류물 (220 mg)이 제공되었다. 0-5% MeOH/DCM 구배를 이용한 잔류물의 칼럼 크로마토그래피는 반응되지 않은 출발 물질 (21 mg) 및 S_p-4 (77 mg, 35% 수율, 회수된 출발 물질에 기초된 39% 수율)를 제공하였다.

[0320] 실시예 18. 합성 중간물질로서 3d를 이용한 S_P-4의 제조



[0322]

[0323]

[0324]

실시예 18-1. 3d의 제조

피리딘 (20 ml)에서 3의 교반된 용액에 0°C에서, TIPDS-Cl이 15분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온으로 천천히 가온되고, 상기 온도에서 16시간 동안 교반되었다. 피리딘이 증발되고, 그리고 잔류물은 톨루엔 (50 ml)과 함께 동시-증발되었다. 잔류물은 이후, 헥산으로 분쇄되고, 그리고 백색 침전물은 Celite의 패드를 이용하여 여과되었다. 여과액은 감압 하에 농축되어 품 같은 고체 (12.97 g)가 제공되었다. 가공되지 않은 산물 (13)은 테트라히드로푸란 (75 ml)에 재용해되고 TFA (75 ml, 1:1 TFA/물)의 수성 용액이 0°C에서 20분에 걸쳐 첨가되었다. 혼합물은 상기 온도에서 6시간 동안 교반되었다. TLC는 ~5%의 출발 물질을 지시하였다. 반응 혼합물은 pH 8까지 포화된 수성 NaHCO₃으로 켄칭되고, 이후 에틸 아세테이트로 추출되었다. 합쳐진 유기 추출물은 물로 세척되고, 건조되고, 농축되어 백색 결정성 고체가 제공되었다. 헥산 (30 ml)으로 상기 고체의 추가 분쇄 (trituration)는 백색 고체를 제공하고, 이는 여과되고 높은 진공 하에 건조되어 3d (10.1 g, 2 단계에 걸쳐 84% 수율)가 제공되었다. 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).

[0325]

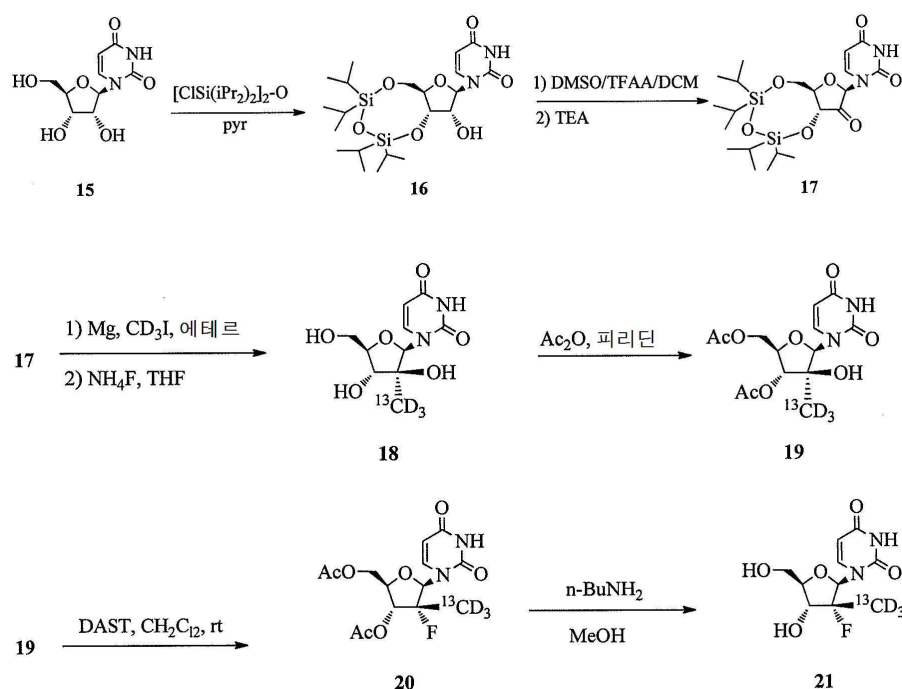
실시예 18-2. S_P-4의 제조

[0326]

건성 THF (5 ml) 내의 3d (520 mg, 1 mmol)의 교반된 용액에 tert-부틸마그네슘 염화물 (1.8 ml, 3.1 mmol, 3.1 당량)의 1.7M 용액이 실온에서 15분에 걸쳐 첨가되었다. 30분후, THF (1 ml) 내의 (S)-2-[(S)-(4-니트로-페녹시)-페녹시포스포릴아미노] 프로피온산 이소프로필 에스테르 (8, S_P-이성질체, 653 mg, 1.6 mmol) 용액이 3분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 60시간 동안 교반되었다. 가공되지 않은 샘플의 ¹H 및 ³¹P NMR은 대략 1:0.76에서 부분입체이성질체의 혼합물을 지시하였다. 반응 혼합물은 포화된 수성 NH₄Cl (20 ml)로 켄칭되었다. 혼합물은 에틸 아세테이트 (150 ml) 및 순차적으로, 10% 수성 Na₂CO₃ (3 x 20 ml) 및 물 (20 ml) 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 추출물은 무수성 황산나트륨에서 건조되고, 여과되고, 감압 하에 농축되어 연한 황색 잔류물 (14, 878 mg)이 제공되었다. 상기 화합물, 14는 테트라히드로푸란 (3 ml)에 재용해되고, 이후

80% 수성 포름산이 첨가되었다. 혼합물은 55℃에서 20시간 동안 가열되었다. 반응 혼합물은 0℃로 냉각되고, 이후 포화된 수성 중탄산나트륨 (pH 7.0)으로 켄칭되었다. 반응 혼합물은 이후, 에틸 아세테이트 및 물 사이에 분할되었다. 합쳐진 유기 층은 황산나트륨에서 건조되고 농축되어 560mg의 잔류물이 제공되었다. 잔류물은 0-5% 메탄올/디클로로메탄 구배를 이용하여 크로마토그래피되어 반응되지 않은 출발 물질 (**14**, 242mg) 및 **S_p-4** (80mg, 15% 수율)가 백색 고체로서 제공되었다.

실시예 19. 동위원소 표지된 S_p-4의 제조



실시예 19-1. 1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-히드록시-2,2,4,4-테트라이소프로필테트라히드로-6H-푸로[3,2-f][1,3,5,2,4]트릭옥사디실로신-8-일)피리미딘-2,4(1H,3H)-디온, 16의 제조

우리딘 (**15**, 100.0 g, 409.5 mmol)은 무수성 피리딘 (600 ml)과 함께 동시-증발 건조되고 무수성 피리딘 (700 ml)에서 재-현탁되었다. 이러한 교반된 미세한 현탁액에 1,3-디클로로-1,1,3,3-테트라이소프로필다실록산 (135.7 g, 482.5 mmol)이 주변 온도에서 60분에 걸쳐 첨가되었다. 미세한 현탁액을 주변 온도에서 17시간 동안 교반한 이후, 반응물은 메탄올 (20 ml)을 첨가함으로써 켄칭되고, 이후 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트 (1.5 l) 및 물 (2 l) 사이에 분할되었다. 유기 층은 5% 염화수소산 (2 x 1 l), 염수 (500 ml)로 더욱 세척되고, 고형 황산나트륨 (50 g)에서 건조되고, 여과되고, 감압 하에 농축되어 가공되지 않은 산물, ca 250 g이 제공되었다. 잔류물은 실리카 겔 (1.75 kg) 및 헥산 20-65%에서 에틸 아세테이트의 구배를 이용한 여과 칼럼에 투입되었다. 균질성 TLC (1:1 헥산-에틸 아세테이트에서 R_f 0.55)에 의한 판단에서 순수한 산물 분획물은 합쳐지고, 감압 하에 농축되고, 건조되어 (40℃, 0.2 mm Hg, 24 h) 145.5 g (76%)의 **16**이 백색 폼 고체로서 제공되었다. 약간 불순한 **16**의 추가의 분획물 (35 g) 역시 수집되었다. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 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 및 H-5), 4.14-4.18 (m, 3H, 2', 3', 4'-H), 3.97-3.87 (m, 2H, 5'-Ha 및 Hb), 1.02-0.95 (m, 28H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

실시예 19-2. 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-테트라이소프로필-9-옥소테트라히드로-6H-푸로[3,2-f][1,3,5,2,4]트릭옥사디실로신-8-일)피리미딘-2,4(1H,3H)-디온, 17의 제조

건성 3-구 둥근 플라스크에 무수성 DCM (600 ml) 및 DMSO (30.82 g, 394.5 mmol)가 첨가되었다. 생성된 용액은 질소 공기 하에 드라이아이스/아세톤 조에서 -78℃로 냉각되었다. 트리플루오로아세트산 무수물 (순수, 77.7 g,

369.8 mmol)이 주사기에 의해 40분에 걸쳐 첨가되어 흐린 혼합물이 제공되었다. 상기 혼합물에 DCM (600 mL) 내의 우리딘 유도체 **16**의 용액이 투입 깔때기 (addition funnel)를 통해 -78℃에서 75분에 걸쳐 방울방울 첨가되었다. 이질성 혼합물은 -78~-65℃에서 2시간 동안 교반되고, 이후 무수성 트리에틸아민 (92 mL)이 주사기에 의해 빠르게 첨가되어 투명한 밝은 황색 용액이 형성되었다. 낮은 온도에서 1시간후, 반응은 TLC (헥산 내 30% EtOAc)에 의해 완결이 확인되었다. 냉각조는 제거되고, 그리고 반응 혼합물은 1시간에 걸쳐 주변 온도로 천천히 가온되었다. 반응물은 sat. NH₄Cl (180 mL)의 첨가에 의해 켄칭되었다. 물 (200 mL)이 첨가되고, 그리고 유기 층은 분리되었다. 수성 층은 DCM (300 mL)으로 다시 한 번 추출되었다. 합쳐진 유기 층은 물 (3x 400 mL), 염수 (150 mL)로 세척되고, 그리고 Na₂SO₄에서 건조되었다. 용매의 제거는 점착성 갈색 잔류물을 제공하였다.

[0334]

가공되지 않은 오일 잔류물 (미량의 DCM을 포함)은 냉동 장치에서 하룻밤동안 보관되었다. 하룻밤후, 오일 내에서 일부 결정 고체가 관찰되었다. 상기 오일은 주변 온도에서 500 mL 헥산에 용해되었다. 생성된 용액은 냉동 장치에서 24시간 동안 보관되고, 그리고 더욱 많은 고체가 형성되었다. 고체는 여과에 의해 수집되고, 그리고 대부분의 오렌지색을 제거하기 위하여 헥산 (1 L)에서 차가운 10% DCM으로 헹굼되었다. 고체 (**17**)는 진공 하에 2시간 동안 건조되고, 이후 24시간 동안 자연건조되었다. 고체는 진공 하에 50℃에서 건조된 이후, 21 g으로 칭량되었다. 여과액은 농축되고, 그리고 잔류물은 칼럼 크로마토그래피 (헥산 내의 10-70% 에틸 아세테이트)에 의해 정제되어 추가의 37 g (97%의 통합 수율)의 **17**이 밝은 오렌지색 고체로서 제공되었다.

[0335]

[0336]

실시예 19-3. 1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-디히드록시-5-(히드록시메틸)-3-¹³C-퍼듀테리오메틸테트라히드로푸란-2-일)피리미딘-2,4(1H,3H)-디온, 18의 제조

[0337]

5% 수성 염화수소산으로 세척되고 건조된 (50℃, 0.2mm Hg, 24 h) 마그네슘 (3.53 g, 147 mmol)은 자석 교반기 및 응축기가 구비된 2-구 둥근 바닥 플라스크 내로 넣어졌다. 플라스크는 아르곤 가스로 채워지고, 이후 무수성 에테르 (80 mL)가 첨가되었다. 에테르에서 마그네슘에 퍼듀테리오 (perdeuterio)-¹³C 메틸 요오드화물 (15.06 g, 110.3 mmol)이 천천히 첨가되고, 이는 발열 반응을 발생시켰다. 반응 혼합물은 냉각된 이후, 상층액은 무수성 THF (1 L)에서 건조된 화합물 **17** (50℃, 0.2mm Hg, 15 h) (10.0 g, 20.63 mmol) 용액에 -50℃에서 20분에 걸쳐 이전되었다. 상기 온도는 -40℃로 상승되고, 그리고 혼합물은 -40 내지 -25℃에서 4시간 동안 교반되었다. 반응의 완결 시에, 혼합물은 -50℃에서 EtOAc (1 L)로 희석되고, 이후 염수 (300 mL)가 천천히 첨가되었다. 유기 층은 분리되고, 이후 포화 염화암모늄 용액 (300 mL x 2)으로 세척되고 황산나트륨에서 건조되었다. 여과 및 감압 하에 농축후, 잔류물은 MeOH (250 mL)에 용해되었다. 불화암모늄 (12 g) 및 TBAF (400 mg)가 첨가되었다. 결과의 혼합물은 90℃에서 7시간 동안 교반되고, 이후 감압 하에 실리카 겔 (20 g)로 농축되었다. 충분한 진공 건조후, 획득된 잔류물은 플래시 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:20 내지 1:10)에 의해 정제되어 화합물 **18** (5 g, 46%)이 백색 고체로서 제공되었다. 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'').

[0338]

실시예 19-4. ((2R,3R,4S,5R)-3-아세톡시-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-히드록시-4-¹³C-퍼듀테리오메틸테트라히드로푸란-2-일)메틸 아세테이트, 19의 제조

[0339]

무수성 피리딘 (100 mL) 내의 화합물 **18** (5.00 g, 19.1 mmol) 용액에 주변 온도에서 아세트산 무수물 (3 mL)이 첨가되었다. 결과의 혼합물은 주변 온도에서 15시간 동안 교반되고, EtOAc (250 mL)로 희석되고, 물 (50 mL x 3)로 세척되고, 그리고 황산나트륨에서 건조되었다. 여과 및 농축후, 잔류물은 플래시 칼럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂ 내의 MeOH 0 내지 5%)에 의해 정제되어 화합물 **19** (4.0 g, 68%)가 희색 고체로서 제공되었다.

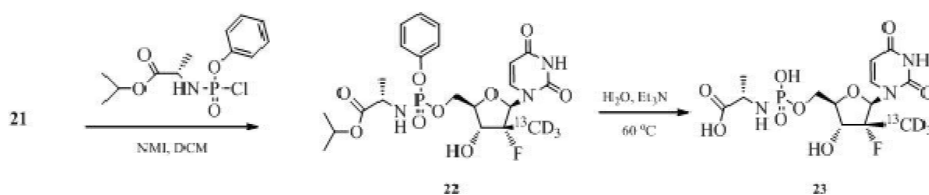
[0340]

실시예 19-5. ((2R,3R,4R,5R)-3-아세톡시-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-플루오로-4-¹³C-퍼듀테리오메틸테트라히드로푸란-2-일)메틸 아세테이트, 20의 제조

[0341] 무수성 CH_2Cl_2 (60 ml) 내의 화합물 **19** (2.33 g, 6.73 mmol) 용액에 DAST (1.33 ml, 10.1 mmol)가 -78°C 에서 천천히 첨가되었다. 결과의 혼합물은 주변 온도에 노출된 이후, 30분 동안 교반되었다. 추가의 2가지 2.33 g 규모 반응 및 1가지 1.00 g 규모 반응이 정확하게 동일한 방식으로 수행되었다. 4가지 반응 혼합물 모두 합쳐지고, CH_2Cl_2 (300 ml)로 희석되고, 그리고 얼음-물 (100 ml x 2), 이후 차가운 수성 NaHCO_3 용액 (100 ml x 2)으로 세척되었다. 건조, 여과, 그리고 농축후, 잔류물은 플래시 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (헥산 내의 EtOAc 0% 내지 50%, 화합물은 대략 48%에서 나타났다)에 의해 정제되어 화합물 **20** (2.0 g, 총 7.99 g의 화합물 **19**로부터 24%)이 백색 고체로서 제공되었다. ^1H NMR (CDCl_3) 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, CH_3), 2.15 (s, 3H, CH_3).

