

Описываемое изобретение сделано при поддержке правительства на основании гранта № AI32351, предоставленного Национальным институтом здравоохранения. Правительство США имеет определенные права на это изобретение.

Настоящее изобретение сделано в области фармацевтической химии и относится, в частности, к 2'-фторнуклеозидам, способам их получения и применения.

Предпосылки создания изобретения

Синтетические нуклеозиды, такие как 5-йод-2'-дезоксиуридин и 5-фтор-2'-дезоксиуридин, в течение ряда лет использовались для лечения рака и вирусов герпеса. В 1980-х годах синтетические нуклеозиды привлекли к себе особое внимание в связи с возможностью их применения для лечения вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитов и вируса Эпштейна-Барра.

В 1981 г. было установлено, что синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) является заболеванием, которое серьезно поражает иммунную систему человека и почти без исключения ведет к смерти. В 1983 г было обнаружено, что этиологической причиной возникновения СПИДа является вирус иммунодефицита человека. В 1985 г. появилась информация о том, что синтетический нуклеозид 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT) подавляет репликацию вируса иммунодефицита человека. С тех пор был открыт ряд других синтетических нуклеозидов, в том числе 2',3'-дидезоксиинозин (DDI), 2',3'-дидезоксицитидин (DDC) и 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин (D4T), которые эффективно воздействуют на ВИЧ. Синтетические нуклеозиды фосфорилируются в клетке под действием клеточных киназ с образованием 5'-трифосфата и встраиваются в растущую цепь вирусной ДНК, прекращая рост цепи из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы. Они могут также ингибировать обратную транскриптазу фермента вируса.

Успешное применение разных синтетических нуклеозидов для подавления репликации ВИЧ *in vivo* или *in vitro* заставило многих исследователей направить усилия на создание и испытание нуклеозидов, в которых атом углерода замещен гетероатомом в 3'-положении нуклеозида. В публикации заявки на европейский патент № 0337713 и в патенте США № 5041449, выданных BioChem Pharma, Inc., описаны рацемические 2-замещенные-4-замещенные-1,3-диоксоланы, обладающие антивирусным действием. В патенте США № 5047407 и в заявке на европейский патент № 0382526, выданных также BioChem Pharma, Inc., указано, что ряд нуклеозидов, таких как рацемический 2-замещенный-5-замещенный 1,3-оксатиолан, обладают антивирусной активностью, и особо подчеркнуто, что рацемическая смесь 2-гидроксиметил-5-(цитозин-1-ил)-1,3-оксатиолана (именуемого ниже BCH-189) обладает такой же активностью против ВИЧ, что и AZT, при незначительной токсичности. (-)-Этантимер рацемата BCH-189, известный как 3TC, который описан в патенте США № 5539116, выданном Liotta et al., в настоящее время продается в США как средство для лечения ВИЧ в сочетании с AZT.

Кроме того, известно, что цис-2-гидроксиметил-5-(5-фтороцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан ("FTC") обладает сильным действием против ВИЧ. Schinazi, et al. "Selective Inhibition of Human Immunodeficiency viruses by Racemates and Enantiomers of *cis*-5-Fluoro-1-[2-(Hydroxymethyl)-1,3-Oxathiolane-5-yl] Cytosine", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, November 1992, pp. 2423-2431. См. также патент США № 5210085; WO 91/11186 и WO 92/14743.

Другим вирусом, который создает серьезную опасность для здоровья человека, является вирус гепатита В (далее именуется "HBV"). HBV является второй по значимости причиной возникновения рака у человека после табака. Механизм возникновения рака под действием HBV неизвестен. Считается, что он может быть прямым или косвенным фактором образования опухоли вследствие хронического воспалительного процесса, цирроза и регенерации клеток, обусловленной этой инфекционной болезнью.

После 2-6-месячного инкубационного периода, в течение которого носитель инфекции не подозревает о существовании опухоли, HBV вызывает острый гепатит и поражение печени, сопровождающееся болями в животе, желтухой и повышенным содержанием в крови определенных ферментов. HBV может вызывать молниеносный гепатит часто с летальным исходом, при котором разрушаются значительные участки печени.

Пациенты обычно выздоравливают после острого гепатита. Однако у некоторых пациентов высокие концентрации вирусного антигена сохраняются в крови в течение продолжительного периода времени, являясь причиной возникновения хронического заболевания. Хронические инфекции могут быть причиной хронического персистирующего гепатита. Пациенты, страдающие хроническим персистирующим HBV, особенно часто встречаются в развивающихся странах. К середине 1991 г. только в Азии насчитывалось примерно 225 млн хронических носителей HBV, а во всем мире их число составляло почти 300 млн. Хронический персистирующий гепатит может вызывать утомление, цирроз печени и злокачественную гепатому, основной тип рака печени.

В промышленно развитых странах Запада к группам населения с высокой степенью риска заражения HBV относятся носители этого вируса или их кровь. Эпидемиология HBV очень схожа с синдромом приобретенного иммунодефицита и позволяет объяснить тот факт, что заражение HBV широко распространено среди ВИЧ-инфицированных пациентов или больных СПИДом. Однако HBV является более заразным, чем ВИЧ.

Как FTC, так и 3TC воздействуют на HBV. Furman, et al., "The Anti-Hepatitis B Virus Activities, Cyto-

toxicities, and Anabolic Profiles of the (-) and (+) Enantiomers of cis-5-Flouro-1-[2-(Hydroxymethyl)-1,3-oxathiolane-5-yl]-Cytosine" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, December 1992, pp. 2686-2692; и Cheng, et al. Journal of Biological Chemistry, vol. 267(20), pp. 13938-13942 (1992).

Из сыворотки человека получена вакцина для иммунизации пациентов против HBV. Хотя эта вакцина признана эффективной, ее производство является трудоемким процессом из-за ограниченного количества сыворотки, предоставляемого хроническими носителями, при этом процедура очистки является длительной и дорогостоящей. Кроме того, каждую партию вакцины, полученной из другой сыворотки, необходимо испытывать на шимпанзе, чтобы удостовериться в ее безопасности. Вакцины были также получены генноинженерными методами. Ежедневный прием α -интерферона, генетически сконструированного методом генной инженерии, также является многообещающим.

Вирус гепатита С ("HCV") является основной причиной посттрансфузии и поражения спорадическим гепатитом, не являющимся гепатитом А или В (Alter, H.J. (1990) J. Gastro. Hepatol, 1:78-94, Dienstag, J.L. (1983) Castro 85: 439-462). Несмотря на всестороннее обследование населения, на долю HCV по-прежнему приходится по крайней мере 25% случаев острого вирусного гепатита во многих странах (Alter, H.J. (1990) см. выше; Dienstag, J.L. (1983) см. выше; Alter M.J. et al. (1990a) J.A.M.A. 264:2231-2235; Alter M.J. et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327:1899-1905; Alter, M.J. et al. (1990b) N. Engl. J. Med. 321:1494-1500). Поражение HCV протекает без явных симптомов у большого количества хронически инфицированных (и контакто-зародных) носителей, у которых клинические симптомы не проявляются в течение многих лет. Высокий коэффициент перехода острой формы инфекционного заболевания в хроническую (70-100%) и в болезнь печени ($>50\%$), распространение по всему миру и отсутствие вакцины - все это делает HCV серьезной причиной заболеваемости и смертности.

Опухоль представляет собой неупорядоченную, дезорганизованную пролиферацию растущих клеток. Опухоль считается злокачественной или раковой, если ее отличают инвазивность и метастазы. Инвазивность - это способность опухоли внедряться в окружающие ткани, проникая через тонкие слои, определяющие границы тканей, и таким образом попадать в систему кровообращения. Метастазы - это способность опухоли мигрировать в другие области тела и вызывать пролиферацию клеток на расстоянии от места первоначального появления опухоли.

Рак в настоящее время является второй по значимости причиной смертности в США. Более чем у 8 млн чел. в США был диагностирован рак, и предполагается, что в 1994 г. он будет обнаружен еще у 1 млн 208 тыс. чел. Более 500 тыс. чел. ежегодно умирают в США от этой болезни.

На молекулярном уровне природа рака не совсем ясна. Известно, что воздействие на клетку канцерогена, такого как некоторые вирусы, химические вещества или облучение, вызывает изменение ДНК, подавляющее "супрессивный" ген или активирующее "онкоген". Супрессивные гены регулируют рост клетки, но в результате мутации они перестают выполнять эту функцию. Онкогены первоначально являются нормальными генами (именуемыми проонкогенами), которые в результате мутации или изменения условий экспрессии превращаются в трансформирующие гены. Продукты трансформирующих генов вызывают неконтролируемый рост клеток. Более 20 различных нормальных клеточных генов могут стать онкогенами вследствие генетического изменения. Трансформированные клетки отличаются от нормальных клеток во многих отношениях, включая морфологию клетки, взаимодействие между клетками, содержимое мембранны, цитоскелетную структуру, секрецию белка, экспрессию и гибель гена (трансформированные клетки могут расти бесконечно).

Практически все типы клеток в организме могут быть трансформированы в клетки доброкачественной или злокачественной опухоли. Наиболее часто опухоли поражают легкие, затем толстую и прямую кишку, молочную железу, предстательную железу, мочевой пузырь, поджелудочную железу и яичники. Другими преобладающими типами рака являются лейкоз, рак центральной нервной системы, в том числе рак мозга, меланома, лимфома, эритролейкоз, рак матки и рак головы и шеи.

В настоящее время рак лечат одним или несколькими методами трехкомпонентной терапии: хирургическое вмешательство, облучение и химиотерапия. В результате хирургического вмешательства удаляют основную массу пораженной ткани. Хотя хирургическое вмешательство иногда позволяет эффективно удалять опухоли, расположенные в определенных местах, таких как молочная железа, толстая кишка и кожа, этот метод нельзя использовать для лечения опухолей, расположенных в других местах, таких как позвоночник; он также не подходит для лечения диссеминированных состояний неоплазии, таких как лейкоз.

Химиотерапия направлена на прекращение репликации или метаболизма клеток. Этот метод чаще всего используют для лечения лейкоза, а также рака груди, легкого и яичек.

В настоящее время для лечения рака используют химиотерапевтические средства пяти основных классов: природные продукты и их производные; антациклины; алкилирующие средства; антипролиферативные средства (именуемые также антиметаболитами) и гормональные средства. Химиотерапевтические средства часто именуются противоопухолевыми средствами.

Считается, что алкилирующие средства алкилируют и сшивают гуанин и, вероятно, другие основания в ДНК, прекращая деление клеток. Типичными алкилирующими средствами являются азотсодержащие дихлордиэтилсульфиды, соединения этиленимина, алкилсульфаты, цисплатин и разные нитрозомо-

чевины. Недостатком этих соединений является то, что они проникают не только в злокачественные клетки, но и в здоровые клетки, которые находятся в процессе естественного деления, например в клетки костного мозга, кожи, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и эмбриональной ткани.

Антиметаболиты обычно являются обратимо или необратимо действующими ингибиторами ферментов либо соединениями, которые другим образом препятствуют репликации, трансляции или транскрипции нуклеиновых кислот.

Получено несколько синтетических нуклеозидов, обладающих противораковым действием. Хорошо известным производным нуклеозида, оказывающим сильное противораковое действие, является 5-фторурацил. 5-Фторурацил используется в клинической практике для лечения злокачественных опухолей, включая, например, карциномы, саркомы, рака кожи, рака органов пищеварения и рака молочной железы. Однако 5-фторурацил вызывает серьезные побочные эффекты, такие как тошнота, алопеция, диарея, стоматит, лейкоцитарная тромбоцитопения, анорексия, пигментация и отек. Производные 5-фторурацила, обладающие противораковым действием, описаны в патенте США № 4336381 и в публикациях патентов Японии №№ 50-50383, 50-50384, 50-64281, 51-146482 и 53-84981.

В патенте США № 4000137 указано, что продукт перокисления инозина, аденоцина или цитидина метанолом или этанолом обладает активностью против лимфолейкоза.