[0342] 실시예 19-6. 1-((2R,3R,4R,5R)-3-플루오로-4-히드록시-5-(히드록시메틸)-3- ^{13}C -퍼듀테리오메틸테트라히드로푸란-2-일)피리미딘-2,4(1H,3H)-디온, **21**의 제조

[0343] 메탄올 (20 ml) 내의 화합물 **20** (2 g, 5.74 mmol) 용액에 n-부틸아민 (6 ml)이 첨가되었다. 결과의 혼합물은 RT에서 15시간 동안 교반되고 진공에서 실리카 겔로 농축되었다. 획득된 잔류물은 플래시 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 에서 MeOH 0 내지 10%)에 의해 정제되어 화합물 **21** (1.3 g, 85%)이 백색 고체로서 제공되었다. ^1H NMR (CD_3OD) 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) 추정 265, 관찰 265.



[0344]

[0345] 실시예 19-7. (S)-이소프로필 2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-플루오로-3-히드록시-4- ^{13}C -퍼듀테리오메틸테트라히드로푸란-2-일)메톡시)(페녹시)포스포릴아미노)프로파노에이트, **22**의 제조

[0346] THF (4 ml) 내의 보호되지 않은 뉴클레오시드 **21** (207 mg, 0.783 mmol) 및 N-메틸이미다졸 (0.4 ml, 5 mmol) 용액에 THF에서 미리-만들어진 포스포로클로리데이트 (phosphorochloridate) (1.0 M, 2.35 ml, 2.35 mmol)가 0°C 에서 방울방울 첨가되었다. 반응물은 1시간에 걸쳐 주변 온도로 천천히 가온되고, 이후 물 (1 ml) 및 EtOAc (5 ml)가 첨가되었다. 유기 용액은 sat. aq. 단일 염기성 시트르산나트륨 (2 x 2 ml), sat. aq. NaHCO_3 (1 x 2 ml)으로 세척되고, 건조되고 (MgSO_4), 감압 하에 농축되었다. 가공되지 않은 물질은 CH_2Cl_2 에서 0 내지 5% $^i\text{PrOH}$ 를 용리제 (eluent)로서 이용한 실리카 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 포스포라미데이트, **22** (216 mg, 52%, P-부분입체이성질체의 1:1 혼합물)가 백색 고체로서 제공되었다: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.54 (s, 1H), 7.56 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.23-7.18 (m, 3H), 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); ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.90, 4.77; $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{D}_3\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$ 에 대하여 계산된 LRMS (ESI) $[\text{M} + \text{H}]^+$ 534.5, 관찰됨 534.4.

[0347] 실시예 19-8. (2S)-2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-플루오로-3-히드록

시-4-¹³C-퍼듀테리오메틸테트라히드로푸란-2-일)메톡시)(히드록시)포스포릴)아미노)프로파노산, 23의 제조

[0348] 포스포라미데이트 **22** (147 mg, 0.276 mmol)는 트리에틸아민 (2 ml) 및 물 (0.5 ml)에 현탁되고, 그리고 60℃에서 30시간 동안 가열되었다. 이후, 휘발성 성분은 감압 하에 증발되었다. 가공되지 않은 물질은 CH₂Cl₂에서 50-70% ⁱPrOH, 이후 ⁱPrOH에서 0 내지 20% NH₄OH로 용리함으로써 실리카 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 백색 고체로서 **23** (95 mg, 83%)이 제공되었다: 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; C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₅P에 대하여 계산된 LRMS (ESI) [M + H]⁺ 416.3, 관찰됨 416.4.

[0349] R_p-**4**, **4**, 그리고 S_p-**4**의 샘플의 특성

[0350] R_p-**4**, **4**, 그리고 S_p-**4**의 샘플은 X-선 분말 회절 (XRPD), 핵 자기 공명 (NMR) 분광법, 푸리에 변환 적외선 (FT-IR) 분광학, 시차 주사 열량계 (DSC), 열 중량 분석 (TGA), 중량 증기 수착 (GVS), 열역학 수용해도 (Thermodynamic Aqueous Solubility), 그리고 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 분석되었다.

[0351] 실시예 20. X-선 분말 회절

[0352] R_p-**4**, **4**, 그리고 S_p-**4**의 샘플은 아래의 계획 (regimen) 하에 X-선 분말 회절 (XRPD)에 의해 분석되었다.

[0353] a. Bruker AXS/Siemens D5000

[0354] X-선 분말 회절 패턴은 Cu Kα 방사 (40kV, 40mA), Θ-Θ 측각도계, V20의 발산 (divergence) 및 수용 슬릿 (slit), 흑연 이차 단색기 및 섬광 계수기를 이용한 Siemens D5000 회절계에서 수집되었다. 상기 기구는 공인된 강옥 기준 (Corundum standard) (NIST 1976)을 이용하여 성능 검증 (performance check)된다. 데이터 수집을 위하여 이용된 소프트웨어는 Diffrac Plus XRPD Commander v2.3.1이었고, 그리고 데이터는 Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 또는 v 13.0.0.2를 이용하여 분석되고 제공되었다.

[0355] 주변 조건

[0356] 주변 조건 하에서 작업되는 샘플은 수령된 그대로의 분말을 이용한 편평한 플레이트 건본으로서 제조되었다. 대략 35 mg의 샘플이 연마된, 제로-배경 (510) 실리콘 와이퍼 내에 구멍 컷 (cavity cut) 내로 부드럽게 패킹 (packing)되었다. 샘플은 분석 동안 그 자신의 평면에서 회전되었다. 데이터 수집물의 상세는 아래와 같다: 각도 범위: 2 내지 42° 2Θ; 스텝 (step) 크기: 0.05° 2Θ; 그리고 수집 시간: 4 s.step⁻¹.

[0357] b. Bruker AXS C2 GADDS

[0358] X-선 분말 회절 패턴은 Cu Kα 방사 (40 kV, 40 mA), 자동화된 XYZ 스테이지, 자동-샘플 위치결정을 위한 레이저 비디오 현미경 (laser video microscope) 및 HiStar 2-차원 면적 검출기를 이용한 Bruker AXS C2 GADDS 회절계에서 수집되었다. X-선 광학은 0.3 mm의 바늘구멍 조준기 (pinhole collimator)와 결합된 단일 Gobel 다중층 거울로 구성된다. 빔 발산 (beam divergence), 다시 말하면, 샘플 상에서 X-선 빔의 유효 크기는 대략 4 mm이었다. Θ-Θ 연속 스캔 모드 (continuous scan mode)가 3.2° - 29.7° 의 유효 2Θ 범위를 제공하는 20 cm의 샘플 - 검출기 거리에서 이용되었다. 전형적으로, 샘플은 120초 동안 X-선 빔에 노출될 것이다. 데이터 수집을 위하여 이용된 소프트웨어는 WNT 4.1.16용 GADDS이고, 그리고 데이터는 Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 또는 v 13.0.0.2를 이용하여 분석되고 제공되었다.

[0359] 주변 조건

[0360] 주변 조건 하에서 작업되는 샘플은 연마 (grinding) 없이 수령된 그대로의 분말을 이용한 편평한 플레이트 건본 으로서 제조되었다. 대략 1-2 mg의 샘플이 편평한 평면을 획득하기 위하여 유리 슬라이드 상에 가볍게 눌러졌다.

[0361] X-선 분말 회절 (XRPD)

[0362] 4는 XRPD에 의해 무정형인 것으로 밝혀졌다 (도 1 참조). 실시예 3에 따라 제조된 R_p-4의 고해상도 XRPD 분석은 결정성 고체인 것으로 확인된 S_p-4 (실시예 4, 방법 4에 따라 제조됨)의 패턴에 대하여 상이한 분말 패턴을 나타내는 결정성 고체임을 확증하였다. R_p-4 및 S_p-4에 대한 XRPD 결과는 표 1에 제시되는데, ≤5% (R_p-4) 및 ≤3% (S_p-4)의 강도를 나타내는 모든 피크는 배제된다.

표 1

R_p-4 및 S_p-4에 대한 XRPD 데이터.

R _p -4에 대한 XRPD 데이터		S _p -4에 대한 XRPD 데이터 (형태 1)	
각도	강도	각도	강도
2-세타 °	%	2-세타 °	%
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		

[0363]

[0364] S_p-4의 샘플은 막자 및 막자사발로 으개어지고, 이후 샘플을 미세한 분말로서 산출하기 위하여 500 및 250 μ m 체에 연속적으로 통과되었다. 이러한 샘플은 고해상도 XRPD로 재분석하여 형태 변화가 일어나지 않았다는 것을 확증하였다.

[0365] 실시예 21. S_p-4에 대한 결정화 연구.

[0366] 결정성 S_p-4는 다형 (polymorphism)을 나타낸다. 따라서 한 측면은 결정성 S_p-4 및 이의 개별 다형성 형태에 관한 것이다. S_p-4는 형태 1-5로 지정된 적어도 5가지 다형성 형태로 존재할 수 있다. 게다가, 무정형 S_p-4 역시 제조될 수 있다. 전형적인 결정화의 경우에, 대략 100 mg의 S_p-4가 적절한 부피의 결정화 용매 (아세트니트릴 (5 vol), 클로로포름 (5 vol), n-부틸 아세테이트 (7 vol), 디클로로메탄 (50 vol), 아니솔 (7 vol), 그리고 1:1 MTBE/헵탄 (50 vol))에 용해되고, 이후 생성된 용액이 5°C에서 증발된다. 다양한 결정성 형태가 획득되지만, 각 형태는 여과 및/또는 건조 시에, 형태 1을 제공하였다.

[0367] 형태 1, 2와 3은 단일 결정 X-선 및 XRPD 분석에 의해 확증될 때, 각각 비-용매화된 형태, 1:1 DCM 용매화합물 및 1:1 클로로포름 용매화합물이다. 형태 4와 5는 각각, 아세트니트릴 및 아니솔의 용액으로부터 S_p-4의 결정화에 의해 획득되었다. 형태 4와 5가 용매화되지 않는, 수화된 또는 용매화되는 지를 결정할 수 있을 만큼 충분한 데이터가 수집될 수 없었는데, 그 이유는 충분한 품질의 단일 결정이 획득되지 않았기 때문이다. 형태 4와 5는 여과 시에 형태 1로 변환된다. 2가지 추가의 결정성 형태가 n-부틸 아세테이트 (ⁿBuAc), 그리고 메틸-^t부틸 에테르 (MTBE) 및 헵탄을 포함하는 용액으로부터 S_p-4의 결정화 시에 획득된다; 여과 시에, 이들 결정성 형태 둘 모두 형태 1로 변환된다. 형태 2와 3 역시 분리 시에 형태 1로 변환된다. 형태 1은 94.3°C의 개시 온도 (onset temperature) 및 24.0⁻¹의 ΔH_{fus} 로 광범위한 용해 흡열 (melting endotherm)을 나타내는 비-용매화된 형태이다. S_p-4 형태 1의 추가의 XRPD 패턴은 도 4에 도시된다.

[0368] 실시예 21-1. S_p-4 형태 1

[0369] S_p-4 형태 1의 피크 목록은 표 2에 제시된다.

표 2

각도 2-세타 °	강도 %
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

[0370]

[0371]

실시예 21-2. S₁-4 형태 2

[0372]

S₁-4 형태 2의 XRPD 패턴은 도 5에 도시된다.

[0373]

S₁-4 형태 2의 피크 목록은 표 3에 제시된다.

표 3

각도 2-세타 °	강도 %
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

[0374]

[0375]

실시예 21-3. S_p-4 형태 3

[0376]

S_p-4 형태 3의 XRPD 패턴은 도 6에 도시된다.

[0377]

S_p-4 형태 3의 피크 목록은 표 4에 제시된다.

표 4

각도 2-세타 °	강도 %
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

[0378]

[0379]

실시예 21-4. S_p-5 형태 4

[0380]

S_p-4 형태 4의 XRPD 패턴은 도 7에 도시된다.

[0381]

S_p-4 형태 4의 피크 목록은 표 5에 제시된다.

표 5

각도 2-세타 °	강도 %
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

[0382]

[0383]

실시예 21-5. S₂-4 형태 5

[0384]

S₂-4 형태 5의 XRPD 패턴은 도 8에 도시된다.

[0385]

S₂-4 형태 5의 피크 목록은 표 6에 제시된다.

표 6

각도 2-세타 °	강도 %
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

[0386]

[0387]

실시예 21-6. S₂-4 (무정형)

[0388]

무정형 S₂-4의 XRPD 패턴은 도 9에 도시된다.

[0389]

실시예 22. S₂-4 및 이의 용매화합물의 단일 결정 X-선 결정학

[0390] 실시예 22-1. S₄-4 (형태 1)의 단일 결정 X-선 결정학

[0391] 도 10에서는 S₄-4 형태 1에 대한 X-선 결정 구조를 도시한다. 여기에서, 상기 도면은 넘버링 설계가 이용된 결정 구조로부터 형태 1 분자의 개관(view)을 보여준다. 비-수소 원자에 대한 이방성 원자 치환 타원면(anisotropic atomic displacement ellipsoid)이 50% 확률 수준(probability level)에서 제시된다. 수소 원자는 임의로 작은 반경으로 전시된다.

[0392] 구조 해석은 직접적인 방법, 가중 $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0592P)^2 + (0.6950P)$ (여기서 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, 이방성 치환 파라미터)를 이용한 F^2 에서 완전-매트릭스 최소 제곱 정산(full-matrix least-squares refinement)에 의해 달성되고, 구면 조화 함수(spherical harmonics)를 이용한 경험적 흡수 보정(empirical absorption correction)이 SCALE3 ABSPACK 스케일링 알고리즘에서 수행되었다. 모든 데이터에 대하여 최종 $wR^2 = \{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.0871$, 전통적인 $R_1 = F_o > 4\sigma(F_o)$, 모든 데이터에 대한 $S = 1.016$ 및 870개 파라미터를 이용한 7090개 리플렉션(reflection)의 F 값에서 0.0329. 최종 Δ/σ (최대) 0.001, Δ/σ (평균), 0.000. +0.534 내지 -0.36 e Å⁻³의 최종 차이 지도(final difference map).

표 7

형태 1의 단일 결정 파라미터

분자 형태	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁		
분자량	529.45		
결정 체계	단사정계		
스페이스 기	$P2_1$	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 ⁻³		
μ	1.475mm ⁻¹		
광원, λ	Cu K α , 1.54178Å		
$F(000)$	1112		
T	100(1)K		
결정	무색 플레이트, 0.12 x 0.09 x 0.03mm		
데이터 절삭(Data truncated to)	0.80 Å		
Θ_{max}	74.48°		
완전성	99.4%		
리플렉션	14854		
독특한 리플렉션	7513		
R_{int}	0.0217		

[0393]

[0394] 실시예 22-2. S₄-4 (형태 2)의 단일 결정 X-선 결정학

[0395] 도 11에서는 S₄-4 형태 2에 대한 X-선 결정 구조를 도시한다. 여기에서, 상기 도면은 넘버링 설계가 이용된 결정 구조로부터 형태 2 분자의 개관을 보여준다. 헤테로원자는 매우 빈약한 데이터로 인하여 등방성으로 분석되었다. 수소 원자는 전시되지 않는다.

[0396] 구조 해석은 직접적인 방법, 가중 $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0975P)^2 + (10.6969P)$ (여기서 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, 이방성 치환 파라미터)를 이용한 F^2 에서 완전-매트릭스 최소 제곱 정산에 의해 달성되고, 구면 조화 함수를 이용한 경험

적 흡수 보정이 SCALE3 ABSPACK 스케일링 알고리즘에서 수행되었다. 모든 데이터에 대하여 최종 $wR^2 = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.1883$, 전통적인 $R_1 = F_o > 4\sigma(F_o)$, 모든 데이터에 대한 $S = 1.05$ 및 158개 파라미터를 이용한 2525개 리플렉션의 F 값에서 0.0741. 최종 Δ/σ (최대) 0.000, Δ/σ (평균), 0.000, +1.388 내지 -0.967 e Å⁻³의 최종 차이 지도.

표 8

형태 2의 단일 결정 파라미터

분자 형태	C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ FN ₃ O ₉ P		
분자량	614.38		
결정 체계	단사정계		
스페이스 기	$P2_1$	a 12.8315(3) Å,	α 90 °,
		b 6.14530(10) Å,	β 91.752(2) °,
		c 17.6250(4) Å,	γ 90 °
V	1389.14(5) Å ³		
Z	2		
D_c	1.469 g·cm ⁻³		
μ	3.196 mm ⁻¹		
광원, λ	Cu-K, 1.54178 Å		
$F(000)$	640		
T	293(2) K		
데이터 절삭 (Data truncated to)	0.80 Å		
Θ_{max}	62.23°		
완전성	91.1%		
리플렉션	3528		
독특한 리플렉션	2562		
R_{int}	0.0227		

[0397]

[0398]

실시예 22-3. S₄-4 (형태 2)의 단일 결정 X-선 결정학

[0399]

도 12에서는 S₄-4 (형태 2)의 X-선 결정 구조 (ORTEP - 이방성)를 도시한다. S₄-4 (형태 2)의 염화메틸렌 용매 화합물, C₂₃H₃₁N₃PO₉FCl₂의 결정 구조는 $a=12.8822(14)$ Å, $b=6.1690(7)$ Å, $c=17.733(2)$ Å, $\beta=92.045(3)^\circ$, $V=1408.4(3)$ Å³, $Z=2$ 및 $d_{calc}=1.449$ g/cm³에서 단사정계 스페이스 기 P2₁ (규칙적인 부재 (systematic absences) 0k0: k=홀수)를 산출한다. X-선 강도 데이터는 143K의 온도에서 흑연-단색 Mo-K α 방사 ($\lambda=0.71073$ Å)를 이용하는 Rigaku Mercury CCD 면적 검출기에서 수집되었다. 예비 인덱싱 (preliminary indexing)은 30초 노출된 일련의 12개 0.5° 회전 이미지로부터 수행되었다. 35 mm의 결정 대(對) 검출기 거리, -12°의 2θ스윙 각도, 0.5°의 회전 너비 및 30초 노출에서 총 648개 회전 이미지가 수집되었다: 스캔 no. 1은 $\omega=10^\circ$ 및 $\chi=20^\circ$ 에서 315° 내지 525°의 Φ -스캔이다; 스캔 no. 2는 $\chi=-90^\circ$ 및 $\Phi=315^\circ$ 에서 -20° 내지 5°의 ω -스캔이다; 스캔 no. 3은 $\chi=-90^\circ$ 및 $\Phi=135^\circ$ 에서 -20° 내지 4°의 ω -스캔이다; 스캔 no. 4는 $\chi=-90^\circ$ 및 $\Phi=225^\circ$ 에서 -20° 내지 5°의 ω -스캔이다; 스캔 no. 5는 $\chi=-90^\circ$ 및 $\Phi=45^\circ$ 에서 -20° 내지 20°의 ω -스캔이다. 회전 이미지는 CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999)를 이용하여 처리되고 평균화되지 않은 F^2 및 $\sigma(F^2)$ 값의 목록이 산출되며, 이들 값은 이후, Dell Pentium III 컴퓨터 상에서 진전된 처리 및 구조 해결을 위하여 CrystalStructure (CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigaku/MSO (2002)) 프로그램 패키지로 넘겨졌다. 총 7707개 리플렉션이 범위 $5.48 \leq 2\theta \leq 50.04^\circ$, $-14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$ 에서 측정되고, 4253개 독특한 리플렉션 ($R_{int} =$

0.0180)이 산출되었다. 강도 데이터는 REQAB (최소 및 최대 전송 0.824, 1.000)를 이용하여 Lorentz 및 극성 효과, 그리고 흡수에 대하여 보정되었다.

[0400]

구조는 직접적인 방법에 의해 해석되었다 (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). 산정 (refinement)은 SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.*, **A64**, 112-122)을 이용하여 F^2 에 기초된 완전-매트릭스 최소 제곱에 의해 달성되었다. 모든 리플렉션이 산정 동안 이용되었다. 이용된 가중 설계 (weighting scheme)는 $w=1/[\sigma^2(F_{o2})+ 0.0472P^2 + 0.4960P]$ 이고, 여기서 $P = (F_{o2}+ 2F_{c2})/3$ 이었다. 비-수소 원자는 이방성으로 산정되고, 그리고 수소 원자는 "라이딩 (riding)" 모형을 이용하여 산정되었다. 산정은 4046개 리플렉션에 대하여 $R_1=0.0328$ 및 $wR_2=0.0817$ 로 수렴하고, 이러한 경우에 모든 4253개 독특한, 비-제로 리플렉션 및 358개 변수 ($R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR_2 = \{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)\}^{1/2}$; $GOF = \{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)\}^{1/2}$; 여기서 n = 리플렉션의 숫자 및 p = 산정된 파라미터의 숫자)에 대하여 $F > 4\sigma(F)$ 및 $R_1=0.0348$, $wR_2=0.0838$ 및 $GOF = 1.056$ 이었다. 최소 제곱의 최종 사이클에서 최대 Δ/σ 는 0.000이고, 그리고 최종 푸리에 차이 (final difference Fourier)에서 2개의 가장 현저한 피크는 +0.312 및 -0.389 e/Å³이었다. Flack 절대 구조 파라미터는 -0.06(6)으로 산정되고, 따라서 표제 화합물의 입체화학을 확증하였다.

[0401]

표 1에서는 셀 (cell) 정보, 데이터 수집 파라미터, 그리고 산정 데이터를 열거한다. 최종 위치 및 동등한 등방성 열 파라미터는 표 2에 제시된다. 이방성 열 파라미터는 표 3에 제시된다 ("ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations". C.K. Johnson (1976) ORNL-5138). 30% 확률 열 타원면으로 상기 분자의 표현이 전시됨.

표 9

화합물 S_p-4 CH₂Cl₂의 구조 결정의 요약.

화학식:	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ PO ₉ FCl ₂
화학식량:	614.38
결정 부류:	단사정계
스페이스 기:	P2 ₁ (#4)
Z	2
셀 상수:	
a	12.8822(14) Å
b	6.1690(7) Å
c	17.733(2) Å
β	92.045(3)°
V	1408.4(3) Å ³
μ	3.48 cm ⁻¹
결정 크기, mm	0.42 x 0.12 x 0.10
D _{calc}	1.449 g/cm ³
F(000)	640
방사:	Mo-K _α (λ=0.71073 Å)
2θ 범위	5.48 - 50.04 °
수집된 hkl:	-14 ≤ h ≤ 15; -7 ≤ k ≤ 6; -19 ≤ l ≤ 21
측정된 리플렉션 숫자:	7707
독특한 리플렉션 숫자:	4253 (R _{int} =0.0180)
관찰된 리플렉션 숫자	4046 (F>4 σ)
산정에 이용된 리플렉션 숫자	4253
파라미터 숫자	358
R 지수 (F>4 σ)	R ₁ =0.0328 wR ₂ =0.0817
R 지수 (모든 데이터)	R ₁ =0.0348 wR ₂ =0.0838
GOF:	1.056
최종 차이 피크, e/Å ³	+0.312, -0.389

[0402]

[0403]

실시예 22-4. S_p-4 (형태 3)의 단일 결정 X-선 결정학

[0404]

도 13에서는 S_p-4 형태 3에 대한 X-선 결정 구조를 도시한다. 여기에서, 상기 도면은 넘버링 설계가 이용된 결정 구조로부터 형태 3 분자의 개관을 보여준다. 비-수소 원자에 대한 이방성 원자 치환 타원면이 50% 확률 수준에서 제시된다. 수소 원자는 임의의 작은 반경으로 전시된다.

[0405]

구조 해석은 직접적인 방법, 가중 $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0512P)^2 + (0.6810P)$ (여기서 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, 이방성 치환 파라미터)를 이용한 F^2 에서 완전-매트릭스 최소 제곱 정산에 의해 달성되고, 구면 조화 함수를 이용한 경험적 흡수 보정이 SCALE3 ABSPACK 스케일링 알고리즘에서 수행되었다. 모든 데이터에 대하여 최종 $wR^2 = \{\Sigma[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\Sigma[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.0796$, 전통적인 $R_1 = F_o > 4\sigma(F_o)$, 모든 데이터에 대한 $S = 1.068$ 및 377개 파라미터를 이용한 2486개 리플렉션의 F 값에서 0.0294. 최종 Δ/σ (최대) 0.001, Δ/σ (평균), 0.000. +0.211 내지 -0.334 e Å⁻³의 최종 차이 지도.

표 10

형태 3의 단일 결정 파라미터

분자 형태	$C_{23}H_{36}Cl_3F_1N_3O_9P_1$			
분자량	648.82			
결정 체계	단사정계			
스페이스 기	$P2_1$	a	12.9257(4) Å,	α 90 °,
		b	6.18080(10) Å,	β 96.399(2) °,
		c	18.0134(4) Å,	γ 90 °
V	1430.15(6) Å ³			
Z	2			
D_c	1.507g.cm ⁻¹			
μ	3.977mm ⁻¹			
광원, λ	Cu K α , 1.54178 Å			
$F(000)$	672			
T	100(1)K			
결정	무색 침상 결정체, 0.22 x 0.03 x 0.02mm			
데이터 절삭(Data truncated to)	0.80 Å			
Θ_{max}	74.41°			
완전성	69.1%			
리플렉션	3062			
독특한 리플렉션	2607			
R_{int}	0.0198			

[0406]

[0407]

실시예 23. 상승된 온도와 상대 습도에서 안전성

[0408]

R₆-4의 샘플은 40℃ 및 75% 상대 습도에서 습도 챔버 (humidity chamber)에서 1주일 동안 보관되고, 그리고 상기 샘플은 XRPD에 의해 재분석되었다. R₆-4에 대하여 획득된 분말 패턴은 실험 경과 동안 실질적인 변화를 보이지 않았는데, 이는 고체 형태에서 변화가 관찰되지 않는다는 것을 의미하였다. 이는 40℃ 및 75% 상대 습도에서 보관 시에 대략 16시간 이내에 조해 (deliquescence)하는 4의 샘플과 대조되었다. 실제로, 4의 조해 특성의 실례는 아래에서 예시된다. 4의 샘플은 250 μm 체에 통과되고, 이후 샘플은 40℃ / 75% RH 및 25℃ / 53% 상대 습도에서 보관되고, 그리고 규칙적인 간격에서 시각적 관찰이 수행되었다. 획득된 결과는 표 11에 제공된다.

표 11

상승된 상대 습도에 대한 4의 안전성.

조건	t = 1.5 h	t = 4.5 h	t = 6.5 h	t = 8.5 h	t = 73 h
40℃ / 75%RH	조해	-	-	-	-
25℃ / 53%RH	조해 없음	점착성 고체	부분 조해	거의 완전한 조해	조해

[0409]

[0410]

40℃ 및 75% 상대 습도에서 보관 시에, S₆-4의 샘플은 16시간 이내에 조해하였다. 가령, S₆-4의 샘플은 막자 및 막자사발로 으개어지고, 이후 샘플을 미세한 분말로써 산출하기 위하여 500 및 250 μm 체에 연속적으로 통과되었다. 이러한 물질의 샘플은 40℃ 및 75% 상대 습도, 그리고 25℃ 및 53% RH에서 보관되고, 그리고 규칙적인 간격에서 시각적 관찰이 수행되었다. 획득된 결과는 표 12에 제공된다.

표 12

상승된 상대 습도에 대한 S-4의 안정성.

조건	t = 1.5 h	t = 4.5 h	t = 104 h
40 °C / 75% RH	조해 없음	조해	-
25 °C / 53% RH	조해 없음	조해 없음	조해 없음

[0411]

[0412]

25°C 및 53% RH에서 104시간 동안 보관후 샘플의 XRPD 분석은 산출된 회절도에서 별다른 변화를 나타내지 않았는데, 이는 형태 변화가 발생하지 않는다는 것을 지시하였다.

[0413]

실시예 24. 푸리에 변환 - 적외선 (FT-IR) 분광학

[0414]

데이터는 보편적인 감쇠 전반사 (Attenuated Total Reflectance, ATR) 샘플링 부착물이 구비된 Perkin-Elmer Spectrum One에서 수집되었다. 이들 데이터는 스펙트럼 v5.0.1 소프트웨어를 이용하여 수집되고 분석되었다.

[0415]

4, R_p-4, 그리고 S_p-4에 대하여 획득된 IR 스펙트럼은 각각, 도 5-7에서 도시된다. 파수 (wavenumber) (cm⁻¹)에서 선별된 피크는 하기에 열거된다:

[0416]

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

[0417]

R_p-4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (도 15); 그리고

[0418]

S_p-4 (형태 1): ~1743, ~1713, ~1688, ~1454, ~1378, ~1208, ~1082 (도 16).

[0419]

실시예 25. 시차 주사 열량계 (DSC) 열 중량 분석 (TGA)

[0420]

DSC 데이터는 50 위치 자동-샘플채취기가 구비된 TA Instruments Q2000에서 수집되었다. 열용량 (thermal capacity)에 대한 보정은 사파이어 (sapphire)를 이용하여 수행되고, 그리고 에너지 및 온도에 대한 보정은 공인된 인들을 이용하여 수행되었다.

[0421]

조정된 온도 DSC는 전형적으로, 2°C.min⁻¹의 기초 가열 속도, 그리고 ±0.2 °C.min⁻¹ 및 40초의 온도 조정 파라미터를 이용하여, 핀홀 알루미늄 팬 (pin-holed aluminum pan) 내에서 0.8-1.2 mg의 각 샘플에서 수행되었다. 50 mL.min⁻¹에서 건성 질소의 퍼지 (purge)가 샘플 위에서 유지되었다.

[0422]

기구 제어 소프트웨어는 Advantage for Q Series v2.8.0.392 및 Thermal Advantage v4.8.3이었고, 그리고 데이터는 Universal Analysis v4.3A를 이용하여 분석되었다.

[0423]

DSC 데이터는 34 위치 자동-샘플채취기가 구비된 Mettler DSC 823e에서 수집되었다. 상기 기구는 공인된 인들을 이용하여 에너지 및 온도에 대하여 보정되었다. 핀홀 알루미늄 팬 내에서 전형적으로 0.8-1.2 mg의 각 샘플은 25°C에서부터 250°C까지 10°C.min⁻¹로 가열되었다. 50 mL.min⁻¹에서 질소 퍼지가 샘플 위에서 유지되었다. 기구 제어 및 데이터 분석 소프트웨어는 STARe v9.20이었다.

[0424]

TGA 데이터는 34 위치 자동-샘플채취기가 구비된 Mettler TGA/SDTA 851e에서 수집되었다. 상기 기구는 공인된 인들을 이용하여 온도 보정되었다. 전형적으로, 8-12 mg의 각 샘플이 미리-칭량된 알루미늄 도가니에 로딩되고 주변 온도에서부터 350°C까지 10°C.min⁻¹로 가열되었다. 50 mL.min⁻¹에서 질소 퍼지가 샘플 위에서 유지되었다. 기구 제어 및 데이터 분석 소프트웨어는 STARe v9.20이었다.

[0425]

4의 DSC 분석은 더욱 조정된 DSC 분석에 의해 유리 전이 동안 분자 이완 (molecular relaxation)에 기인하는 것

으로 확증된 58.7℃ (ΔH 14 J.g⁻¹)의 개시로 광범위한 단일 흡열을 증명하였다 (도 17). 4의 TGA 분석은 240℃ 초과에서 분해에 앞서 중량 손실이 없음을 증명하고, 이는 상기 물질이 비-용매화된다는 것을 확증하였다. 4의 XRPD 분석에서 상기 물질이 무정형인 것으로 확증되었기 때문에, 57℃인 것으로 밝혀진 유리 전이 온도를 계산하기 위하여 조정된 DSC 분석이 수행되었다.