Цитозинарабинозид (именуемый также цитарабин, агаС и цитозар) является нуклеозидным аналогом дезоксицитидина, который был впервые синтезирован в 1950 г. и введен в клиническую практику в 1963 г. В настоящее время он является важным лекарственным средством, применяемым для лечения острой формы миелоидного лейкоза. Кроме того, это лекарственное средство позволяет эффективно лечить острую форму лимфолейкоза, и в меньшей степени он воздействует на хроническую форму миелоцитарного лейкоза и лимфому, не являющуюся лимфомой Ходжкинса. Основным действием агаС является ингибирование синтеза ядерной ДНК. Handschumacher, R. and Cheng, Y., "Purine and Pyrimidine Antimetabolites", Cancer Medicine, Chapter XV-1, 3rd Edition, Edited by J. Holland, et al., издатели Lea and Febigol.

5-Азацитидин является аналогом цитидина, который в основном используют для лечения острой формы миелоцитарного лейкоза и синдрома миелодисплазии.

2-Фтораденозин-5'-фосфат (флудара, именуемый также F-агаА) является одним из наиболее активных средств, предназначенных для лечения хронической формы лимфоцитарного лейкоза. Это соединение ингибирует синтез ДНК. Воздействие на клетки, оказываемое F-агаА, связано с накоплением клеток на границе фаз G1/S и в фазе S; таким образом, это лекарственное средство специфически воздействует на фазу S цикла развития клетки. Введение активного метаболита F-агаАТР замедляет удлинение цепи ДНК. F-агаА является также сильнодействующим ингибитором рибонуклеотид-редуктазы, ключевого фермента, ответственного за образование dATP.

2-Хлордезоксиаденозин является эффективным средством для лечения новообразований В-клеток на начальной стадии, таких как хроническая форма лимфолейкоза, лимфома, не являющаяся лимфомой Ходжкинса, и волосато-клеточный лейкоз.

В процессе создания новых биологически активных нуклеозидов было предпринято несколько попыток ввести фторсодержащий заместитель в углеводное кольцо нуклеозида. Фтор был предложен в качестве заместителя, потому что он может быть изополярным и изостерическим имитатором гидроксильной группы, так как длина связи C-F (1,35 Å) аналогична длине связи C-O (1,43 Å), и фтор является акцептором водородной связи. Фтор способен вызывать значительные электронные изменения в молекуле при минимальных пространственных деформациях. Замещение фтором другой группы в молекуле может вызывать изменения в метаболизме субстрата из-за высокой прочности связи C-F (116 ккал/моль по сравнению с C-H=100 ккал/моль).

В ряде справочных материалов был описан синтез и применение 2'-арабинофторнуклеозидов (нуклеозидов, в которых 2'-фторогруппа имеет "верхнюю" конфигурацию, т.е. вверх от плоскости кольца). В нескольких научных работах были описаны 2-фтор-β-D-арабинофuranозилнуклеозиды, обладающие активностью против гепатита В и герпеса. См., например, патент США № 4666892, выданный Fox, et al.; патент США № 4211773, выданный Lopez, et al.; Su, et al. Nucleosides. 136, "Synthesis and Antiviral Effects of Several 1-(2-Deoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-alkyluracils." "Some Structure-Activity Relationships," J. Med. Chem., 1986, 29, 151-154; Borthwick, et al. "Synthesis and Enzymatic Resolution of Carbocyclic 2'-Ara-fluoro-Guanosine: A Potent New Anti-Herpetic Agent," J. Chem., Soc., Chem. Commun, 1988; Wantanabe, et al. "Synthesis and Anti-HIV Activity of 2'-"Up"-Fluoro Analogues of Active Anti-Aids Nucleosides 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) and 2',3'-dideoxycytidine (DDC)," J. Med. Chem. 1990, 33, 2145-2150; Martin, et al. "Synthesis and Antiviral Activity of Monofluoro and Difluoro Analogues of Pyrimidine Deoxyribonucleosides against Human Immunodeficiency Virus (HIV-1)," J. Med. Chem. 1990, 33, 2137-2145; Sterzycki, et al. "Synthesis and Anti-HIV Activity of Several 2'-Fluoro-Containing Pyrimidine Nucleosides," J. Med. Chem. 1990, а также заявку на европейский патент № 0316017, которая также была подана Sterzycki, et al.; и Montgomery, et al. "9-(2-Deoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)guanine: A Metabolically Stable Cytotoxic Analogue of 2'-Deoxyguanosine." В патенте США № 5246924 описан способ лечения инфекционного гепатита, ко-

торый включает введение 1-(2'-дезокси-2'-фтор- β -D-арабинофуранозил)-3-этилурацила, именуемого также "FEAU". В патенте США № 5034518 описаны 2-фтор-9-(2-дезокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)адениннуклеозиды, которые обладают противораковым действием, выражающимся в изменении метаболизма адениннуклеозидов, в результате чего это соединение утрачивает способность быть субстратом для аденоцина. В заявке на европейский патент № 0292023 раскрыты конкретные β -D-2'-фторарабинонуклеозиды, обладающие активностью против вирусных инфекций.

В патенте США № 5128458 описаны β -D-2',3'-дидезокси-4'-тиорибонуклеозиды в качестве антивирусных средств. В патенте США № 5446029 указано, что 2',3'-дидезокси-3'-фторнуклеозиды имеют активность против гепатита.

В заявке на европейский патент № 0409227 A2 описаны конкретные 3'-замещенные β -D-пиrimидин- и пурииннуклеозиды для лечения гепатита В.

Кроме того, указано, что L-FMAU (2'-фтор-5-метил- β -L-арабинофуранозилурацил) является сильнодействующим средством против HBV и EBV. См., Chu, et al. "Use of 2'-Fluoro-5-methyl- β -L-arabinofuranosyluracil as a Novel Antiviral Agent for Hepatitis B Virus and Epstein-Barr Virus" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, April 1995, pp. 979-981; Balakrishna, et al. "Inhibition of Hepatitis B Virus by Novel L-Nucleoside, 2'-Fluoro-5-Methyl- β -L-arabinofuranosyl Uracil", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Feb 1996, pp. 380-356; патенты США №№ 5587362; 5567688 и 5565438.

В патентах США №№ 5426183 и 5424416 описаны способы получения 2'-дезокси-2',2'-дифторнуклеозидов и 2'-дезокси-2'-фторнуклеозидов. См. также "Kinetic Studies of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with Purified Human Deoxycytidine Kinase and Cytidine Deaminase", Biochemical Pharmacology, vol. 45 (№ 9), pp. 4857-1861, 1993.

В патенте США № 5446029, выданном Eriksson, et al., указано, что конкретные 2',3'-дидезокси-3'-фторнуклеозиды обладают активностью против гепатита В. В патенте США № 5128458 описаны конкретные 2',3'-дидезокси-4'-тиорибонуклеозиды, в которых 3'-заместитель является Н, азидом или фтором. В заявке WO 94/14831 описаны конкретные 3'-фтордигидропиридин-нуклеозиды, в заявке WO 92/08727 - β -L-2'-дезокси-3'-фтор-5'-замещенные уридиннуклеозиды, предназначенные для лечения простого герпеса 1 и 2.

В публикации заявки на европейский патент № 0352248 описано большое семейство L-рибофуранозилпурииннуклеозидов, предназначенных для лечения ВИЧ, герпеса и гепатита. Хотя конкретные 2'-фторированные пурииннуклеозиды входят в рамки большого семейства, в этом описании изобретения не рассмотрены способы получения этих соединений, и они специально не описаны и не входят в список предпочтительных нуклеозидов. В этом описании изобретения не описаны способы получения 3'-рибофуранозилфторированных нуклеозидов. Аналогичные соединения представлены в заявке WO 88/09001, поданной Aktiebolaget Astra.

В заявке на европейский патент № 0357571 приведена большая группа β -D- и α -D-пиrimидиннуклеозидов, предназначенных для лечения СПИДа, которые включают и нуклеозиды, замещенные в 2'-или 3'-положении фтора группой. Однако этот широкий класс соединений не охватывает 2'-фторированные нуклеозиды или способ их получения.

В заявке на европейский патент № 0463470 приведено описание способа получения (5S)-3-фортетрагидро-5-[(гидрокси)метил]-2-(3Н)-фуранона, который является известным промежуточным соединением при получении 2'-фтор-2',3'-дидезоксинуклеозидов, таких как 2'-фтор-2',3'-дидезоксицитидин.

В U.S.S.N. 07/556713 описаны β -D-2'-фторарабинофуранозилнуклеозиды и способ получения указанных веществ, которые являются промежуточными соединениями в процессе синтеза 2',3'-дидезокси-2'-фторарабинозилнуклеозидов.

В патенте США № 4625020 приведено описание способа получения 1-галоген-2-дезокси-2-фторарабинофуранозильных производных, содержащих защитные сложноэфирные группы из 1,3,5-три-O-ацилрибофуранозы.

В научной литературе отсутствует описание β -L-2'-фторрибофуранозилнуклеозидов, предназначенных для лечения ВИЧ, гепатита (В или С) или заболеваний, обусловленных пролиферацией клеток. По крайней мере в отношении 2'-рибофуранозилнуклеозидов это может быть связано с ранее возникшими трудностями при введении группы фтора в 2'-рибофуранозильную конфигурацию. То же самое верно в отношении L-2'-фтор-2',3'-ненасыщенных пурииннуклеозидов, так как пурииннуклеозиды не устойчивы в кислотных средах, что ведет к расщеплению гликозильной связи.

В связи с тем, что распространение синдрома ВИЧ приобретенного иммунодефицита, СПИД ассоциированного комплекса и вирусных гепатитов В и С достигло во всем мире эпидемических масштабов и имеет трагические последствия для инфицированного субъекта, существует большая потребность в создании новых эффективных фармацевтических средств для лечения этих болезней, характеризующихся низкой токсичностью для пациента. Кроме того, существует потребность в новых антироплиферативных средствах.

Поэтому целью настоящего изобретения являются способ и композиция для лечения людей, стра-

дающих вирусными гепатитами В или С.

Другой целью настоящего изобретения является применение 2'-фтор- β -D-нуклеозида и 2'-фторнуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения людей, инфицированных вирусом гепатита В или С соответственно.

Изложение сущности изобретения

2'-Фторнуклеозиды являются биологически активными молекулами, позволяющими эффективно лечить гепатит В, гепатит С или ВИЧ. Эти соединения полезны также для лечения аномальной пролиферации клеток, включая опухоли и рак. Спектр активности этого соединения можно легко определить при помощи описанных здесь методов или любого другого подтверждающего анализа.

В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения активное соединение, его производное или соль, предназначенные для лечения гепатита или ВИЧ, можно вводить в сочетании или поочередно с другим антивирусным средством, таким как средство против ВИЧ или средство против гепатита, включая соединения вышеуказанной формулы. В случае комбинированной терапии эффективные дозы двух или большего количества средств обычно вводят одновременно, а в случае альтернированной терапии эффективные дозы всех средств - последовательно. Дозировка зависит от скорости поглощения, инактивации и выведения лекарственного средства, а также от других факторов, известных специалистам в этой области. Следует отметить, что величина дозы может быть различной в зависимости от серьезности заболевания. Кроме того, вполне понятно, что схемы приема лекарственных средств, разработанные для любого конкретного пациента, должны изменяться с течением времени в соответствии с потребностями субъекта и профессиональным мнением специалиста, наблюдающего за введением этих композиций.

Неограничивающие примеры антивирусных средств, которые можно использовать в сочетании с описанными здесь соединениями, включают 2-гидроксиметил-5-(5-фторцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан (FTC); (-)-энантиомер 2-гидроксиметил-5-(цитозин-1-ил)-1,3-оксатиолана (3TC); карбовир, ацикловир, интерферон, фамцикловир, пэнцикловир, AZT, DDI, DDC, D4T, абакавир, L-(-)-FMAU, пролекарства на основе фосфата L-DDA и β -D-диоксоланнуклеозиды, такие как β -D-диоксоланилгуанин (DG), β -D-диоксоланил-2,6-диаминопурин (DAPD) и β -D-диоксоланил-6-хлорпурин (ACP), ингибиторы обратной транскриптазы (RT), не являющиеся нуклеозидами, такие как невирапин, MKC-442, DMP-266 (Sustiva), а также ингибиторы протеазы, такие как индинавир, саквинавир, AZT, DMP-450 и др.

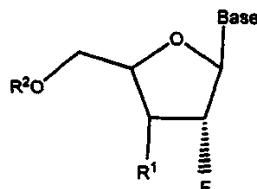
Эти соединения можно также использовать для лечения вирусных заболеваний, вызываемых вирусом инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирусом иммунодефицита кошек и вирусом иммунодефицита обезьян. (Wang, S., Montelaro, R., Schinazi, R.F., Jagerski, B. and Mellors, J.W.: "Activity of nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) against equine infectious anemia virus (EIAV)". First National Conference on Human Retro viruses and Related Infections, Washington, DC, Dec. 12-16, 1993; Sellon D.C., "Equine Infectious Anemia", Vet. Clin. North Am. Equine Pract. United States, 9:321-336, 1993; Philpott, M.S., Ebner, J.P., Hoover, E.A., "Evaluation of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine therapy for feline immunodeficiency virus using a quantitative polymerase chain reaction". Vet. Immunol. Immunopathol. 35:155166, 1992).

Кроме того, создан новый и совершенно диастереоселективный метод введения фтора в предшественник кольца безуглеводного сахара. Этот метод включает взаимодействие предшественника хирально-го кольца безуглеводного сахара (4S)-5-(замещенный окси)-пентан-4-олида, который может быть получен из L-глутаминовой кислоты, с электрофильным источником фтора, которым является, но не ограничивается им, N-фтор-(бис)бензолсульфонимид, с получением основного промежуточного соединения фторлактона 6. Фторлактон восстанавливают в лактон и ацетилируют, что дает аномерный ацетат, который затем используют для синтеза ряда новых β -L- α -2'-фторнуклеозидов. Можно также синтезировать соответствующий D-энантиомер, используя D-глутаминовую кислоту в качестве исходного вещества.

В соответствии с альтернативным вариантом осуществления изобретения получают фторированный гликаль, который дегидрируют и затем превращают в 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-2'-фторнуклеозид или β -L- или β -D-арabinозил-2'-фторнуклеозид, как это более подробно описано ниже.

Кроме того, описан более простой способ получения 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-2'-фторнуклеозидов, который включает прямую конденсацию силицированного 6-хлорпурина ключевым промежуточным соединением, которое получают из L-2,3-D-изопропилиденглицеральдегида.

Изобретение относится к применению 2'-фтор- β -D-нуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В у человека, в котором 2'-фтор- β -D-нуклеозид имеет формулу



где Base обозначает пуриновое основание;

R¹ обозначает OH, H, OR³, N₃, CN, галоген, CF₃, C₁-C₄алкил, амино, C₁-C₄алкиламино, ди-C₁-C₄алкиламино;

R² обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат, ацил или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна дать соединение, в котором R² обозначает H или фосфат; эфир сульфокислоты, включая C₁-C₁₀алкилсульфонил или C₁-C₁₀арилалкилсульфонил, в том числе метансульфонил; бензил, в котором фенильная группа необязательно замещена одним или несколькими заместителями, выбираемыми из группы, включающими гидроксил, амино, алкиламино, ариламино, аллокси, арилокси, нитро, циано, сульфокислоту, сульфат, фосфоновую кислоту, фосфат или фосфонат; и

R³ обозначает ацил, C₁-C₄алкил, фосфат или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна отщепляться с образованием исходного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Предпочтительно, если в указанных выше соединениях

R² обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат или ацил;

R¹ обозначает H, OH, OR³, C₁-C₄ низший алкил или галоген;

R³ обозначает ацил,

R² обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат или ацил,

R¹ обозначает H, OH, C₁-C₄ низший алкил или галоген; и

R³ обозначает ацил;

основание является пуриновым основанием, выбираемым из группы, состоящей из гуанина, аденина, гипоксантина, 2,6-диаминопурина и 6-хлорпурина;

R¹ и R² обозначают водород;

R¹ обозначает OH или OR³;

R¹ обозначает галоген;

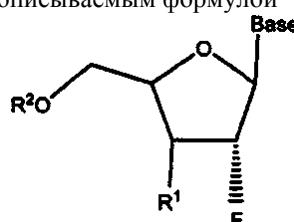
R¹ обозначает C₁-C₄ низший алкил или CF₃;

R² обозначает ацил.

Предпочтительно, если в указанных выше соединениях основание обозначает пуриновое основание, выбираемое из аденина, N⁶-алкилпуринов, N⁶-ацилпуринов [где ацил является C(O)(алкилом, арилом, алкиларилом или арилалкилом)], N⁶-бензилпурина, N⁶-галогенпурина, N⁶-винилпурина, N⁶-ацетиленпурина, N⁶-ацилпурина, N⁶-гидроксиалкилпурина, N⁶-тиоалкилпурина, N²-алкилпуринов, N²-алкил-6-тиопуринов, гуанина, гипоксантина, 2,6-диаминопурина, 2-хлор-2-аминопурина, инозина или 6-хлорпурина.

Предпочтительно, если лекарственное средство является подходящим для орального, парентерального или внутривенного введения.

В другом аспекте изобретение относится к применению 2'-фторнуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита С у человека, в котором 2'-фторнуклеозид является соединением, описываемым формулой



в которой Base обозначает пуриновое или пиримидиновое основание;

R¹ обозначает OH, H, OR³, N₃, CN, галоген, CF₃, C₁-C₄алкил, амино, C₁-C₄алкиламино, ди-C₁-C₄алкиламино или аллокси;

R² обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат, ацил или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна дать соединение, в котором R² обозначает H или фосфат; эфир сульфокислоты, включая C₁-C₁₀алкилсульфонил или C₁-C₁₀арилалкилсульфонил, в том числе метансульфонил; бензил, в котором фенильная группа необязательно замещена одним или несколькими заместителями, выбираемыми из группы, включающей гидроксил, амино, алкиламино, ариламино, аллокси, арилокси, нитро, циано, сульфокислоту, сульфат, фосфоновую кислоту, фосфат или фосфонат; и

R³ обозначает ацил, C₁-C₁₀алкил, фосфат или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна отщепляться с образованием исходного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Предпочтительно, если в указанных выше соединениях

R_2^2 обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат или ацил;

R_1^1 обозначает H, OH, OR³, C₁-C₄ низший алкил, CF₃ или галоген;

R_3^3 обозначает ацил;

R_2^2 обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат или ацил;

R_1^1 обозначает H, OH, C₁-C₄ низший алкил или галоген; и

R_3^3 обозначает ацил.

Предпочтительно, если R^2 обозначает ацил.

Предпочтительно, если в указанных выше соединениях основание обозначает пуриновое основание или пиридиновое основание.

Предпочтительно, если основание обозначает пуриновое основание, выбираемое из аденина, N⁶-алкилпуринов, N⁶-ацилпуринов [где ацил является C(O) (алкилом, арилом, алкиларилом или арилалкилом)], N⁶-бензилпурина, N⁶-галогенпурина, N⁶-винилпурина, N⁶-ацетиленпурина, N⁶-ацилпурина, N⁶-гидроксиалкилпурина, N⁶-тиоалкилпурина, N²-алкилпуринов, N⁶-алкил-6-тиопуринов, гуанина, гипоксантина, 2,6-диаминопурина, 2-хлор-2-аминопурина, инозина или 6-хлорпурина.

Предпочтительно, если в указанных выше соединениях основание обозначает пиридиновое основание, выбираемое из тимина, цитозина, 5-фторцитозина, 5-метилцитозина, 6-азапиридинина, в том числе 6-азацитозина, 2- и/или 4-меркаптопиридинина, урацила, 5-галогенурацила, в том числе 5-фторурацила, C⁵-алкилпиридинов, C⁵-бензилпиридинов, C⁵-галогенпиридинов, C⁵-винилпиридинов, C⁵-ацетиленпиридинов, C⁵-ацилпиридинов, C⁵-гидроксиалкилпурина, C⁵-амидопиридинов, C⁵-цианопиридинов, C⁵-нитропиридинов, C⁵-аминопиридинов, 5-азацитидинила, 5-азаурацилила, триазолопиридинила, имидазолопиридинила, пирролопиридинила или пиразолопиридинила.

Предпочтительно, если лекарственное средство является подходящим для орального, парентерального или для внутривенного введения.

Предлагается применение 2'-фтор-β-D-нуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В или С.

Термин "алкил" в используемом здесь значении за исключением особо оговоренных случаев означает насыщенный, с прямой или разветвленной цепью, циклический, первичный, вторичный или третичный углеводород, имеющий C₁-C₁₀ атомов и, в частности, включает метил, этил, пропил, изопропил, циклопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, пентил, циклопентил, изопентил, неопентил, гексил, изогексил, циклогексил, циклогексилметил, 3-метилпентил, 2,2-диметилбутил и 2,3-диметилбутил. Алькильная группа может быть необязательно замещена одной или несколькими фрагментами, выбираемыми из группы, включающей гидроксил, амино, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфокислоту, сульфат, фосфоновую кислоту, фосфат или фосфонат, которые могут быть не защищены или при необходимости защищены группами, известными специалистам в этой области, например, описанными в справочнике Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Second Edition, 1991, который включен в это описание изобретения в качестве ссылки.

Термин "низший алкил" в используемом здесь значении за исключением особо оговоренных случаев означает C₁-C₄ насыщенную, с прямой или разветвленной цепью, или, когда удобно, циклическую (например, циклопропил) алкильную группу.

Термин "алкиламино" или "ариламино" означает аминогруппу, имеющую соответственно один или два алкильных или арильных заместителя.

Термин "защищенный" в используемом здесь значении за исключением особо оговоренных случаев означает группу, присоединяемую к атому кислорода, азота или фосфора для предотвращения его дальнейшего взаимодействия или в других целях. Специалистам в области органического синтеза известно большое число защитных групп для атомов кислорода и азота.

Термин "арил" в используемом здесь значении за исключением особо оговоренных случаев означает фенил, бифенил или нафтил, предпочтительно фенил. Арильная группа может быть необязательно замещена одной или несколькими фрагментами, выбираемыми из группы, включающей гидроксил, амино, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфокислоту, сульфат, фосфоновую кислоту, фосфат или фосфонат, которые могут быть не защищены или при необходимости защищены группами, известными специалистам в этой области, например, описанными в справочнике Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991.

Термин "алкарил" или "алкиларил" означает алкильную группу с арильным заместителем. Термин "аралкил" или "арилалкил" означает арильную группу с алкильным заместителем.

Термин "галоген" в используемом здесь значении означает хлор, бром, йод и фтор.

Термин "пуриновое или пиридиновое основание" означает, но не ограничивается ими, аденин, N⁶-алкилпуринов, N⁶-ацилпуринов [где ацил является C(O) (алкилом, арилом, алкиларилом или арилалкилом)], N⁶-бензилпурин, N⁶-галогенпурин, N⁶-винилпурин, N⁶-ацетиленпурин, N⁶-ацилпурин, N⁶-гидроксиалкилпурин, N⁶-тиоалкилпурин, N²-алкилпуринов, N⁶-алкил-6-тиопуринов, тимин, цитозин, 5-фторцитозин, 5-метилцитозин, 6-азапиридинин, в том числе 6-азацитозин, 2- и/или

4-меркаптопиrimидин, урацил, 5-галогенурацил, в том числе 5-фторурацил, C⁵-алкилпиrimидины, C⁵-бензилпиrimидины, C⁵-галогенпиrimидины, C⁵-винилпиrimидин, C⁵-ацетиленпиrimидин, C⁵-ацилпиrimидин, C⁵-гидроксиалкилпурин, C⁵-амидопиrimидин, C⁵-цианопиrimидин, C⁵-нитропиrimидин, C⁵-аминопиrimидин, N²-алкилпурины, N²-алкил-6-тиопурины, 5-азаситидинил, 5-азаурациил, триазолопиридинил, имидазолопиридинил, пирролопиrimидинил и пиразолопиrimидинил. Пуриновые основания включают, но не ограничиваются ими, гуанин, аденин, гипоксантин, 2,6-диаминопурин и 6-хлорпурин. Функциональные кислородные и азотные группы в этом основании могут быть защищены при необходимости или при желании. Приемлемые защитные группы хорошо известны специалистам в этой области и включают trimетилсилил, диметилгексилсилил, трет-бутилдиметилсилил и трет-бутилдифенилсилил, тритил, алкильные группы, ацильные группы, такие как ацетил и пропионил, метансульфонил и п-толуолсульфонил.