R_p-4의 DSC 분석은 고온 현미경 검사 (hot stage microscopy)에 의해 용해물인 것으로 확증된 136.2℃ (ΔH 76 J.g⁻¹)의 개시로 명확한 단일 흡열 (endotherm)을 증명하였다 (도 18 참조). R_p-4의 TGA 분석은 240℃ 초과에서 분해에 앞서 중량 손실이 없음을 증명하고, 이는 상기 물질이 비-용매화된다는 것을 확증하였다.

S_p-4의 DSC 분석은 고온 현미경 검사에 의해 용해물인 것으로 확증된 93.9℃ (ΔH 43 J.g⁻¹)의 개시로 광범위한 단일 흡열을 증명하였다 (도 19 참조). S_p-4의 TGA 분석은 240℃ 초과에서 분해에 앞서 중량 손실이 없음을 증명하고, 이는 상기 물질이 비-용매화된다는 것을 확증하였다.

실시예 26. 중량 증기 수착 (GVS)

SMS DVS Intrinsic

수착 등온선 (sorption isotherm)은 SMS 분석 Suite 소프트웨어에 의해 제어되는 SMS DVS Intrinsic 수분 수착 분석기 (moisture sorption analyzer)를 이용하여 획득되었다. 샘플 온도는 기구 제어에 의해 25℃에 유지되었다. 습도는 200 mL.min⁻¹의 전체 유속으로, 건성과 습성 질소의 흐름을 혼합함으로써 제어되었다. 상대 습도는 샘플 인근에 놓여진 보정된 Rotronic 프로브 (1.0-100% RH의 동적 범위)에 의해 측정되었다. % RH의 함수로서 샘플의 중량 변화 (mass relaxation)는 미량 천칭 (microbalance) (정밀도 ± 0.005 mg)에 의해 지속적으로 모니터링되었다.

전형적으로, 5-20 mg의 샘플이 주변 조건 하에 칭량된 메쉬 스테인리스 바구니 내에 배치되었다. 샘플은 40% RH 및 25℃ (전형적인 실내 조건)에서 로딩되고 로딩되지 않는다. 수분 수착 등온선 (moisture sorption isotherm)은 하기에 요약된 바와 같이 수행되었다 (2회 스캔이 1회 완전 사이클을 제공한다). 표준 등온선은 25℃에서 10% RH 간격으로 0.5-90% RH 범위에서 수행되었다.

표 13

SMS DVS Intrinsic 실험을 위한 방법 파라미터

파라미터	값
흡착 - 스캔 1	40 - 90
탈흡착 / 흡착 - 스캔 2	90 - 0, 0 - 40
간격 (%RH)	10
스캔 횟수	2
유속 (mL.min ⁻¹)	200
온도 (℃)	25
안전성 (℃.min ⁻¹)	0.2
수착 시간 (h)	6시간 타임 아웃 (time out)

샘플은 등온선의 완결 후 회수되고 XRPD에 의해 재분석되었다.

[0434] GVS 분석은 0에서부터 90% 상대 습도까지 대략 0.2 wt%의 물의 가역적 흡수로, **Rp-4**가 비-흡습성임을 증명하였다. GVS 실험후 XRPD에 의한 샘플의 재분석은 형태에서 변화가 없음을 증명하였다.

[0435] **Sp-4**의 샘플은 막자 및 막자사발로 으개어지고, 이후 샘플을 미세한 분말로서 산출하기 위하여 500 및 250 μm 체에 연속적으로 통과되고, 상기 분말은 이후, 변형된 단일 사이클 방법을 이용하여 분석되었다. 이러한 샘플은 표준 방법을 위한 90% 대신에 40% RH (대략 주변) 내지 60% RH에서 채취되고, 이후 0%로, 그리고 다시 40% RH로 순환되었다. 이러한 분석은 0에서부터 60% RH까지 ~0.2 중량%의 물의 가역적 흡수로, **Sp-4**가 최대 60% RH까지 비-흡습성임을 증명하였다.

[0436] 실시예 27. 열역학 수용해도 (Thermodynamic Aqueous Solubility)

[0437] 수용해도 (aqueous solubility)는 화합물의 부모 유리-형태의 $\geq 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 최대 최종 농도를 제공하기 위하여, 충분한 양의 화합물을 물에 현탁시킴으로써 결정되었다. 현탁액은 25°C에서 24시간 동안 평형화되고, 이후 pH가 측정되었다. 그 다음, 현탁액은 유리 섬유 C 필터를 통하여 96 웰 평판 내로 여과되었다. 여과액은 101의 계수로 희석되었다. 정량은 DMSO에서 대략 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 표준 용액과 관련하여 HPLC에 의해 수행되었다. 상이한 부피의 표준, 희석된 및 희석되지 않은 샘플 용액이 주입되었다. 용해도는 표준 주입에서 주요 피크에서와 동일한 체류 시간 (retention time)에서 관찰된 피크의 적분 (integration)에 의해 결정된 피크 면적 (peak area)을 이용하여 계산되었다.

표 14

용해도 측정을 위한 HPLC 방법 파라미터

방법의 유형:	구배 용리를 이용한 역상		
칼럼:	Phenomenex Luna, C18 (2) 5 μm 50 x 4.6 mm		
칼럼 온도 (°C):	25		
표준 주입 (μL):	1, 2, 3, 5, 7, 10		
검사 주입 (μL):	1, 2, 3, 10, 20, 50		
검출: 파장, 띠너비 (nm):	260, 80		
유속 ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$):	2		
A 상:	물 내의 0.1% TFA		
B 상:	아세토니트릴 내의 0.085% TFA		
시간표:	시간 (min)	A 상 %	B 상 %
	0.0	95	5
	1.0	80	20
	2.3	5	95
	3.3	5	95
	3.5	95	5
	4.4	95	5

[0438]

[0439] 분석은 다이오드 어레이 검출기 (diode array detector)가 구비된 Agilent HP1100 시리즈 시스템에서 앞서 언급된 조건 하에, 그리고 ChemStation 소프트웨어 vB.02.01-SR1을 이용하여 수행되었다.

표 15

Rp-4, 4, 그리고 *Sp*-4에 대한 수용해도 결과.

샘플 ID	여과되지 않은 혼 합물의 pH	용해도 / mg.mL ⁻¹	적요
<i>Rp</i> -4	7.12	1.58	현탁액
4	7.03	6.11	잔여 고체
<i>Sp</i> -4	6.88	5.65	잔여 고체

[0440]

[0441]

실시에 28. HPLC에 의한 화학적 순도 결정

[0442]

다양한 HPLC 조건이 본 명세서에서 개시된 화합물의 화학적 순도를 결정하는데 이용될 수 있다. 이와 같은 한 가지 실례는 열역학적 수용해도 연구와 관련하여 상기에 개시된다. 다른 실례는 하기에 개시된다.

[0443]

HPLC 조건:

[0444]

LC: Waters Alliance 2695 분리 모듈, Waters 2996 PDA 검출기 및 Waters

[0445]

Empower 2 소프트웨어 (Version 6.00)

[0446]

칼럼: Phenomenex Luna C18(2); 4.6 x 50mm; 3 μm

[0447]

유속: 1.2 mL/min

[0448]

주입 부피: 10 μL

[0449]

이동상: 용매 A: 5% 메탄올 및 10mM 암모늄 아세테이트를 포함하는 95% 물;

[0450]

pH~5.3

[0451]

용매 B: 10mM 암모늄 아세테이트를 포함하는 MeOH

[0452]

구배: 0%B에 유지됨 3분

[0453]

0-47%B 3-4분

[0454]

47%B에 유지됨 4-10분

[0455]

47%-74%B 10-11분

[0456]

74%B에 유지됨 11-13.5분

[0457]

0%B로 환원됨 13.5-13.6분

[0458]

0%B에 유지됨 13.6-15.5분

[0459]

이들 조건 하에, 4, *Rp*-4, 그리고 *Sp*-4의 순도는 각각, ~99.6, ~99%, 그리고 ~99.5%인 것으로 결정되었다. 더욱 높은 순도는 앞서 개시된 방법을 최적화함으로써 실현될 수 있다.

[0460]

XRPD 회절도의 검사는 2개의 결정성 단일 부분입체이성질체가 명백하게 상이한 XRPD 패턴을 제공한다는 것을 증명한다. 부가적으로, 2개의 결정성 부분입체이성질체의 용점에서 명백한 차이가 관찰되었는데, *Rp*-4는 *Sp*-4보다 훨씬 높은 개시를 보유했다 (136°C 대 94°C).

- [0461] 실시예 29. 추가의 분리 방법
- [0462] 아래의 SFC 분리 (조건은 하기에 열거됨)는 부분입체이성질체, *R_p*-**4** 및 *S_p*-**4**의 혼합물의 적절한 분리를 산출하였다.
- [0463] 준비 방법: 분석 방법:
- [0464] Chiralpak AS-H (2 x 25 cm) SN# 07-8656 Chiralpak AS-H (25 x 0.46cm)
- [0465] 20% 메탄올/CO₂ (100 bar) 20% 메탄올/CO₂ (100 bar)
- [0466] 50 mL/min, 220 nm. 3 mL/min, 220 nm.
- [0467] 농도: 260 mg/30 mL 메탄올
- [0468] 주입 부피: 1.5 mL
- [0469] 아래의 SFC 분리 (조건은 하기에 열거됨)는 부분입체이성질체, *R_p*-**4** 및 *S_p*-**4**의 혼합물의 적절한 분리를 산출하였다.
- [0470] 준비 방법: 분석 방법:
- [0471] Chiralpak IA(2 x 15 cm) 802091 Chiralpak IA(15 x 0.46 cm)
- [0472] 30% 이소프로판올(0.1% DEA)/CO₂, 100 bar 40% 메탄올(DEA)/CO₂, 100 bar
- [0473] 60 mL/min, 220 nm. 3 mL/min, 220 nm.
- [0474] 주입 부피: 2 mL, 20 mg/mL 메탄올

표 16

Ⓐ-4, 4, 그리고 Ⓐ-4의 배치 특성화 (batch characterization)로부터
결과의 요약.

분석	Ⓐ-4	4	Ⓐ-4
양성자 NMR	단일 부분입체이성질체	부분입체이성질체의 1:1 혼합물	단일 부분입체이성질체
XRPD	결정성 - Ⓐ-4와 상이함	무정형	결정성 - Ⓐ-4와 상이함
DSC	흡열; 용융 - 136℃	흡열; 59℃	흡열; 용융 - 94℃
TGA	wt 손실 없음, 분해 >240℃	wt 손실 없음, 분해 >240℃	wt 손실 없음, 분해 >240℃
IR	상기 참조	상기 참조	상기 참조
수 용 해 도 (mg.mL ⁻¹)	1.58	6.11	5.65
HPLC 순도	96.9 %	99.6 %	99.5 %
40℃ / 75% RH	형태 변화 없음	1.5시간 이내에 조해	4.5시간 이내에 조해
25℃ / 53% RH	-	조해	형태 변화 없음
GVS	90% RH까지 비-흡습성	-	60% RH까지 비-흡습성

실시예 30. 8 (Ⓐ-이성질체)의 X-선 결정학

화합물 8 (Ⓐ-이성질체), $C_{18}H_{21}N_2PO_7$ 은 $a=5.3312(4)\text{Å}$, $b=15.3388(8)\text{Å}$, $c=23.7807(13)\text{Å}$, $\beta=92.891(3)^\circ$, $V=1942.2(2)\text{Å}^3$, $Z=4$, 그리고 $d_{\text{calc}}=1.397\text{ g/cm}^3$ 에서 단사정계 스페이스 기 $P2_1$ (규칙적인 부재 $0k0$: $k=\text{홀수}$)에서 결정화된다. X-선 강도 데이터는 100(1)K의 온도에서 흑연-단색 Mo-K α 방사 ($\lambda=0.71073\text{ Å}$)를 이용하는 Bruker APEXII CCD 면적 검출기에서 수집되었다. 도 20a 및 20b에서는 각각, 비대칭 단위의 1번과 2번 분자를 도시한다.

예비 인덱싱 (preliminary indexing)은 30초 노출된 일련의 36개 0.5° 회전 프레임으로부터 수행되었다. 70.00 mm의 결정 대 검출기 거리, 0.5° 의 회전 너비 및 20초 노출에서 총 3608개 프레임이 수집되었다:

스캔 유형	2θ	ω	ϕ	χ	프레임
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

회전 프레임은 SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.)를 이용하여 적분되어 평균화되지 않은 F^2 및 $\sigma(F^2)$ 값의 목록이 산출되며, 이들 값은 이후, Dell Pentium 4 컴퓨터 상에서 진전된 처리 및 구조 해석을 위하여 SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) 프로그램 패키지로 넘겨졌다. 총 6909개 리플렉션이 범위 $1.58 \leq \theta \leq 25.09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq$

$k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$ 에서 측정되고, 6909개 독특한 리플렉션 ($R_{\text{int}} = 0.0581$)이 산출되었다. 강도 데이터는 SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Germany.) (최소 및 최대 전송 0.6093, 0.7452)를 이용하여 Lorentz 및 극성 효과, 그리고 흡수에 대하여 보정되었다.

[0481]

구조는 직접적인 방법에 의해 해석되었다 (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64,112-122.)). 산정은 SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64, 112-122.)을 이용하여 F^2 에 기초된 완전-매트릭스 최소 제곱에 의해 달성되었다. 모든 리플렉션이 산정 동안 이용되었다. 이용된 가중 설계 (weighting scheme)는 $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0000P)^2 + 14.0738P]$ 이고, 여기서 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ 이었다. 비-수소 원자는 이방성으로 산정되고, 그리고 수소 원자는 승마 (riding) 모형을 이용하여 산정되었다. 산정은 6173개 관찰된 리플렉션에 대하여 $R1 = 0.0847$ 및 $wR2 = 0.1899$ 로 수렴하고, 이러한 경우에 모든 6909개 독특한, 비-제로 리플렉션 및 512개 변수 ($R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2}$; 여기서 n = 리플렉션의 숫자 및 p = 산정된 파라미터의 숫자)에 대하여 $F > 4\sigma(F)$ 및 $R1=0.0963$ 및 $wR2=0.1963$ 및 $GOF = 1.119$ 이었다. 최소 제곱의 최종 사이클에서 최대 Δ/σ 는 0.000이고, 그리고 최종 푸리에 차이 (final difference Fourier)에서 2개의 가장 현저한 피크는 +0.402 및 -0.559 $e/\text{\AA}^3$ 이었다.

표 17

화합물 8 (S-이성질체)의 구조 결정의 요약

실험식	C ₁₃ H ₂₁ N ₂ PO ₇
화학식량	408.34
온도	100(1) K
파장	0.71073 Å
결정 체계	단사정계
스페이스 기	P2 ₁
셀 상수:	
a	5.3312(4) Å
b	15.3388(8) Å
c	23.7807(13) Å
β	92.891(3)°
부피	1942.2(2) Å ³
Z	4
밀도 (계산됨)	1.397 Mg/m ³
흡착 계수	0.185 mm ⁻¹
F(000)	856
결정 크기	0.40 x 0.10 x 0.08 mm ³
데이터 수집을 위한 새타 범위	1.58 내지 25.09°
인덱스 범위	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
수집된 리플렉션	6909
독립된 리플렉션	6909 [R(int) = 0.0581]
새타에 대한 완전성 = 25.09°	99.6%
흡착 보정	등가볼로부터 반-경험적
최대 및 최소 전송	0.7452 및 0.6093
산정 방법	F ² 에서 완전-매트릭스 최소 제 곱
데이터 / 제한 / 파라미터	6909 / 1 / 512
F ² 에서 조화의 적합성 (Goodness-of-fit)	1.119
최종 R 인덱스 [I>2시그마 (I)]	R1 = 0.0847, wR2 = 0.1899
R 인덱스 (모든 데이터)	R1 = 0.0963, wR2 = 0.1963
절대 구조 파라미터	0.1(2)
최대 회전 피크 및 홈	0.402 및 -0.559 e. Å ⁻³

[0482]

[0483]

실시에 31. 생물학적 활성

[0484]

레플리콘 포함 세포가 96-웰 흰색/불투명 플레이트에서 3,000개 세포/웰 (50 μ l)로, 또는 384-웰 흰색/불투명 플레이트에서 1,500개 세포/웰 (25 μ l)로 접종되었다. 50 μ l의 2X 화합물이 96 웰 플레이트에서 첨가되거나, 또는 25 μ l의 2X 화합물이 384 웰 플레이트에서 첨가되었다. 이들 플레이트는 가습된 5% CO₂ 공기에서 37°C에서 4 일 동안 배양되었다. 배양후, HCV 복제에 대한 반딧불이 루시페라아제 리포터를 측정하기 위하여, Bright-Glo 시약 (96-웰 플레이트의 경우에 50 μ l, 또는 384-웰 플레이트의 경우에 25 μ l)이 첨가되었다. 저해 퍼센트는 약물 없음 대조에 비하여 계산되었다.

[0485]

화합물 HCV 레플리콘 활성 (μ M)

[0486]

4 0.58

[0487] R_p-4 2.87

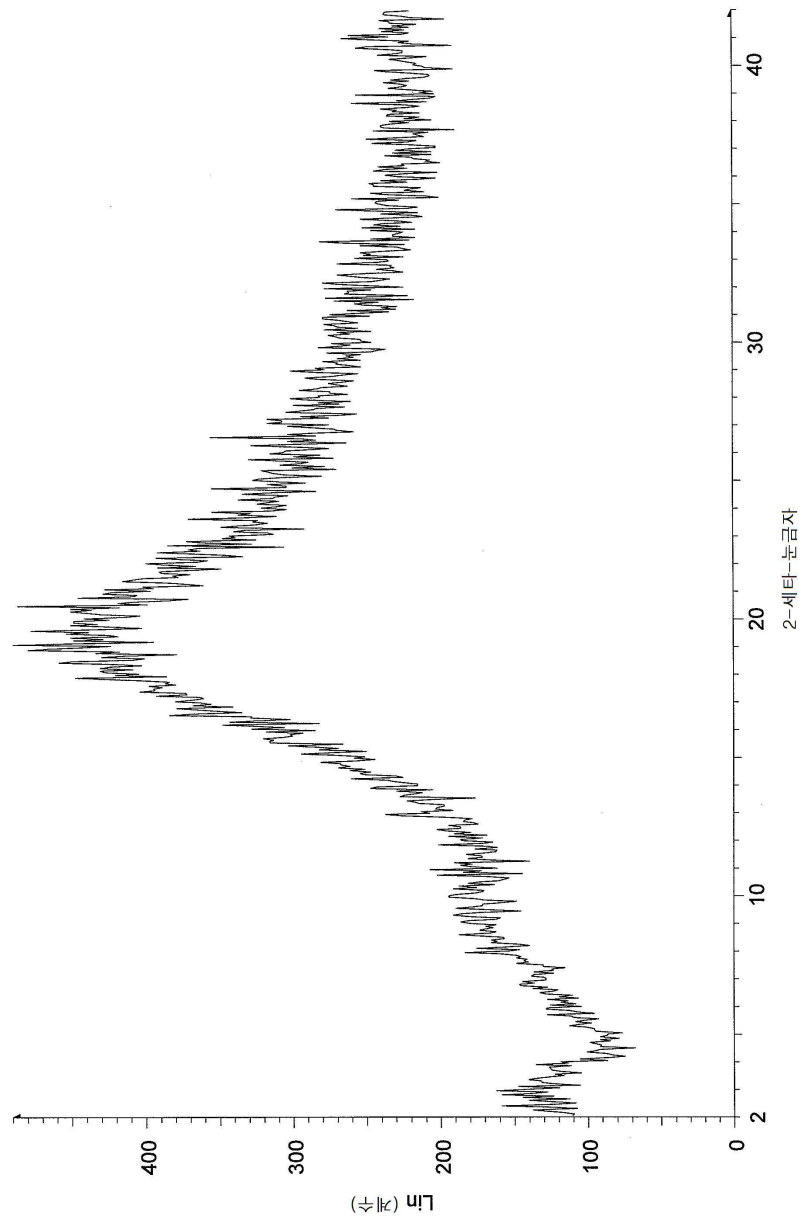
[0488] S_p-4 0.13

[0489] R_p-4 및 S_p-4 는 광범위한 유전자형 적용범위 (genotype coverage)를 갖는 것으로 증명되었다. 가령, 둘 모두 C형 간염 바이러스, 유전자형 1-4를 억제하는 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

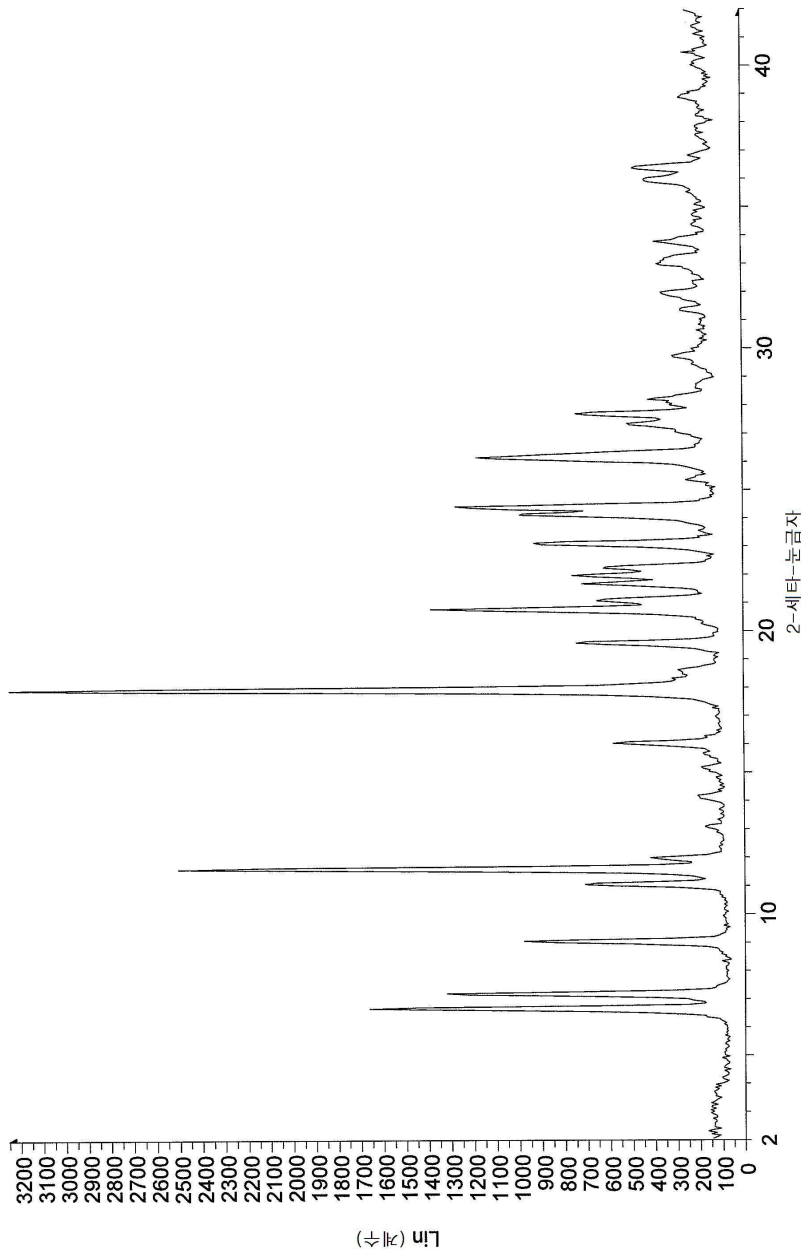
[0490] 2009년 5월 20일 제출된 U.S. 특허 출원 번호 12/053,015 및 U.S. 특허 가출원 번호 61/179,923, 그리고 2010년 3월 31일 제출된 U.S. 특허 가출원 번호 61/319,513의 요부는 본 발명에 순전히 참조로서 병합된다. 모든 인용된 참고문헌의 요부는 본 발명에 참조로서 병합된다. 병합된 용어의 의미가 본 명세서에서 정의된 용어의 의미와 충돌하는 경우에, 본 명세서에서 정의된 용어의 의미는 병합된 용어의 의미보다 우선한다.