Активное соединение можно вводить в виде любого производного, которое при введении реципиенту может прямо или косвенно образовывать исходное соединение либо само обладает требуемой активностью. Неограничивающими примерами являются фармацевтически приемлемые соли (альтернативно именуемые "физиологически приемлемыми солями") и соединение, алкилированное или ацилированное в 5'-положении либо в пуриновом или пиrimидиновом основании (альтернативно именуемые "фармацевтически приемлемыми производными"). Кроме того, на биологическую активность соединения могут влиять модификации, которые в некоторых случаях повышают активность по сравнению с исходным соединением. Это можно легко определить, получив производное и испытав его на антивирусную активность при помощи описанных здесь методов или любого другого метода, известного специалистам в этой области.

Термин "ацил" означает эфир карбоновой кислоты, в котором некарбонильный фрагмент сложно-эфирной группы выбирают из группы, включающей алкил или низший алкил с прямой или разветвленной цепью либо циклический алкил или низший алкил, алcoxисиалкил, аралкил, в том числе бензил, арилоксиалкил, такой как феноксиметил, арил, в том числе фенил, необязательно замещенный галогеном, C₁-C₄алкил или C₁-C₄алкокси, эфиры сульфокислоты, такие как алкил или аралкилсульфонил, в том числе метансульфонил, эфир моно-, ди- или трифосфорной кислоты, тритил или монометокситритил, замещенный бензил, триалкилсилил (например, диметил-трет-бутилсилил) или дифенилметилсилил. Арильные группы в сложных эфирах предпочтительно содержат фенильную группу.

В используемом здесь значении термин "практически не содержащий" или "практически при отсутствии" означает нуклеозидную композицию, которая содержит по крайней мере 95-98% или более, предпочтительно 99-100% указанного энантиомера этого нуклеозида.

Нуклеотидные пролекарственные препараты

Все описываемые здесь нуклеозиды можно вводить в виде нуклеотидного пролекарства, что позволяет увеличить активность, биологическую доступность, стабильность или каким-либо другим образом изменить свойства нуклеозида. Известен ряд нуклеотидных пролекарственных лигандов. Как правило, алкилирование, ацилирование или другая липофильная модификация моно-, ди- или трифосфата нуклеозида увеличивает стабильность нуклеотида. Примерами замещающих групп, которые могут заменять один или несколько атомов водорода в фосфатном фрагменте, являются алкил, арил, стероиды, углеводы, в том числе сахара, 1,2-диацилглицерин и спирты. Многие из них описаны в статье R. Jones and N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17. Все эти группы можно использовать в сочетании с рассматриваемыми нуклеозидами для достижения требуемого эффекта.

Активный нуклеозид может быть также получен в виде липида 5'-фосфоэфира или липида 5'-эфира, как это описано в нижеследующих материалах, которые включены в это описание изобретения в качестве ссылки: Kucera, L.S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.K., D.L.W., and C. Piantadosi, 1990, "Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation", *AIDS Res. Hum. Retro Viruses*. 6:491-501; Piantadosi, C., J. Marasco C.J., S.L. Morris-Natschke, K. L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surles, K.S. Ishaq, L.S. Kucera, N. Iyer, C.A. Wallen, S. Piantadosi, and E.J. Modest, 1991, "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity", *J. Med. Chem.*, 34:1408-1414; K.Y. Hosteller, D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M.T. van Wijk, and H. van den Bosch, 1992, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoyl-glycerol, a lipid prodrug 3'-deoxythymidine", *Antimicrob. Agents Chemother*, 36:2025-2029; Hosteller, K.Y., L.M. Stuhmiller, H.B. Lenting, H. van den Bosch, and D.D. Richman, 1990, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides", *J. Biol. Chem.*, 265:61127.

Неограничивающие примеры патентов США, в которых описаны приемлемые липофильные заместители, которые можно ковалентно вводить в нуклеозид, предпочтительно в 5'-ОН положении нуклеозида или липофильных препаратов, имеют патенты США №№ 5149794 (22 сентября 1992 г., Yatvin et al.); 5194654 (16 марта 1993 г., Hostetler et al.); 5223263 (29 июня 1993 г., Hostetler et al.); 5256641 (26 октября 1993 г., Yatvin et al.); 5411947 (2 мая 1995 г., Hostetler et al.); 5463092 (31 октября 1995 г., Hostetler et al.); 5543389 (6 августа 1996 г., Yatvin et al.); 5543390 (6 августа 1996 г., Yatvin et al.); 5543391 (6 авгу-

ста 1996 г., Yatvin et al.); и 5554728 (10 сентября 1996 г., Basava et al.), которые включены в данное описание изобретения в качестве ссылки. Иностранными заявками на патент, в которых описаны липофильные заместители, присоединяемые к нуклеозидам по настоящему изобретению, или липофильные препараты, являются WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, европейский патент № 0350287, европейский патент № 93917054.4 и WO 91/19721.

Неограничивающие примеры нуклеотидных пролекарств приведены в нижеследующих ссылках: Ho, D.H.W. (1973) "Distribution of Kinase and deaminase of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse". *Cancer Res.* 33, 2816-2820; Holy, A. (1993) "Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues". In: De Clercq (Ed.), *Advances in Antiviral Drug Design*, vol. I, JAI Press, pp. 179-231; Hong, C.I., Nechaev, A., and West, C.R. (1979a) "Synthesis and antitumor activity of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone". *Biochim. Biophys. Rs. Commun.* 88, 1223-1229; Hong, C.I., Nechaev, A., Kirisits, A.J., Buchheit, D.J. and West, C.R. (1980) "Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-(β -D-arabinofuranosyl)cytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols". *J. Med. Chem.* 28, 171-177; Hosteller, K.Y., Stuhmiller, L.M., Lenting, H.B.M. van den Bosch, H. and Richman. *J. Biol. Chem.* 265, 6112-6117; Holsteller, K.Y., Carson, D.A. and Richman, D.D. (1991); "Phosphatidylazidothymidine: mechanism of antiretroviral action in CEM cells". *J. Biol. Chem.* 266, 11714-11717; Holsteller, K.Y., Korba, B., Sridhar, C., Gardener, M. (1994a) "Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice". *Antiviral Res.* 24, 59-67; Hosteller, K.Y., Richman, D.D., Sridhar, C.N. Feigner, P.L. Feigner, J. Ricci, J., Gardener, M.F., Selleseth, D.W. and Ellis M.N. (1994b) "Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in rauscher leukemia virus-infected mice". *Antimicrobial Agents Chemother.* 38, 2792-2797; Hunston, R.N., Jones, A.A., McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J., and DeClercq, E. (1984) "Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-flourouridine". *J. Med. Chem.* 27, 440-444; Ji, Y.H., Moog, C, Schmitt, G., Bischoff, P. and Luu, B. (1990); "Monophosphoric acid esters of 7- β -hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleoside as potential antitumor agents: synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity". *J. Med. Chem.* 33, 2264-2270; Jones, A.S., McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J. and DeClercq, E. (1984) "Synthesis, properties, and biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidoates". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1471-1474; Juodka, B.A. and Smrt, J. (1974) "Synthesis of diribonucleoside phosph(P-N)amino acid derivarives". *Coll. Czech. Chem. Comm.* 39, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., Yamaji, N., Kato, M., Saito, M., Kawada, T. and Imai, S. (1989) "Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities". *Nucleic Acids Res. Sym. Ser.* 21, 1-2; Kataoka, S., Uchida, "(cAMP) benzyl and methyl triesters". *Heterocycles* 32, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J.J., O'Connor, T.J. Jones, B.C.N.M., Devine, K.G., Taylor-Robinson D., Jeffries, D.J. and McGuigan, C. (1992) "Comparison of antiviral effects of zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivaives against HIV and ULV in vitro". *Antiviral Chem. Chemother.* 3, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., Saithoh, K.I., Kuninaka, H., Yosino, H. and Saneyoshi, M. (1989) "Antitumor activity and pharmacology of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine". *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 679-685; Korty, M. and Engels, J. (1979) "The effects of adenosine- and guanosine 3',5' phosphoric acid and benzyl esters on guineapig ventricular myocardium". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 310, 103-111; Kumar, A., Goe, P.L., Jones, A.S., Walker, R.T., Balzarini, J. and DeClercq, E. (1990) "Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives". *J. Med. Chem.* 33, 2368-2375; LeBec, C., and Huynh-Dinh, T. (1991) "Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine an arabinocytidine as anticancer prodrugs". *Tetrahedron Lett.* 32, 6553-6556; Lichtenstein, J., Barner, H.D. and Cohen, S.S. (1960) "The metabolism of exogenously supplied nucleotides by *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.* 235, 457-465; Luchy, J., Von Daeniken, A., Friederich, J. Manthey, B., Zweifel, J., Schlatter, C. and Benn, M.H. (1981) "Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoepithioalkanes". *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.* 72, 131-133 (Chem. Abstr. 95, 127093); McGuigan, C., Tollerfield, S.M. and Riley, P.A. (1989) "Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the antiviral drug Ara". *Nucleic Acids Res.* 17, 6065-6075; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., Galpin, S.A., Jeffries, D.J. and Kinchington, D. (1990a) "Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds". *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 107-113; McGuigan, C., O'Connor, T.J., Nicholls, S.R., Nickson, C. and Kinchington, D. (1990b) "Synthesis and anti-HIV activity of some novel substituted dialkyl phosphate derivatives of AZT and ddCyd". *Antiviral. Chem. Chemother.* 1, 355-360; McGuigan, C., Nicholls, S.R., O'Connor, T.J., and Kinchington, D. (1990c) "Synthesis of some novel dialkyi phosphate derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs". *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 25-33; McGuigan, C., Devin, K.G., O'Connor, T.J., and Kinchington, D. (1991) "Synthesis and anti-HIV activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT); potent activity of the trichloroethyl methoxyalaninyl compound". *Antiviral Res.* 15, 255-263; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Balzarini, J. and DeClercq, E. (1993b) "Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT". *J. Med. Chem.* 36, 1048-1052.