도면

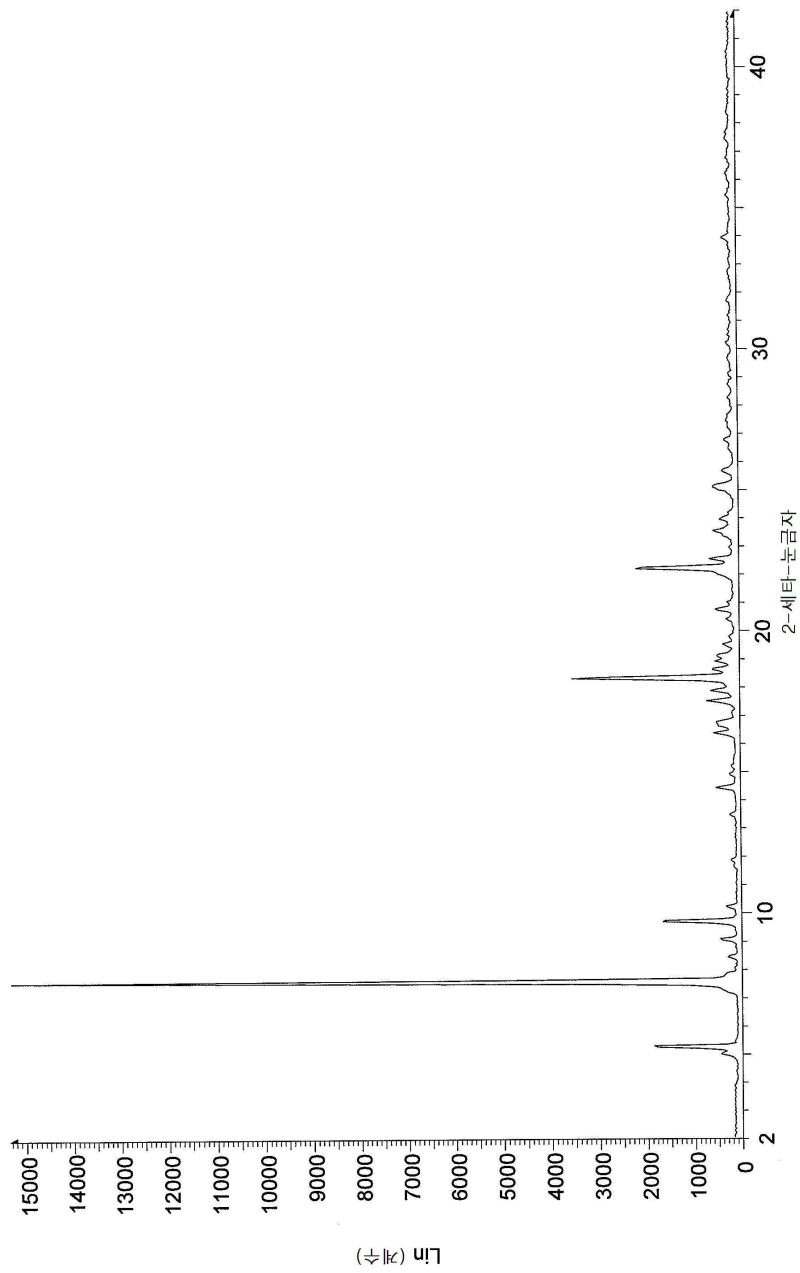
도면1



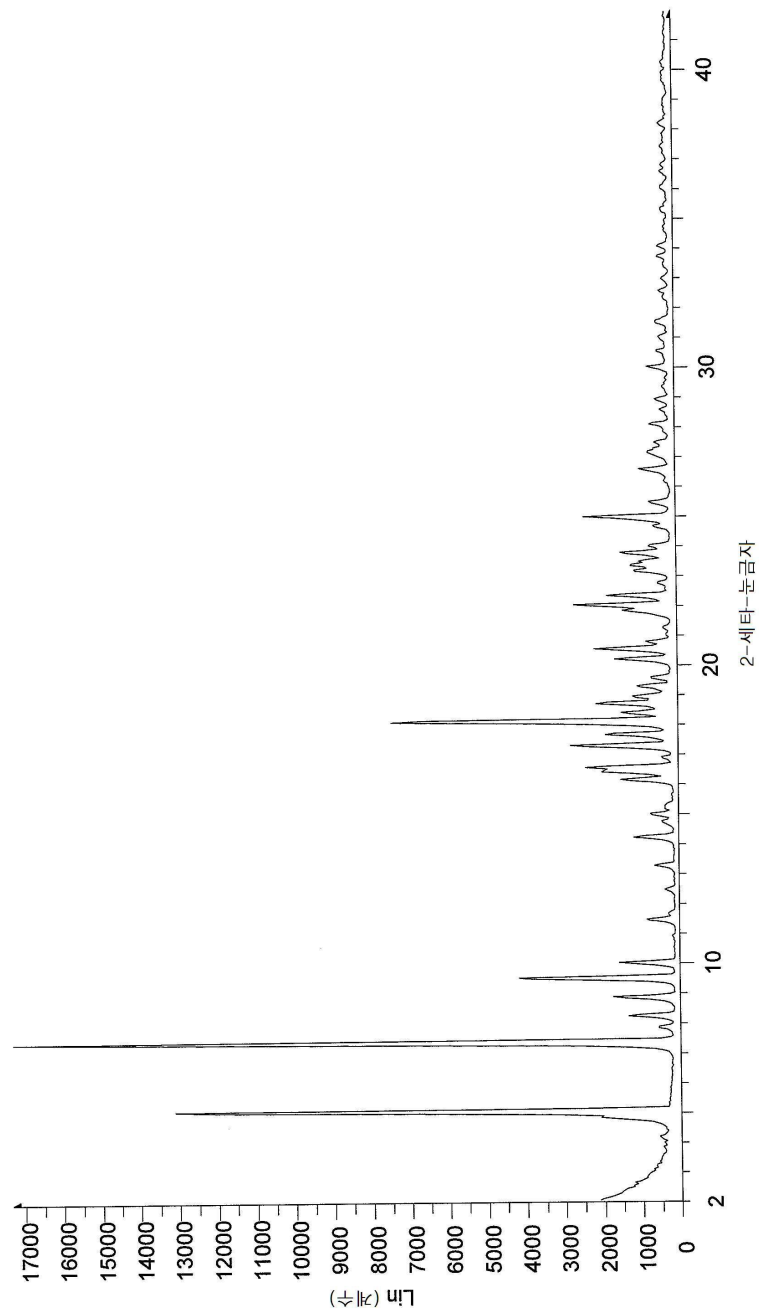
도면2



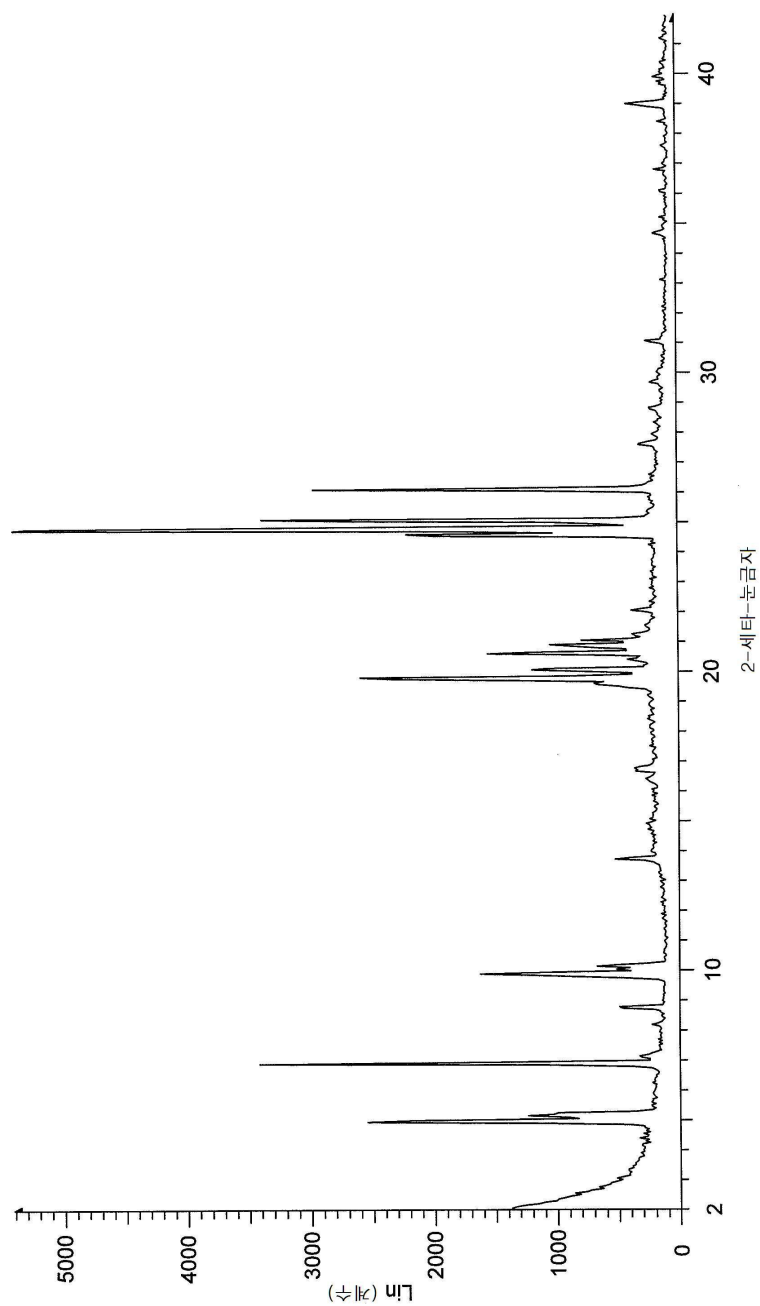
도면3



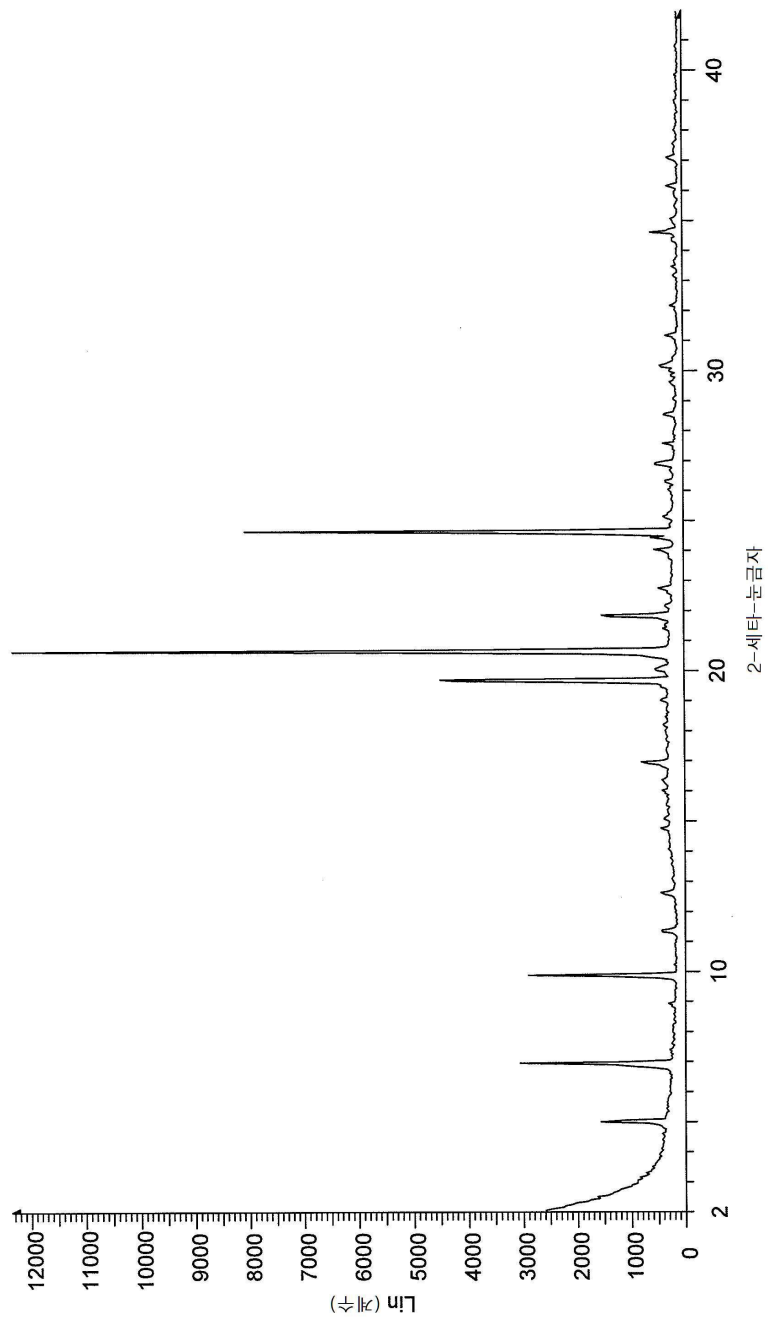
도면4



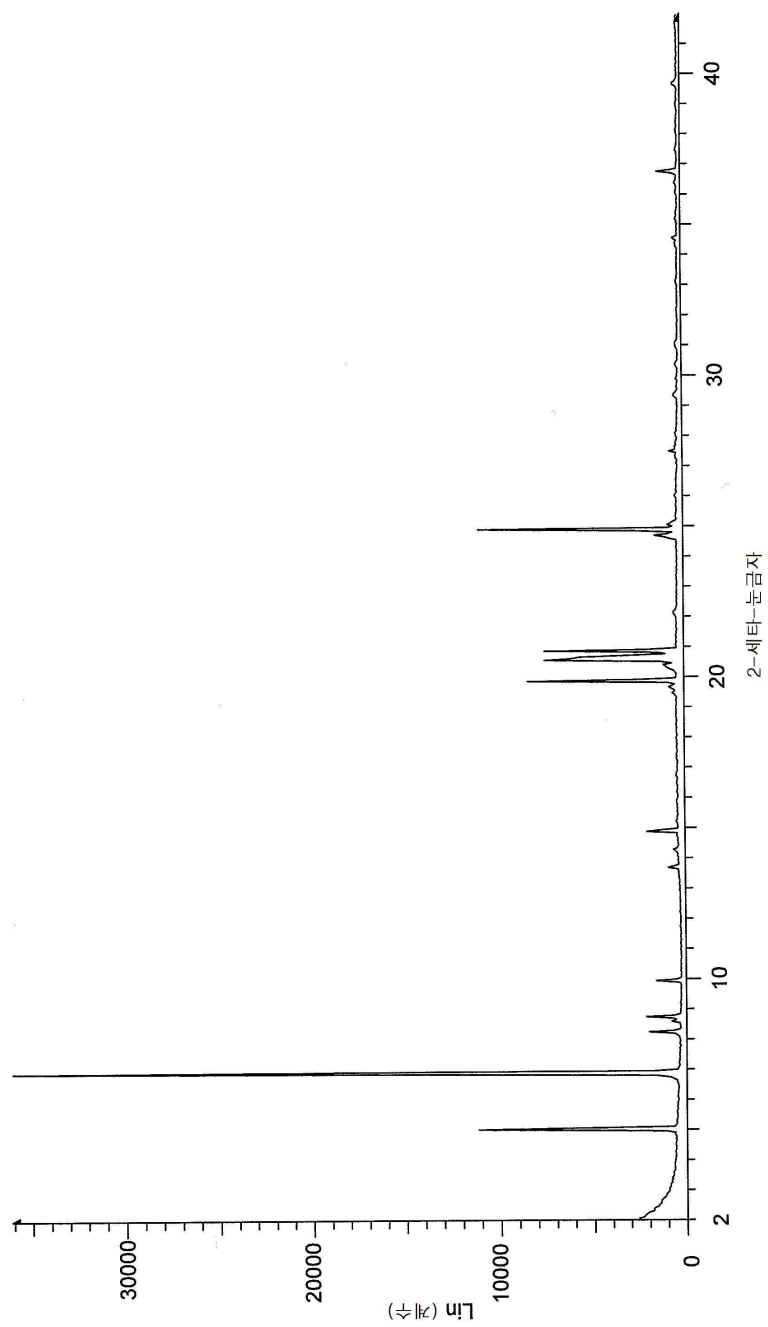
도면5



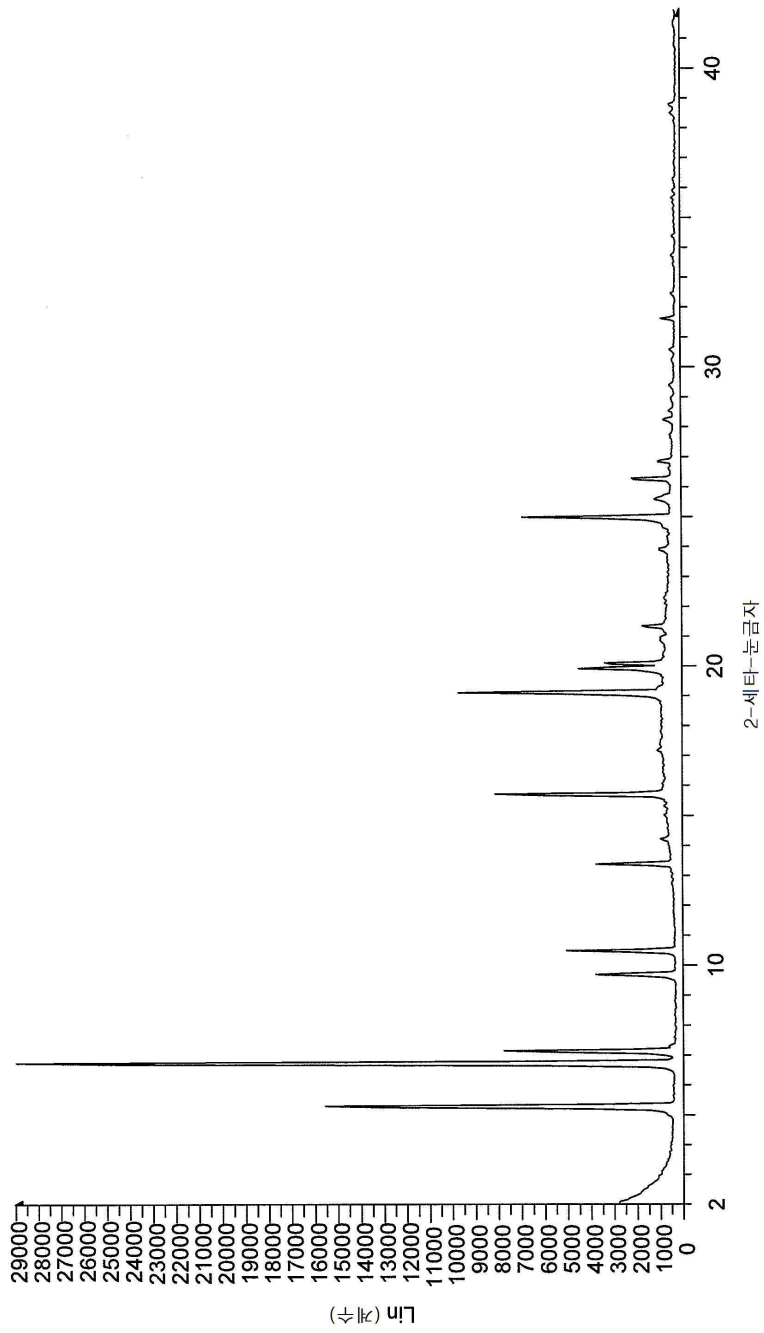
도면6



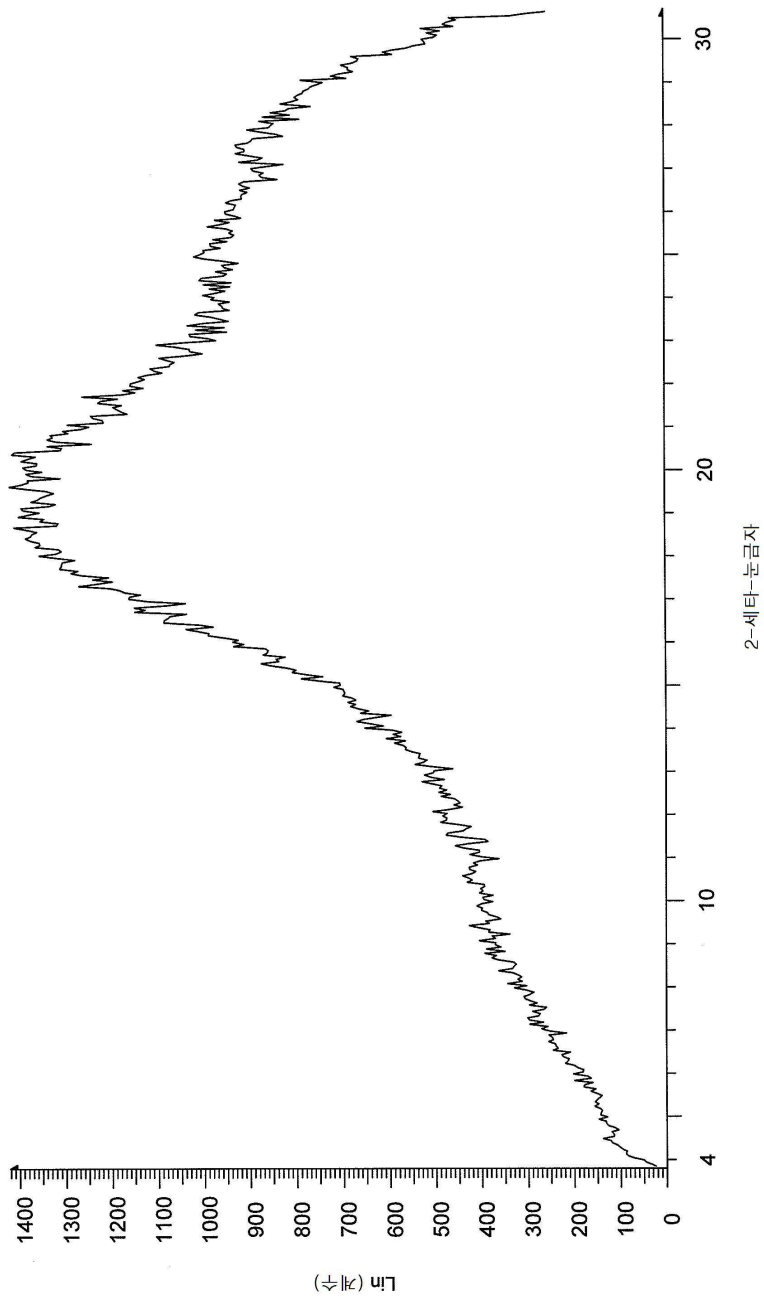
도면7



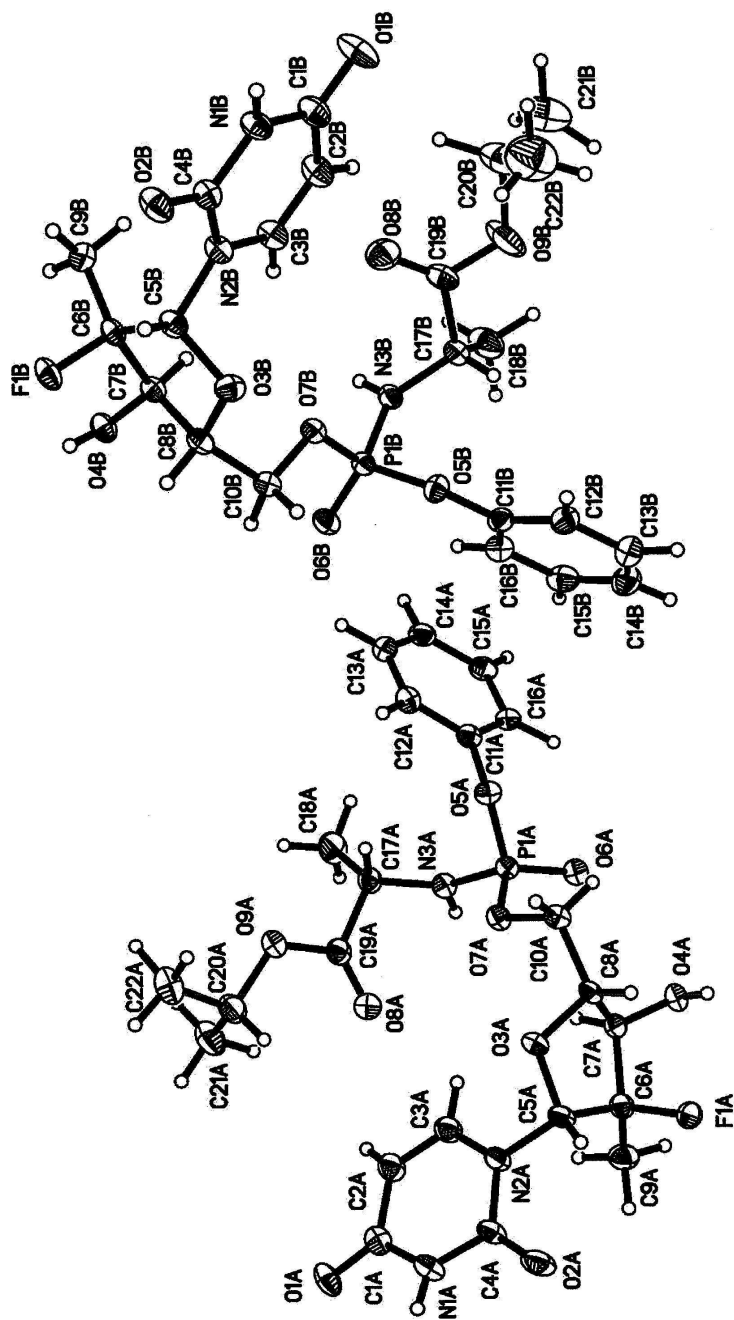
도면8



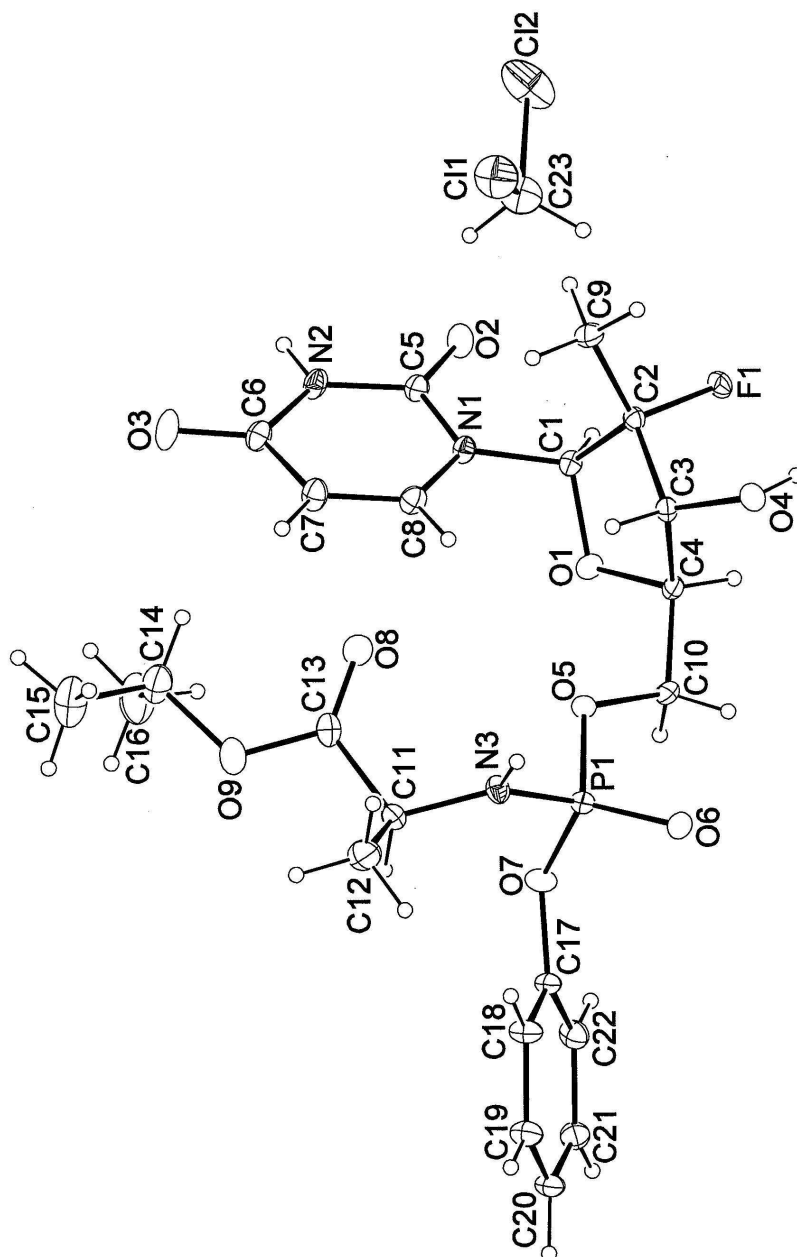
도면9



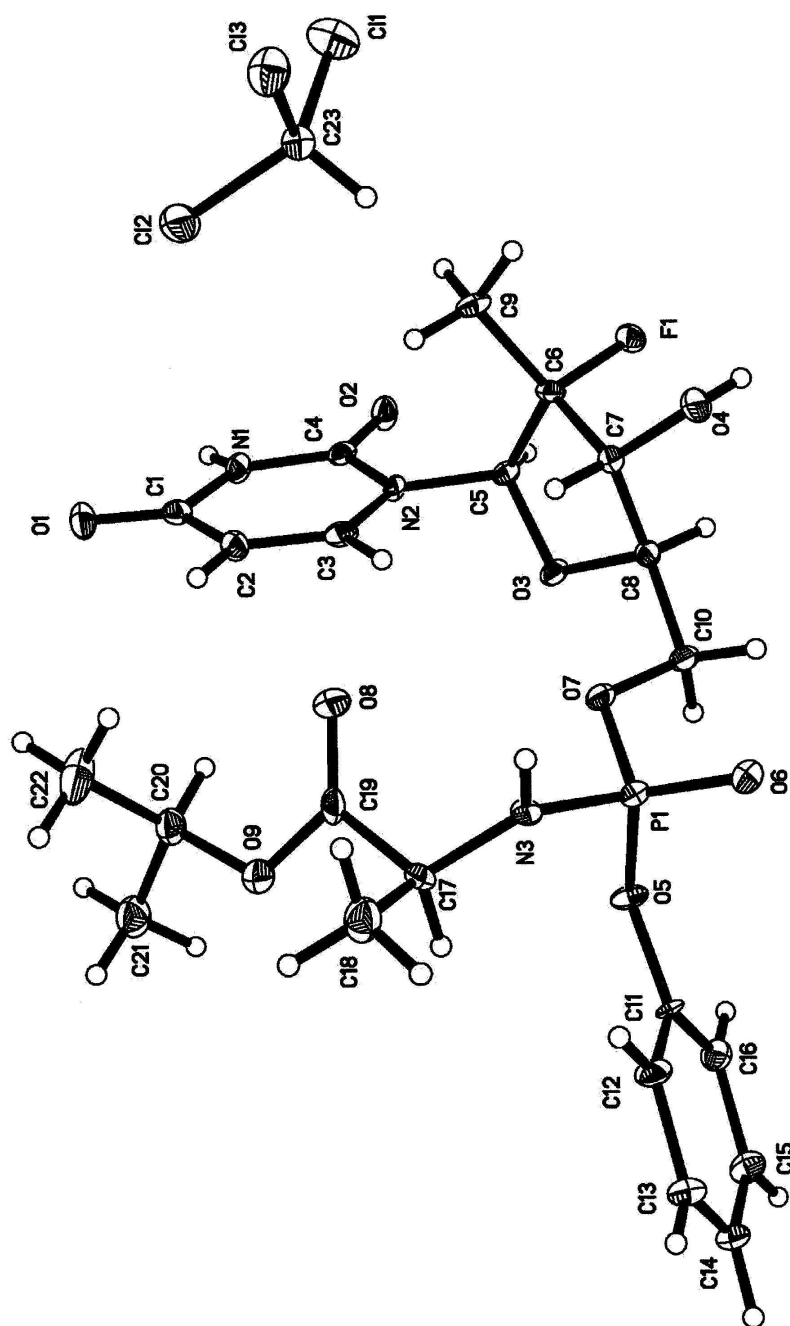
도면10



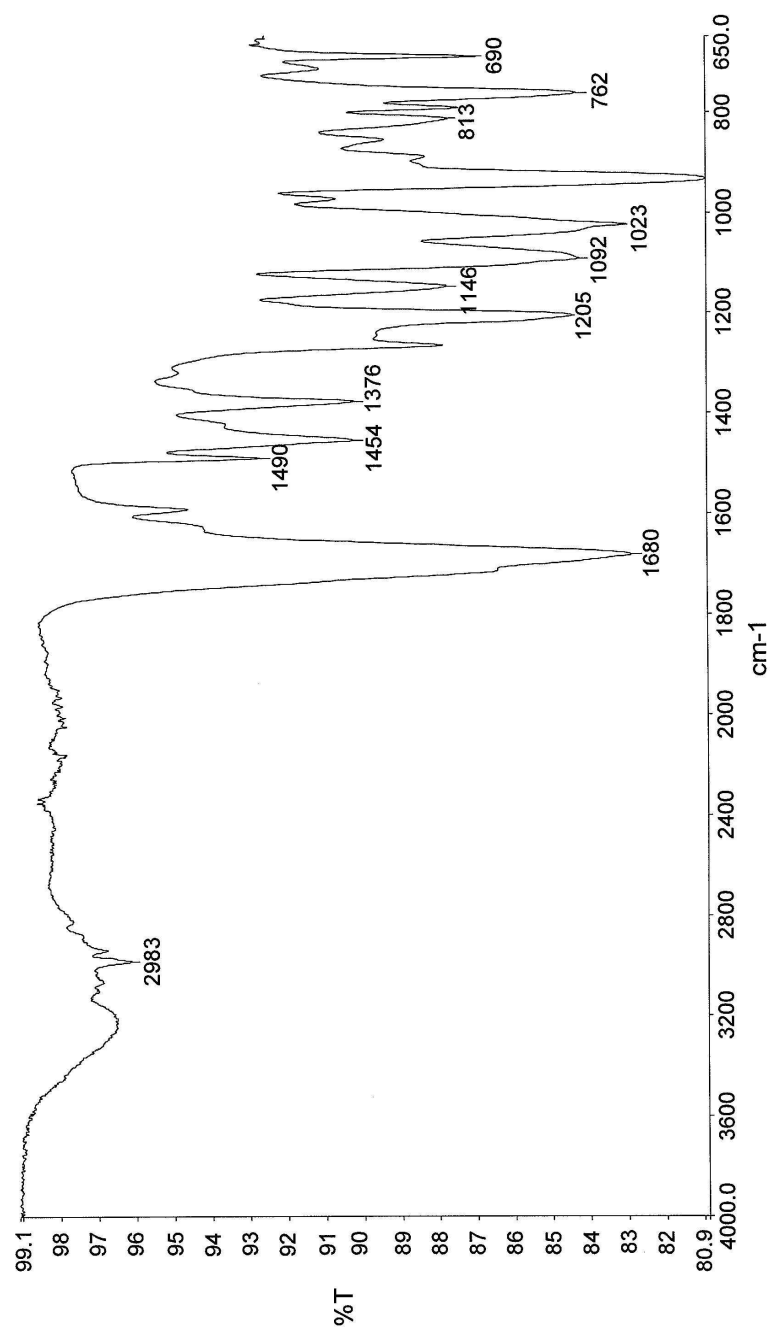
도면12



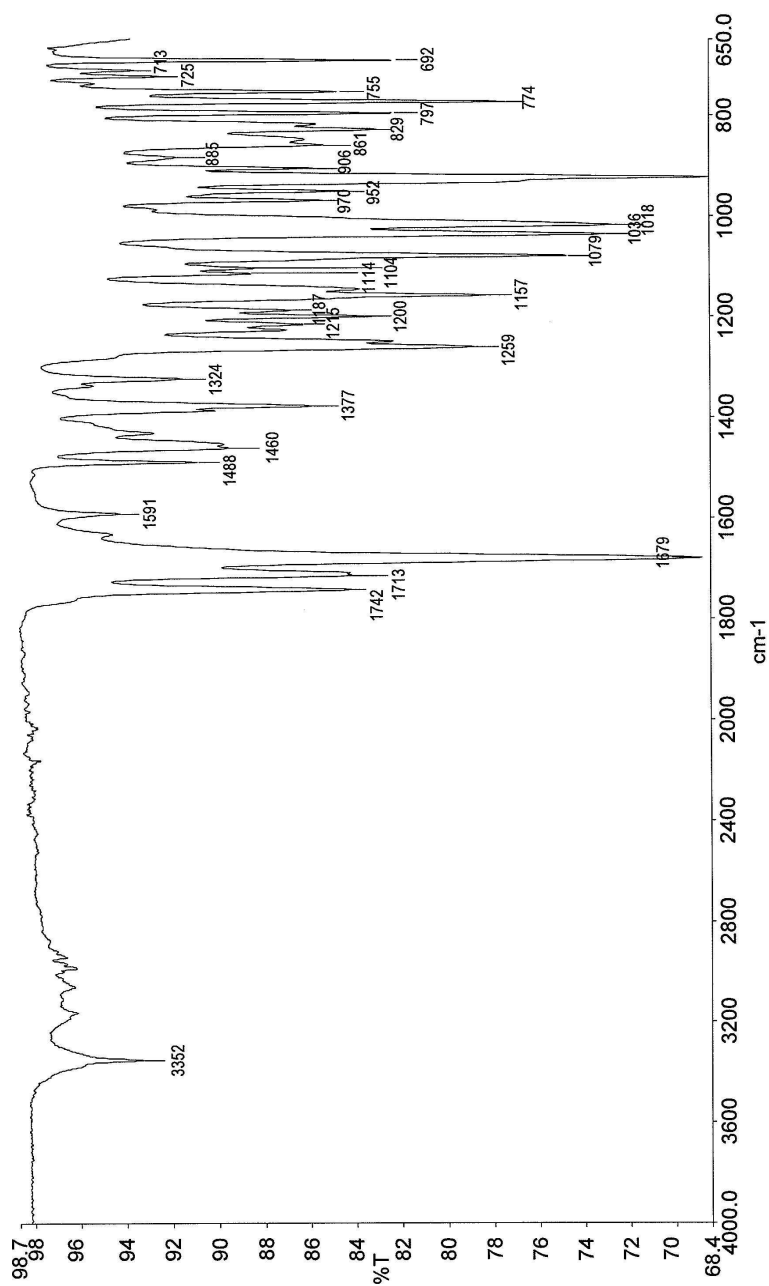