Кислые алкилфосфатные производные анти-ВИЧ агента AZT могут быть менее токсичными по сравнению с аналогом исходного нуклеозида. *Antiviral Chem. Chemother.* 5, 271-277; Meyer, R.B., Jr., Shuman, D.A. and Robins, R.K. (1973) "Synthesis of purine nucleoside 3',5'-cyclic phosphoramidates". *Tetrahedron Lett.* 269-272; Nagyvary, J., Gohil, R.N., Kirchner, C.R. and Stevens, J.D. (1973) "Studies on neutral esters of cyclic AMP", *Biochem. Biophys. Res. Conimun.* 55, 1072-1077; Namane, A., Gouyette, C., Fillion, M.P., Fillion, G. and HuynhDinh, T. (1992) "Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug". *J. Med. Chem.* 35, 3039-3044; Nargeot, J. Nerbonne, J.M., Engels, J. and Leser, H.A. (1983), *Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2395-2399; Nelson, K.A., Bentruude, W.G., Stser, W.N. and Hutchinson, J.P. (1987) "The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates. ¹HNMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3',5'-monophosphate". *J. Am. Chem. Soc.* 109, 4058-4064; Nerbonne, J.M., Richard, S., Nargeot, J. and Lester, H.A. (1984) "New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations". *Nature* 301, 74-76; Neumann, J.M., Herve, M., Debouzy, J.C., Guerra, F.I., Gouyette, C., Dupraz, B. and Huynh-Dinh, T. (1989) "Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl phospholipid of thymidine". *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., Hirano, M., Imai, K., Mizoguchi, H., Nakamura, T., Kosaka, M., Takatuski, K., Yamaya, T., Toyama K., Yoshida, T., Masaoka, T., Hashimoto, S., Ohshima, T., Kimura, I., Yamada, K. and Kimura, J. (1991) "Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1- β -D-arabinouranosylcytosine-5'-stearylphosphate". *Oncology* 48, 451-455. Palomino, E., Kessle, D. and Horwitz, J.P. (1989) "A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'-dideoxynucleosides to the brain". *J. Med. Chem.* 32, 22-625; Perkins, R.M., Barney, S., Wittrock, R., Clark, P.H., Levin, R., Lambert, D.M., Petteway, S.R., Serafinowska, H.T., Bailey, S.M., Jackson, S., Harnden, M.R., Ashton, R., Sutton, D., Harvey, J.J. and Brown, A.G. (1993) "Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a rauscher murine leukemia virus infection in mice". *Antiviral Res.* 20 (Suppl. I). 84; Piantadosi, C., Marasco, C.J., Jr., Norris-Natschke, S.L., Meyer, K.L., Gumus, F., Surles, J.R., Ishaq, K.S., Kucera, L.S., Iyer, N., Wallen, C.A., Piantadosi, S. and Modest, E.J. (1991) "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity". *J. Med. Chem.* 34, 1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, I., Imbach, J.L., Kahn, S. and Farquhar, D. (1994) "Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the 'on-line ISRP-cleaning HPLC technique." *Antiviral Chem. Chemother.* 5, 91-98; Postemark, T. (1974) "Cyclic AMP and cyclic GMP." *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 23-33; Prisbe, E.J., Martin, J.C.M., McGhee, D.P.C., Baker, M.F., Smee, D.F., Duke, A.E., Matthews, T.R. and Verheyden, J.P.J. (1986) "Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate and phosphonate derivatives of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine." *J. Med. Chem.* 29, 671-675; Pucch, F., Gosselin, G., Lefebvre, I., Pompon, A., Aubertin, A.M., Dim and Imbach, J. L. (1993) "Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process." *Antiviral Res.* 22, 155-174; Pugaeva, V.P., Klochkeva, S.I., Mashbits, F.D. and Eizengart, R.S. (1969). "Toxicological assessment and health standard ratings for ethylene sulfide in the industrial atmosphere." *Gig. Trf. Prof. Zabol.* 14, 47-48 (Chem. Abstr. 72, 212); Robins, R.K. (1984) "The potential of nucleotide analogs as inhibitors of Retro viruses and tumors." *Pharm. Res.* 11-18; Rosowsky, A., Kim, S.H., Ross, J. and Wick, M.M. (1982) "Lopophilic 5'- (alkylphosphate) esters of 1-J3-D-arabinofuranosylcytosine and its N⁴-acyl and 2,2'-anhydoto-3',0-acyl derivatives as potential prodrugs." *J. Med. Chem.* 25, 171-178; Ross, W. (1961) "Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment." *Biochem. Pharm.* 8, 235-240; Ryu, E.K., Ross, R.J., Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, C.I. and West, C.R. (1982) "Phospholipid-nucleoside conjugates. 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5' diphosphate [-], 2-diacylglycerols." *J. Med. Chem.* 25, 1322-1329; Saffhill, R. and Hume, W.J. (1986) "The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5-bromoethoxyuridine by serum from different sources and its consequences for the use of these compounds for incorporation into DNA." *Chem. Biol. Interact.* 57, 347-355; Saneyoshi, M., Morozumi, M., Kodama, K., Machida, J., Kuninaka, A. and Yoshino, H. (1980) "Synthetic nucleosides and nucleotides. XVI. Synthesis and biological evaluations of a series of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-alkyl or arylphosphates." *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2915-2923; Sastry, J.K., Nehete, P.N., Khan, S., Nowak, B.J., Plunkett, W., Arlinghaus, R.B. and Farquhar, D. (1992) "Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection." *Mol. Pharmacol.* 41, 441-445; Shaw, J.P., Jones, R.J., Arimilli, M.N., Louie, M.S., Lee, W.A. and Cundy, K.C. (1994) "Oral bioavailability of PMEA from PMEA prodrugs in male Sprague-Dawley rats." 9th Annual AAPS Meeting. San Diego, CA (Abstract). Shuto, S., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K., Matsuda, A. and Ueda, T. (1987). "A facile one-step synthesis of 5'-phosphatidylnucleosides by an enzymatic two-phase reaction." *Tetrahedron Lett.* 28, 199-202; Shuto, S., Itoh, H., Ueda, S., Imamura, S., Kukukawa, K., Tsujino, M., Matsuda, A. and Ueda, T. (1988) *Pharm. Bull.* 36, 209-217. Примером полезной фосфатной группой пролекарства является S-ацил-2-тиоэтил группа, также называемая "SATE".

Комбинированная и альтернированная терапия

Установлено, что после продолжительного лечения антивирусным средством могут появиться устойчивые к лекарственным средствам варианты ВИЧ и HBV. Устойчивость к лекарственному средству обычно возникает в результате мутации гена, кодирующего фермент, используемый в репликации вируса, причем в случае ВИЧ таким ферментом чаще всего бывает обратная транскриптаза, протеаза или полимераза ДНК, и в случае HBV таким ферментом является полимераза ДНК. Недавно было показано, что действие лекарственного средства против ВИЧ можно продлить, усилить или восстановить путем введения данного соединения в сочетании или поочередно со вторым и, возможно, третьим антивирусным соединением, которое вызывает другую мутацию, отличающуюся от мутации, вызываемой основным лекарственным средством. Кроме того, при помощи такой комбинированной или альтернированной терапии можно изменить фармакокинетику, распределение в организме и другие параметры лекарственного средства. Как правило, комбинированная терапия является более предпочтительной по сравнению с альтернированной терапией, так как она оказывает множественное одновременное действие на вирус.

Вторым антивирусным средством, предназначенным для лечения ВИЧ в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, является ингибитор обратной транскриптазы ("RTI"), который может быть или синтетическим нуклеозидом ("NRTI"), или соединением, не являющимся нуклеозидом ("NNRTI"). В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения в случае ВИЧ вторым (или третьим) антивирусным средством может быть ингибитор протеазы. В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения вторым (или третьим) соединением может быть аналог пирофосфата или ингибитор слияния. Данные об устойчивости к лекарственным средствам, полученные *in vitro* и *in vivo* для ряда антивирусных соединений, приведены в статье "Schinazi, et al., Mutations in retroviral genes associated with drug resistance", International Antiviral News, 1997.

Предпочтительными соединениями для комбинированной или альтернированной терапии, предназначенными для лечения HBV, являются 3TC, FTC, L-FMAU, интерферон, β -D-диоксоланилгуанин (DXG), β -D-диоксоланил-2,6-диаминопурин (DAPD) и β -D-диоксоланил-6-хлорпурин (ACP), фамцикловир, пенцикловир, BMS-200475, bis pom PMEA (адефовир, дипивоксил), лобукавир, ганцикловир и рибаварин.

Предпочтительными примерами антивирусных средств, которые можно использовать в сочетании или поочередно с описываемыми здесь соединениями для лечения ВИЧ, являются цис-2-гидроксиметил-5-(5-фторцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан (FTC); (-)-энантиомер 2-гидроксиметил-5-(цитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан (3TC); карбовир, ацикловир, фоскарнет, интерферон, AZT, DDI, DDC, D4T, CS-87 (3'-азидо-2',3'-дизоксиуридин) и β -D-диоксоланнуклеозиды, такие как β -D-диоксоланилгуанин (DXG), β -D-диоксоланил-2,6-диаминопурин (DAPD) и β -D-диоксоланил-6-хлорпурин (ACP), MKC-442 (6-бензил-1-этоксиметил)-5-изопропилурацил.

Предпочтительными ингибиторами протеазы являются криксиван (Merck), нелфинавир (Agouron), ритонавир (Abbott), саквинавир (Roche), DMP-266 (Sustiva) и DMP-450 (DuPont Merck).

Более полный список соединений, которые можно вводить в сочетании или поочередно со всеми описываемыми нуклеозидами, включает

сукцинат (1S,4R)-4-[(2-амино-6-циклогексиламино)-9Н-пурин-9-ил]-2-циклогексен-1-метанола ("1592", аналог карбовира; Glaxo Wellcome);

3TC: (-)- β -L-2',3'-дизокси-3'-тиацитидин (Glaxo Wellcome);

a-APA R18893: а-нитроаминофенилацетамид;

A-77003: C2-симметричный ингибитор протеазы (Abbott);

A-75925: C2-симметричный ингибитор протеазы (Abbott);

AAP-BNAP: аналог бисгетероарилпиперазина (Upjohn);

ABT-538: C2-симметричный ингибитор протеазы (Abbott);

AzddU: 3'-азидо-2',3'-дизоксиуридин;

AZT: 3'-азидо-3'-дезокситимидин (Glaxo Wellcome);

AZT-p-ddI: 3'-азидо-3'-дезокситимидил-(5',5')-2',3'-дизоксиинозиновая кислота (Ivax);

BHAP: бисгетероарилпиперазин;

BILA 1906: N-{1S-[[3-[2S-{{[(1,1-диметилэтил)амино]карбонил}-4R-[(3-пиридинилметил)тио]-1-пиперидинил]-2R-гидрокси-1S-(фенилметил)пропил]амино]карбонил]-2-метилпропил}-2-хинолинкарбоксамид (BioMega/Boehringer-Ingelheim);

BILA 2185: N-(1,1-диметилэтил)-1-[2S-[(2-2,6-диметилфенокси)-1-оксоэтил]амино]-2R-гидрокси-4-фенилбутил]-4R-пиридинилтио-2-пиперидинкарбоксамид (BioMega/Boehringer-Ingelheim);

BM+51.0836: производное тиазолоизоиндолиона;