도면13



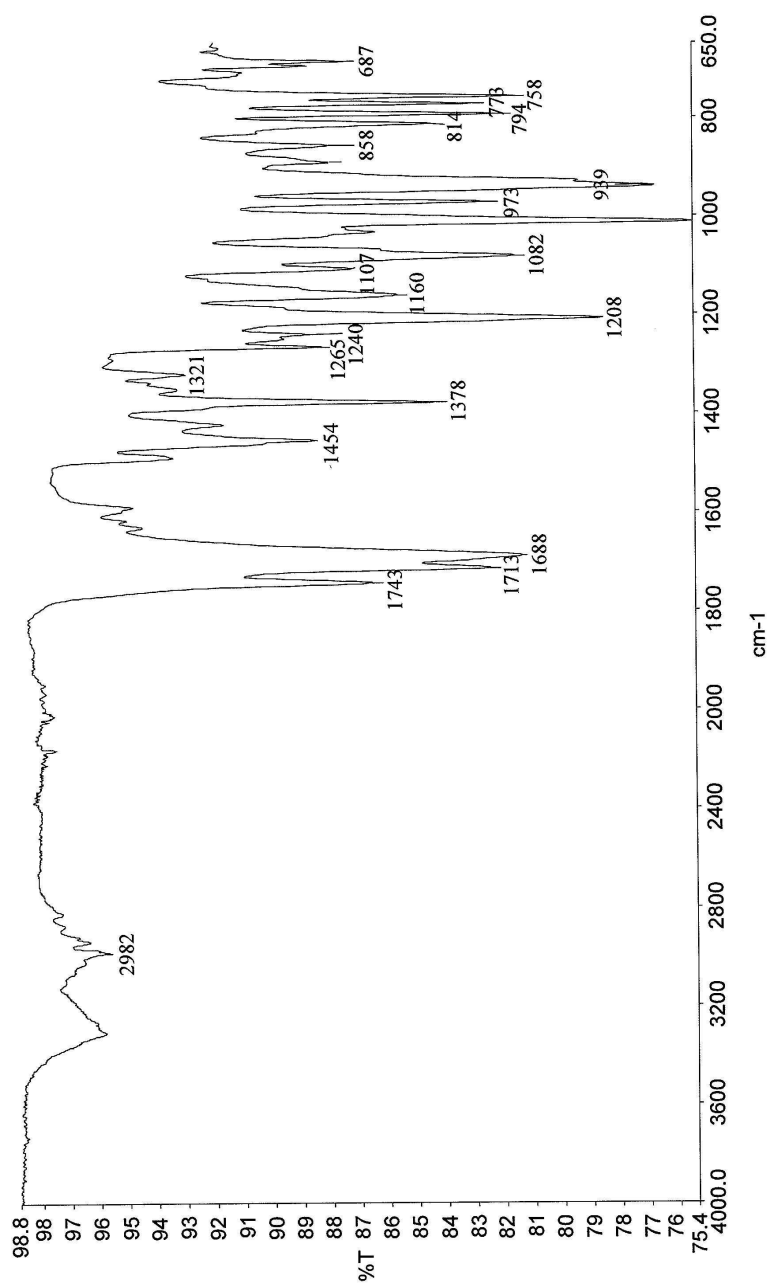
도면14



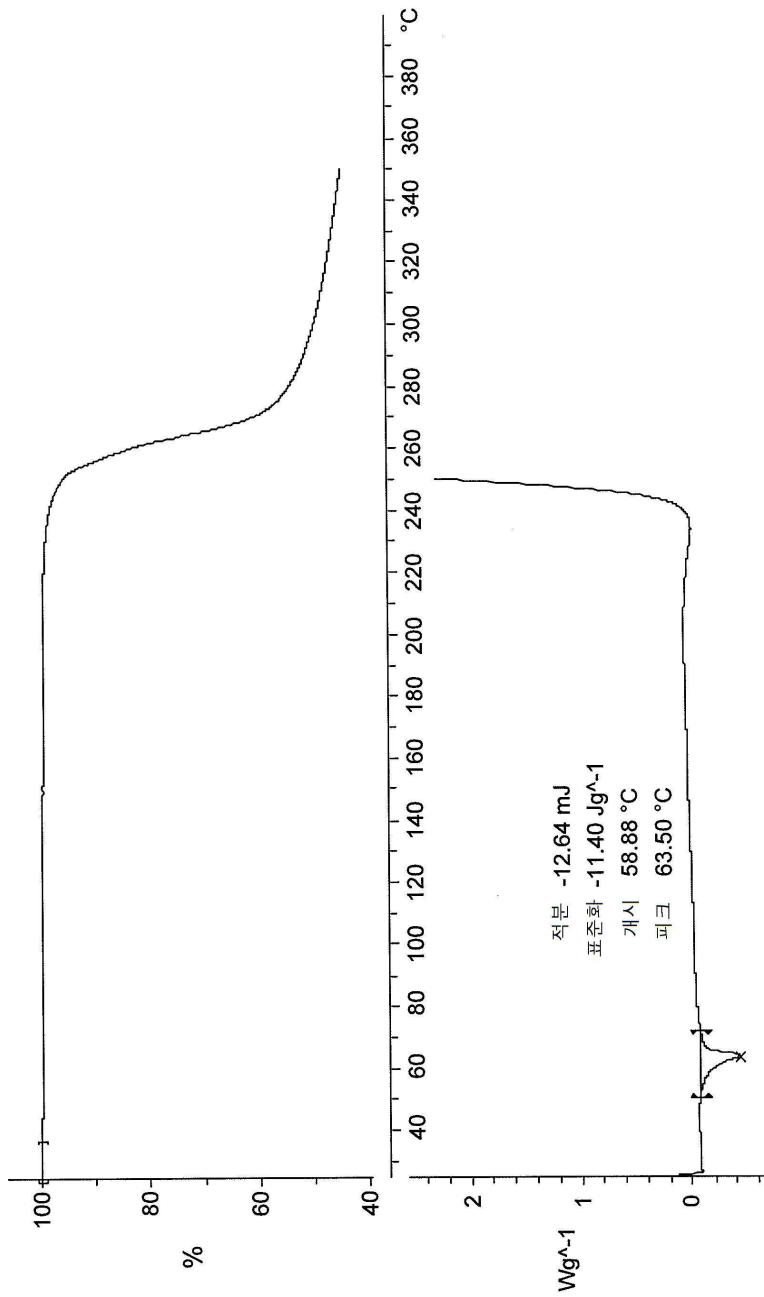
도면15



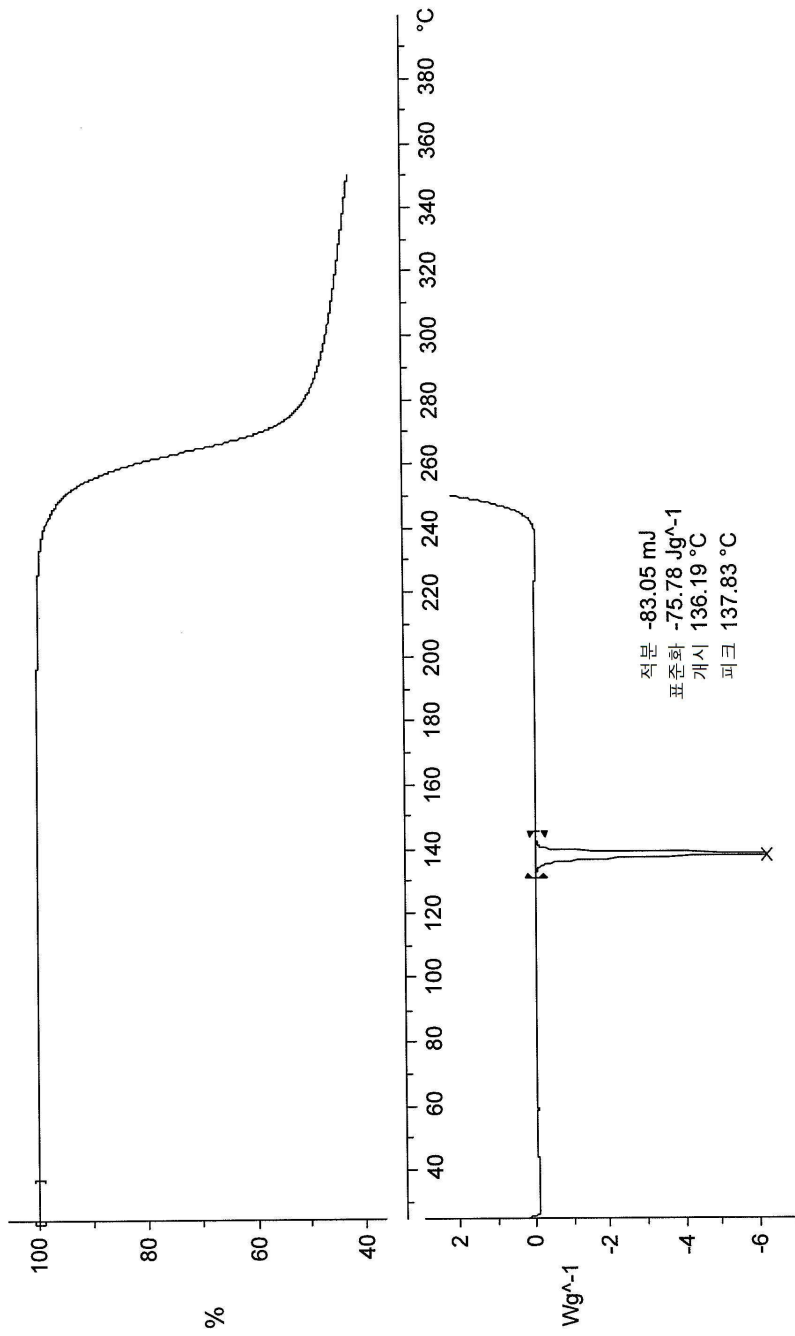
도면16



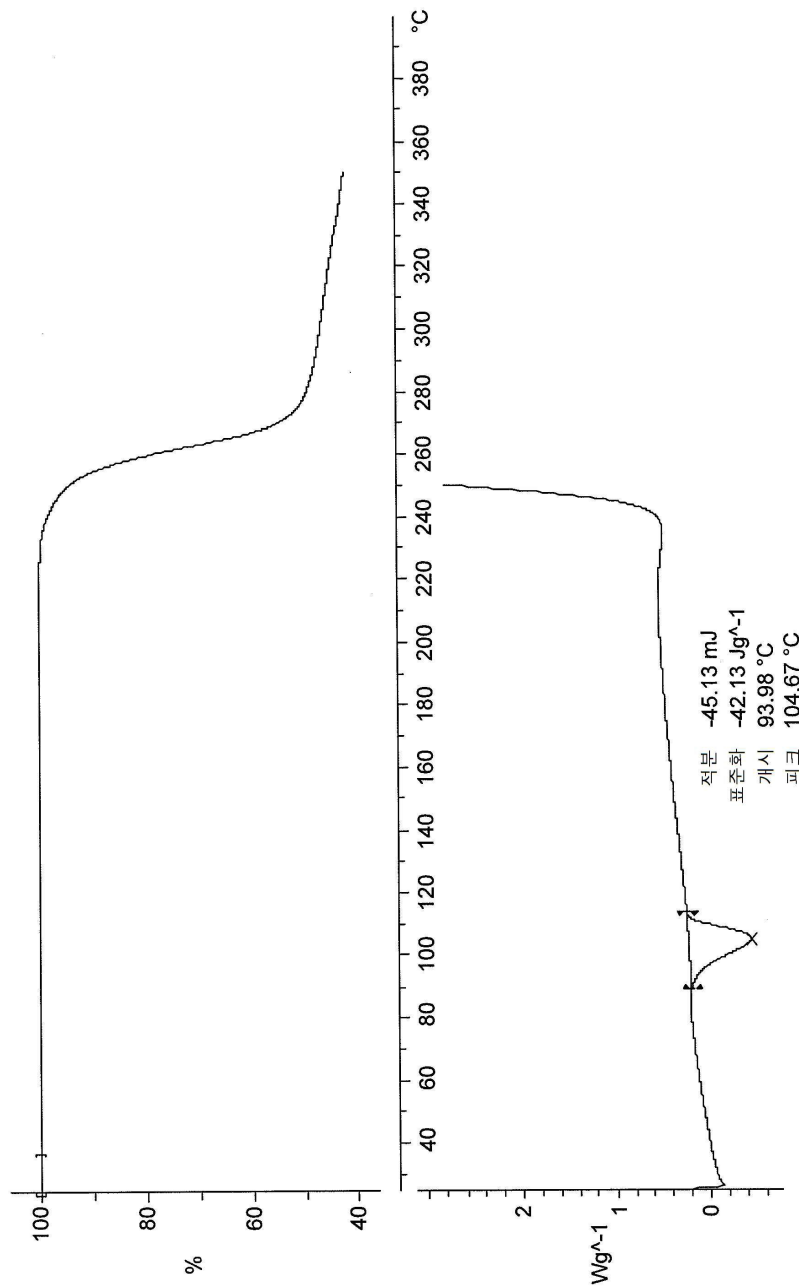
도면17



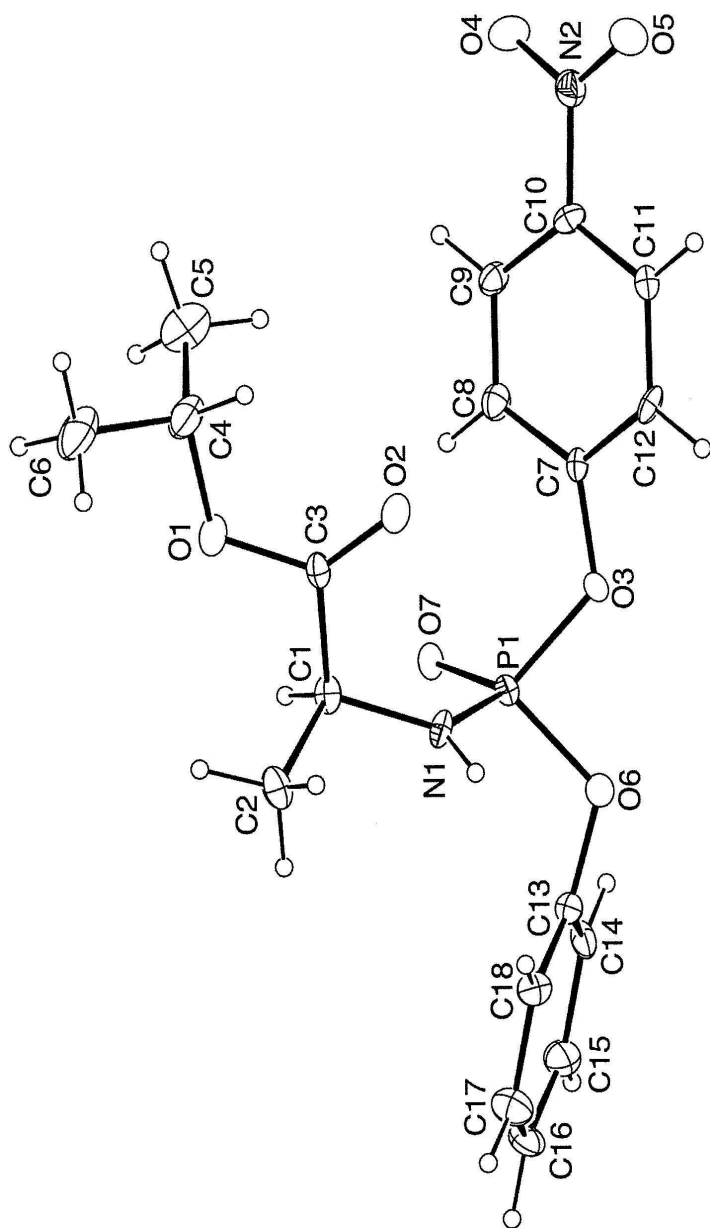
도면18



도면19



도면20a



도면20b