BMS 186318: ингибитор протеазы ВИЧ-1 на основе производного аминодиола (Bristol-Myers-Squibb);

d4API: 9-[2,5-дигидро-5-(фосфонометокси)-2-фуранел]аденин (Gilead);

d4C: 2',3'-дидегидро-2',3'-дизоксицитидин;

d4T: 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (Bristol-Myers-Squibb);

ddC: 2',3'-дидезоксицитидин (Roche);
 ddi: 2',3'-дидезоксинозин (Bristol-Myers-Squibb);
 DMP-266: 1,4-дигидро-2Н-3,1-бензоксазин-2-он;
 DMP-450: {[4R-(4-а,5-а,6-б,7-б)]гексагидро-5,6-бис(гидрокси)-1,3-бис(3-амино)фенил]метил-4,7-бис(фенилметил)-2Н-1,3-диазепин-2-он} бисмезилат (Avid);
 DXG: (-)-β-D-диоксолангуанозин (Triangle);
 EBU-dM: 5-этил-1-этоксиметил-6-(3,5-диметилбензил)урацил;
 E-EBU: 5-этил-1-этоксиметил-6-бензилурацил;
 DS: декстрансульфат;
 E-EPSeU: 1-(этоксиметил)-(6-фенилселенил)-5-этилурацил;
 E-EPU: 1-(этоксиметил)-(6-фенилтио)-5-этилурацил;
 FTC: β-2',3'-дидезокси-5-фтор-3'-тиацитидин (Triangle);
 HBY097: S-4-изопропоксикарбонил-6-метокси-3-(метилтиометил)-3,4-дигидрохиноксалин-2(1Н)-тион;
 НЕРТ: 1-[(2-гидроксиэтокси)метил]-6-(фенилтио)тимин;
 HIV-1: вирус иммунодефицита человека типа 1;
 JM27 63: 1,1'-(1,3-пропандиил)-бис-1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан (Johnson Matthey);
 JM3100: 1,1'-[1,4-фениленбис-(метилен)]-бис-1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан (Johnson Matthey);
 KNI-272: трипептид, содержащий (2S,3S)-3-амино-2-гидрокси-4-фенилмасляную кислоту;
 L-697593: 5-этил-6-метил-3-(2-фталимидаэтил)пиридин-2(1Н)-он;
 L-735524: ингибитор протеазы ВИЧ-1 на основе гидроксиаминопентанамида (Merck);
 L-697661: 3-{{(4,7-дихлор-1,3-бензоксазол-2-ил)метил}амино}-5-этил-6-метилпиридин-2(1Н)-он;
 L-FDDC: (-)-β-L-5-фтордиоксоланцитозин;
 L-FDOC: (-)-β-L-5-фтордиоксоланцитозин;
 MKC442: 6-бензил-1-этоксиметил-5-изопропилурацил (I-EBU; Triangle/Mitsubishi);
 невирапин: 11-циклогексил-5,11-дигидро-4-метил-6Н-дипиридол[3,2-б:2',3'-е]диазепин-6-он (Boehringer-Ingelheim);
 NSC648400: 1-бензилоксиметил-5-этил-6-(альфа-пиридилтио)урацил (E-BPTU);
 P9941: [2-пиридилацетил-IlePheAla-γ(CH₂OH)]-2 (Dupont Merck);
 PFA: фосфоноформиат (фоскарнет; Astra);
 PMEA: 9-(2-фосфонилметоксиэтил)аденин (Gilead);
 PMPA: (R)-9-(2-фосфонилметоксипропил)аденин (Gilead);
 Ro 31-8959: ингибитор протеазы ВИЧ-1 на основе производного гидроксиэтиламина (Roche);
 RPI-312: ингибитор пептидилпротеазы, 1-[(3s)-3-(н-альфа-бензилоксикарбонил)-1-аспаргинил)амино-2-гидрокси-4-фенилбутирил]-н-трет-бутил-1-пролинамид;
 2720: 6-хлор-3,3-диметил-4-(изопренилоксикарбонил)-3,4-дигидрохиноксалин-2(1Н)-тион;
 SC-52151: ингибитор протеазы на основе изостера гидроксиэтилмочевины (Searle);
 SC-55389A: ингибитор протеазы на основе изостера гидроксиэтилмочевины (Searle);
 TIBO R82150: (+)-(5S)-4,5,6,7-тетрагидро-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)имидазо[4,5,1-jk][1,4]бензодиазепин-2(1Н)-тион (Janssen);
 TIBO 82913: (+)-(5S)-4,5,6,7-тетрагидро-9-хлор-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)имидазо[4,5,1-jk][1,4]бензодиазепин-2(1Н)-тион (Janssen);
 TSAO-m3T: [2',5'-бис-O-(трет-бутилдиметилсилил)-3'-спиро-5'-(4'-амино-1',2'-оксатиол-2',2'-диоксид)]-b-D-пентофуранозил-N3-метилтимин;
 U90152: 1-[3-[(1-метилэтил)амино]-2-пиридинил]-4-[(5-[(метилсульфонил)амино]-1Н-индол-2-ил)карбонил]пиперазин;
 UC: производные тиокарбоксанилида (Unিroyal);
 UC-781: =N-[4-хлор-3-(3-метил-2-бутенилокси)фенил]-2-метил-3-фуранкарбонатоамид;
 UC-82: =N-[4-хлор-3-(3-метил-2-бутенилокси)фенол]-2-метил-3-тиофенкарбонатоамид;
 VB 11328: ингибитор протеазы на основе гидроксиэтилсульфонамида (Vertex);
 VX-478: ингибитор протеазы на основе гидроксиэтилсульфонамида (Vertex);
 XM 323: ингибитор протеазы на основе циклической мочевины (Dupont Merck).

Комбинированная терапия для лечения пролиферативных состояний

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения соединения используемые в качестве антитицеративных средств можно вводить в сочетании с другими соединениями, повышающими эффективность лечения, которые включают, но не ограничиваются ими, антифолат, 5-фтор-пиридин (в том числе 5-фторурацил), аналог цитидина, такой как β-L-1,3-диоксоланилцитидин или β-L-1,3-диоксоланил-5-фторцитидин, антиметаболиты (в том числе пуриновые антиметаболиты, цитарabin, фударабин, флоксуридин 6-меркаптотурин, метотрексат и 6-тиогуанин), гидроксимочевину, ингибиторы митоза (в том числе СРТ-11, этопозид (VR-21)), таксол и винкаалкалоиды, такие как винкристин и винбластин, алкилирующие средства (которые включают, но не ограничиваются ими, бусульфан,

хлорамбуцил, циклофосфамид, ифофамид, метахлорамин, мелфалан и тиотепа), неклассические алкилирующие средства, соединения, содержащие платину, блеомицин, противоопухолевый антибиотик, антрациклин, такой как доксорубицин и данномицин, антрацендион, ингибиторы топоизомеразы II, гормональные средства (которые включают, но не ограничиваются ими, кортикостероиды (дексаметазон, преднизон и метилпреднизон), андрогены, такие как флуоксистерон и метилтестостерон, эстрогены, такие как дигидроэстрол, антиэстрогены, такие как тамоксифен, аналоги LHRH, такие как лейпролид, антиандрогены, такие как флутамид, аминоглютэтимид, мегестролацетат и медроксипрогестерон, аспарагиназу, кармустин, ломустин, гексаметилмеламин, дакарбазин, митотан, стрептозоцин, цисплатин, карбоплатин, левамазол и лейковорин. Соединения по настоящему изобретению можно также использовать в сочетании с ферментными лечебными средствами и модуляторами иммунной системы, такими как интерферон, интерлейкин, фактор опухолевого некроза, фактор, стимулирующий колонию макрофагов, и колониестимулирующий фактор.

Способ получения активных соединений

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения выполняют диастереоселективную реакцию, обеспечивающую введение фтора в сахарную часть новых аналогов нуклеозида. Этот метод синтеза можно использовать для получения производных пурина и пуримидина. Основной стадией синтеза является фторирование предшественника хиального кольца безуглеводного сахара (4S)-5-(защищенный-окси)пентан-4-олида, например, (4S)-5-(трет-бутилдифенилсилокси)пентан-4-олида 4, с использованием источника электрофильного фтора, которым является, но не ограничивается им, N-фтор-(бис)бензолсульфонимид 5. Этот относительно новый класс N-фторсульфонимидных реагентов был первоначально получен Барнетом в 1984 г.; с тех пор он был усовершенствован и используется в настоящее время в качестве удобного и реакционноспособного источника электрофильного фтора (Bartlette, W.E., J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 452; Davis, F.A.; Han, W., Murphy, C.K., J. Org. Chem. 1995, 60, 4730; Snieckus, V., Beaulieu, F., Mohri, K., Han, W., Murphy, C.K., Davis, F.A., Tetrahedron Lett. 1994, 35(21), 3465). Эти реагенты чаще всего используют для введения фтора в нуклеофилы, такие как еноляты и метилированные ароматические соединения (Davis, F.A., Han, W., Murphy, C.K., J. Org. Chem. 1995, 60, 4730). В частности, N-фтор-(бис)бензолсульфонимид (NFSi) является устойчивым на воздухе, простым в обращении твердым веществом с достаточным пространственным объемом для стереоизбирательного фторирования енолята силилзащищенного лактона 4. В качестве неограничивающего примера этого способа ниже подробно описан синтез фторолактона 6 и его использование в качестве промежуточного соединения для синтеза ряда новых α -2'-фторнуклеозидов. На основании этого описания специалист в этой области сможет при желании изменить этот способ для достижения поставленной цели и получить требуемое соединение.

Можно использовать любой источник электрофильного фтора, который фторирует предшественник, такой как (4S)-5-(защищенный-окси)пентан-4-олид, например, (4S)-5-(трет-бутилдифенилсилокси)пентан-4-олид. Альтернативными источниками электрофильного фтора являются

N-фторсульфамы (Differding, et al., Tet. Lett. vol. 29, № 47, pp. 6087-6090 (1988);

Chemical Reviews, 1992, vol. 92, № 4 (517), N-фтор-О-бензодисульфонимид (Tet. Lett., vol. 35, pp. 3456-3468 (1994), Tet. Lett. Vol. 35, № 20, pp. 3263-3266 (1994));

J. Org. Chem. 1995, 60, 4730-4737), 1-фторэтен и его синтетические эквиваленты (Matthews, Tet. Lett. Vol. 35, № 7, pp. 1027-1030 (1994);

фторирующие агенты Accufluor фирмы Allied Signal, Inc., Buffalo Research Laboratory, Buffalo, New-York, NFTb 1-фтор-4-гидрокси-1,4-диазоабицикло[2.2.2]октан-бис(тетрафторборат), NFPy (пиридингептафтордиборат N-фторпиридиния) и NFSi (N-фторбензолсульфонимид);

электрофильные фторирующие реагенты фирмы Aldrich Chemical Company, Inc., в том числе соли N-фторпиридиния, а именно трифлат 1-фтор-2,4,6-триметилпиридиния, трифлат 3,5-дихлор-1-фторпиридиния, трифлат 1-фторпиридиния, тетрафторборат 1-фторпиридиния и пиридингептафтордиборат 1-фторпиридиния (см. также J. Am. Chem. Soc, vol. 112, № 23, 1990);

N-фторсульфонимиды и амиды, в частности (N-фтор-N-метил-п-толуолсульфонамид, N-фтор-N-пропил-п-толуолсульфонамид и N-фторбензолсульфонимид);

фторид N-фторхинуклидиния (J. Chem. Soc. Perkin Trans I 1988, 2805-2811);

перфтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин и перфтор-(1-метилпирролидин), Banks, Cheng, and Haszeldine, Heterocyclic Polyfluoro-Compounds Part II (1964);

1-фтор-2-пиридин, J. Org. Chem., 1983, 48, 761-762;

четвертичные стереогенные центры, имеющие атом фтора (J. Chem. Soc. Perkin Trans, pp. 221-227 (1992));

трифлат N-фтор-2,4,6-пиридиния, Shimizu, Tetrahedron, vol. 50(2), pp. 487-495 (1994);

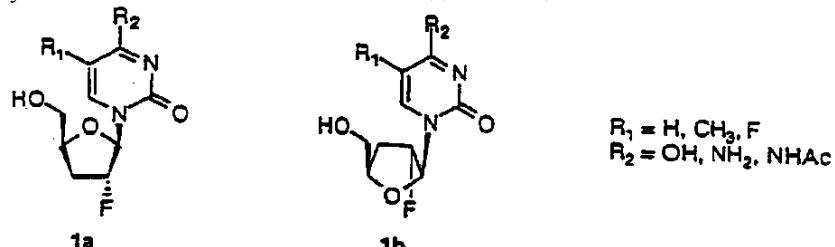
пиридингептафтордиборат N-фторпиридиния, J. Org. Chem. 1991, 56, 5962-5964;

Umemoto, et al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 64, 1081-1092 (1991);

N-фторперфторалкилсульфонимиды, J. Am. Chem. Soc., 1987, 109, 7194-7196;

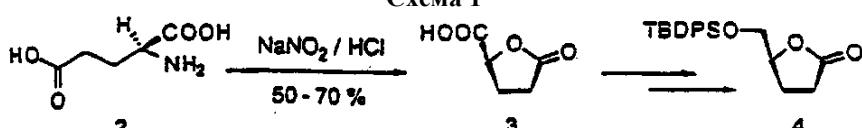
Purrrington, et al., Lewis Acid Mediated Fluorinations of Aromatic Substrates, J. Org. Chem. 1991, 56, 142-145.

Существенным преимуществом этого метода является возможность получения отдельно "природного" (1a)-D- или "неприродного" (1b)-L-энантиомера нуклеозидов в результате соответствующего выбора L- или D-глутаминовой кислоты в качестве исходного вещества.

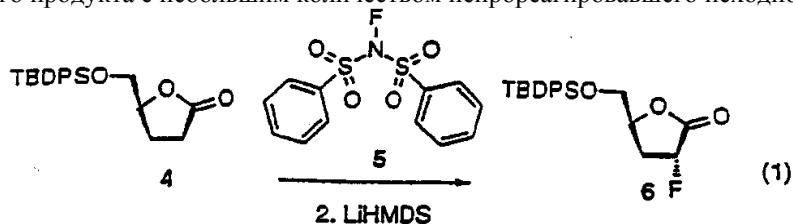


Лактон 4 синтезируют по методу, показанному на схеме 1, из L-глутаминовой кислоты, как это описано Ravid et al. (Tetrahedron 1978, 34, 1449) и Taniguchi et al. (Tetrahedron 1974, 30, 3547).

Схема 1

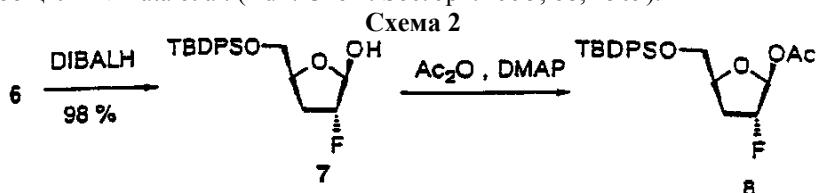


Известно, что енолят лактона 4, полученный при температуре -78°C с использованием LiHMDS в ТГФ, является устойчивым веществом. Этот енолят используют при осуществлении нескольких методов синтеза, включая добавление электрофилов, таких как дифенилдиселенид, дифенилдисульфид и алкилгалогениды, с получением высоких выходов (Liotta, D.C., Wilson, L., J. Tetrahedron Lett. 1990, 31 (13), 1815; Chu, C.K., Babu, J.R., Beach, J.W., Ann. S.K., Huang, H., Jeong, L.S., Lee, S.J., J. Org. Chern., 1990, 55, 1418; Kawakami, H., Ebata, T., Koseki, K., Matsushita, H., Naoi, Y., Itoh, K., Chem. Lett. 1990, 1459). Однако добавление к еноляту 4 раствора соединения 5 в ТГФ дает плохой выход требуемого монофторированного продукта 6. Получены многочисленные побочные продукты, в том числе вещество, которое предположительно является дифторированным лактоном и не отделяется от других примесей. По этой причине порядок введения реагентов изменен таким образом, что лактон 4 и NFSi 5 вместе растворяют в ТГФ и охлаждают до температуры -78°C. Медленное добавление LiHMDS позволяет получить вещество 6 в виде единственного продукта с небольшим количеством непрореагированного исходного вещества (1)



Фторолактон 6 можно получить с 50-70% выходом, производя хроматографию на колонках из силикагеля и кристаллизацию. Реакция приводит к получению одного диастереомера 6 главным образом в результате взаимодействия пространственно объемной группы TBDPS и объемного фторирующего реагента 5. Фторолактон 6 идентифицируют как α - или "нижний" фтороизомер, т.е. с положением атома F книзу от плоскости кольца, производя сравнение с ранее опубликованными данными ЯМР и при помощи рентгеноструктурного исследования энантиомера 20.

Лактон 6 превращают в аномерный ацетат 8, как это показано на схеме 2. Интересно отметить, что лактон 7 существует исключительно в виде β -аномера и у ацетата 8 при помощи ЯМР не обнаружен α -аномер, о чём сообщили Niihata et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn. 1995, 68, 1509).



Реакцию сочетания соединения 8 с силицированными пиримидиновыми основаниями выполняют в соответствии со стандартным методом Ворбругена (Tetrahedron Lett., 1978, 15, 1339) с использованием трифлата TMS в качестве кислоты Льюиса. Альтернативно можно использовать любую другую кислоту Льюиса (которая, как известно, способна эффективно конденсировать основание вместе с углеводом, в результате чего образуется нуклеозид), включая хлорид олова, хлорид титана и другие соединения олова или титана. Целый ряд оснований можно успешно подвергнуть реакции сочетания с получением высоких

выходов в интервале 72-100% после выполнения хроматографии на колонках (уравнение 2, табл. 1)

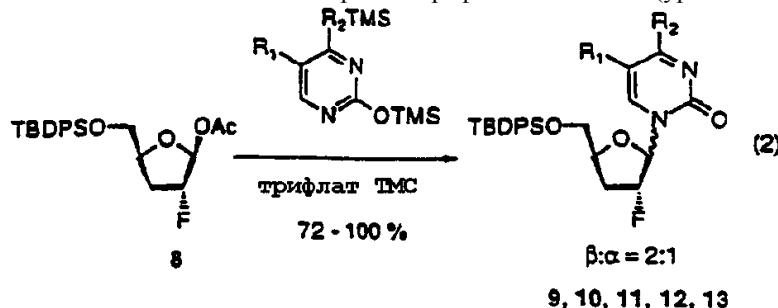


Таблица 1

Гликозилирование замещенных пиримидинов
соединением 8

| Соединение | R ₁ | R ₂ | выход |
|------------|-----------------|-----------------|-------|
| 9 | F | OH | 87% |
| 10 | F | NH ₂ | 99% |
| 11 | H | NHAc | 91% |
| 12 | H | NH ₂ | 72% |
| 13 | CH ₃ | OH | 89% |

Результаты ПМР показывают, что соотношение между аномерами β - и α -нуклеозидов во всех случаях составляет примерно 2:1. Силилзащищенные нуклеозиды нельзя разделить при помощи хроматографии на колонках на отдельные аномеры. Однако после снятия защиты с 5'-кислорода при помощи NH₄F в метаноле (уравнение 3) β - и α -аномеры можно легко отделить друг от друга; полученные результаты приведены в табл. 2.

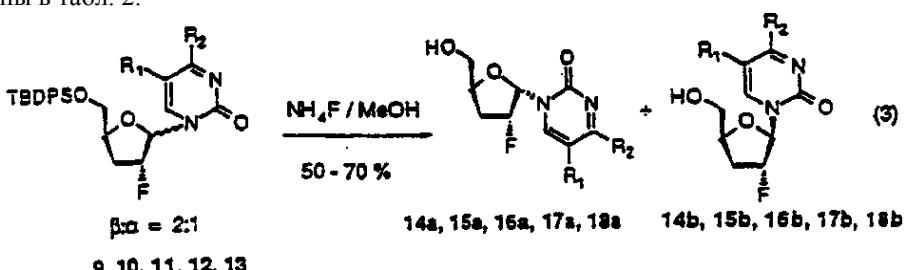


Таблица 2

Снятие защиты с нуклеозидов

| R ₁ | R ₂ | a | выход | b | выход |
|-----------------|-----------------|-----|-------|-----|-------|
| F | OH | 14a | 19% | 14b | 48% |
| F | NH ₂ | 15a | 27% | 15b | 51% |
| H | NHAc | 16a | 17% | 16b | 31% |
| H | NH ₂ | 17a | - | 17b | - |
| CH ₃ | OH | 18a | 12% | 18b | 33% |

Классификацию свободных нуклеозидов с выявлением α -или β -формы производят на основании химического сдвига аномерного протона (табл. 3) или полярности нуклеозидов, определяемой при помощи тонкослойной хроматографии. Тенденция создавать α/β пары свободных нуклеозидов выражается в том, что менее полярное соединение из двух имеет химический сдвиг аномерных протонов в сторону сильного поля от более полярного соединения.

Таблица 3

Химический сдвиг аномерных протонов (миллионные доли)

| Соединение | α | β |
|------------|----------|---------|
| 14a,b | 6,11 | 5,89 |
| 15a,b | 6,08 | 5,92 |
| 16a,b | 6,09 | 5,90 |
| 17a,b | 6,05 | 5,92 |
| 18a,b | 6,11 | 5,93 |

Корреляцию между химическим сдвигом аномерных протонов и абсолютной структурой проверяют, сравнивая показатели соединений 18a (Niihata, S., Ebata, T., Kawakami, H., Matsushida, H. Bull. Chem.

Soc. Jpn. 1995, 68, 1509) и 18b (Aerschot, A.V., Herdewijn, P., Balzarini, J., Pauwels, R., De Clercq, E., J. Med. Chem. 1989, 32, 1743) с ранее опубликованными спектральными данными и при помощи рентгеноструктурного исследования соединений 14b и 15b. Это открытие противоречит обычной тенденции, характерной для нуклеозидов, в соответствии с которой α -аномер обычна является менее полярным из двух аномеров. Предполагается, что у 2'-фторированных нуклеозидов со слабопольным сдвигом сильный диполь связи C-F противоположен диполю аномерной связи C-N в β -изомере и уменьшает общий молекулярный диполь. И наоборот, геометрия α -аномера позволяет усилить молекулярный диполь в результате добавления диполей связи C-F и C-N. Таким образом, в случае α -2'-фторнуклеозидов α -аномер является более полярным, чем β -изомер.

α - и β -Аномеры соединений 17a и 17b нельзя разделить хроматографией на колонках, так как из-за наличия свободной аминогруппы нуклеозиды образуют полосы на силикагеле. Поэтому необходимо использовать N⁴-ацетилцитозин для получения соединения 11 и последующего разделения соединений 16a и 16b. N⁴-ацетильную группу количественно удаляют насыщенным раствором аммиака в метаноле, что позволяет разделить соединения 17a и 17b. Аномеры 15a и 15b можно легко разделить, используя 5-фторцитозин в качестве основания (соединение 10), при этом на силикагеле отсутствуют полосы.

Из десяти нуклеозидов, приведенных в табл. 2, ранее были синтезированы только соединения 17b (Martin, J.A., Bushnell, D.J., Duncan, I.B., Dunsdon, S.J.; Hall, M.J., Machin, P.J., Merritt, J.H., Parkes, K.E.B., Roberts, N.A., Thomas, G.J., Galpin, S.A., Kinchington, D., J. Med. Chem. 1990, 33(8), 2137; Zenchoff, G.B., Sun, R., Okabe, M., J. Org. Chem. 1991, 56, 4392), 18a (Niihata, S., Ebata, T., Kawakami, H., Matsushida, H. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1995, 68, 1509) и 18b (Aerschot, A.V., Herdewijn, P., Balzarini, J., Pauwels, R., De Clercq, E. J. Med. Chem. 1989, 32, 1743). Подобно многочисленным известным аналогам 2'- β или фторнуклеозидов с расположением атома фтора вверх от плоскости кольца¹⁴ они синтезированы из природных предшественников (т.е. имеют β -D-конфигурацию). По-видимому, в научной литературе ранее не были описаны β -L-2'-фторрибофуранозилнуклеозиды.

Фтор обычно вводят в эти молекулы путем нуклеофильной атаки на ангидронуклеозид (Mengel, R., Guschlauer, W. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1978, 17, 525) или путем замещения и превращения стереохимически фиксированной гидроксильной группы при помощи трифторида диэтиламиносеры (DAST) (Herdewijn, P., Aerschot, A.V., Kettmans, L., Nucleosides Nucleotides 1989, 8(1), 65). Преимуществом способа по настоящему изобретению является то, что для введения фтора не требуется гидроксильная группа. Таким образом, этот способ не ограничивается использованием природных нуклеозидов или сахаров в качестве исходных веществ и позволяет легко получить неприродные энантиомеры 2'-фторнуклеозидов.

В соответствии с этой схемой синтезировано несколько неприродных нуклеозидов с использованием D-глутаминовой кислоты 19 в качестве исходного вещества (схема 3). Предшественник кольца сахара 20 фторируют так, как это описано выше, и подвергают реакции сочетания с разными силицированными основаниями (табл. 4).

Схема 3

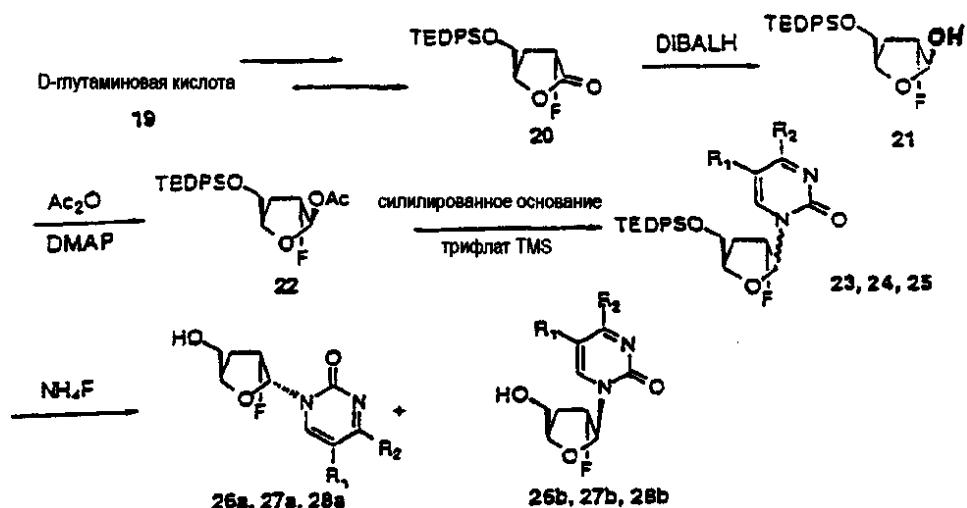
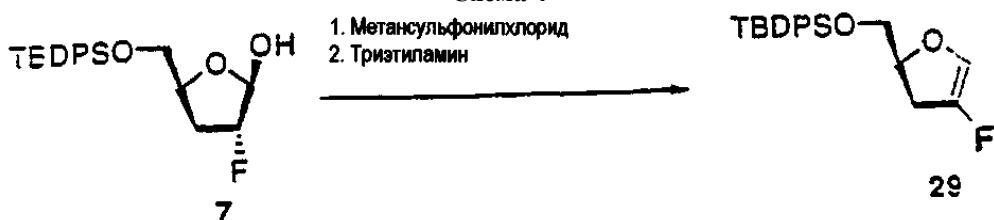


Таблица 4

Выходы неприродных аналогов нуклеозидов

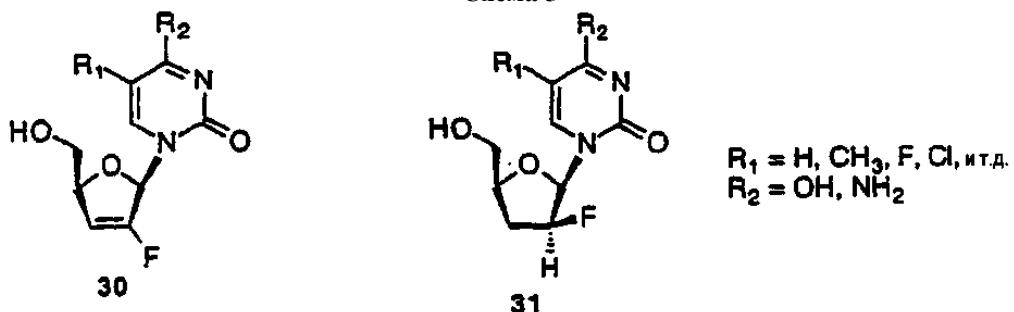
| Соединение | Выход (23-25) | R ₁ | R ₂ | a | Выход | b | Выход |
|------------|------------------|-----------------|-----------------|-----|-------|-----|-------|
| 23 | 87% | CH ₃ | OH | 26a | 24% | 26b | 61% |
| 24 | 85% | F | OH | 27a | 35% | 27b | 51% |
| 25 | 99% | F | NH ₂ | 28a | 34% | 28b | 52% |

Схема 4



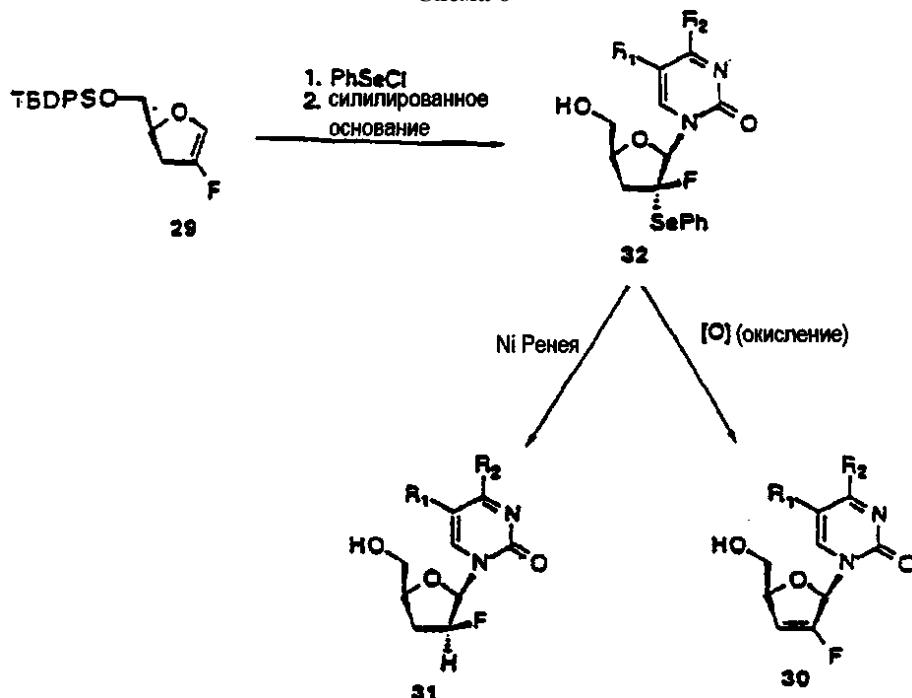
Успешный синтез соединения 29, показанного на схеме 4, позволяет получить две категории нуклеозидов. Первый класс составляют соединения, известные как 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-2,2'-фторнуклеозиды (соединение 30), и второй класс образуют фтор- или арабиносодержащие аналоги с положением заместителей "вверх" (соединение 31) нуклеозидов, показанных на схеме 5

Схема 5



Соединения 30 и 31 можно синтезировать из общего промежуточного соединения 32, которое получают селенилированием фторгликаля 29

Схема 6

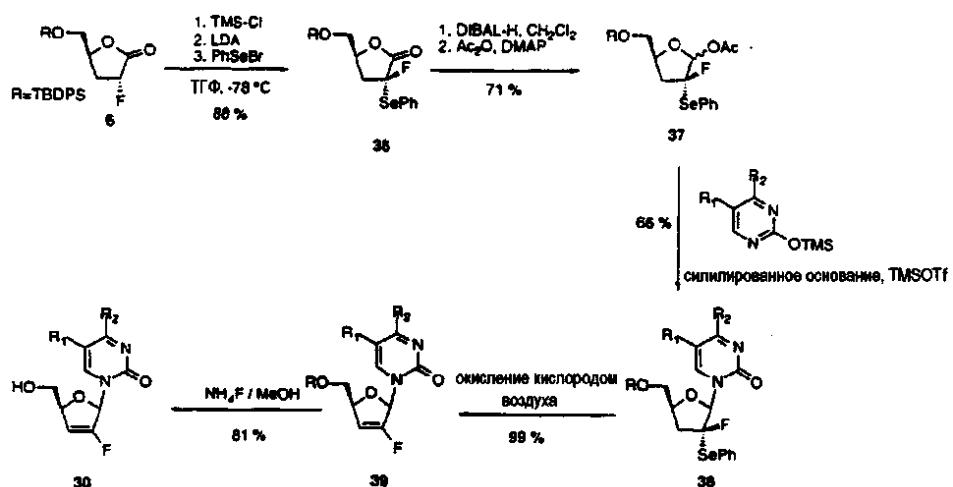


Селенилированное соединение 32 можно превратить во фторсодержащий аналог 31 с положением атома фтора "вверх" в результате восстановления никелем Ренея. Альтернативно окисление селенида 32 при помощи NaIO_4 или перекисью водорода и последующее элиминирование промежуточного селеноксида при нагревании позволяют получить соединение 30. Оба эти превращения нефторированных систем хорошо описаны в научной литературе (Wurster, J.A., Ph.D. Thesis, Emory University, 1995; Wilson, L.J., Ph.D. Thesis, Emory University, 1992).

Кроме того, можно также синтезировать энантиомеры нуклеозидов 30 и 31, так как их получают из энантиомера соединения 29.

Альтернативный способ получения соединений типа соединения 30 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-2'-фторнуклеозидов показан на схеме 7. Этот простой и прямой способ получения данного класса соединений с использованием ряда силилированных оснований оказался весьма успешным.

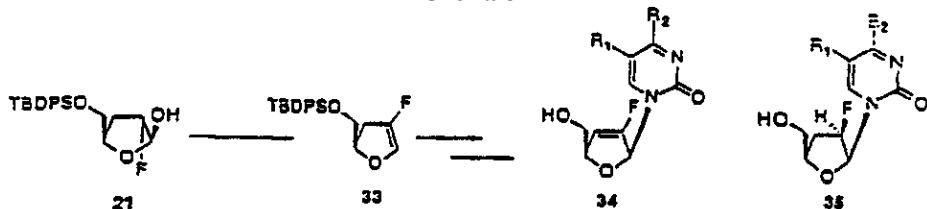
Схема 7



Получение силилкетенацетала из соединения 6 делает возможным стереоизбирательное введение бромида фенилселения с образованием соединения 36 в виде одного изомера.

Восстановление и ацетилирование этого соединения происходит легко и обеспечивает высокий выход соединения 37 в результате выполнения двух стадий. α -Ориентация фенилселенильной группой делает возможной стереоизбирательность на последующей стадии гликозилирования, и синтез β -изомера нуклеозида 38 происходит с хорошим выходом. Соединение 38 может быть окислено перекисью водорода в дихлорметан с получением продукта элиминирования 39, но опыт работы заявителей показывает, что достаточно адсорбировать соединение 38 силикагелем и оставить выстаиваться на несколько часов, после чего соединение 39 можно элюировать из колонки почти с количественным выходом. Удаление защищенной группы из соединения 39 с получением конечного соединения 30 выполняют в соответствии с приведенным выше описанием, что дает хороший выход (81%) целевого нуклеозида.

Схема 8



Тот же порядок химических превращений, который был использован для синтеза соединений 30 и 31, можно использовать для синтеза соединений 34 и 35.

Экспериментальная часть

Общие способы получения

N-Фтор-(бис)бензолсульфонимид 5 фирмы Allied Signal использовали без дополнительной очистки. Все другие реагенты были предоставлены фирмой Aldrich Chemical Company и использовались без дополнительной очистки. Температуры плавления измеряли в устройстве для определения точки плавления вещества в капилляре Thomas Hoover, и полученные значения не корректировали. Инфракрасные спектры (ИКС) были получены в спектрометре Nicolet Impact 400 FT-IR. Спектры ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР определяли в спектрометре NT-360 или Varian 400 МГц. Пластиинки для тонкослойной хроматографии (TCX) изготовлены из силикагеля 60 F₂₅₄ (толщиной 0,25 мм) фирмы EM Science. Флеш-хроматографию выполняли на силикагеле 60 (230-400 меш. по стандарту ASTM) фирмы EM Science. Все реакции осуществляли в высушенней пламенем стеклянной посуде в атмосфере сухого аргона. Растворители удаляли испарением в роторном испарителе. Элементные анализы выполнены фирмой Atlantic Microlab, Inc., Atlanta, GA.

(2S,4R)-5-(трет-Бутилдифенилсилокси)-2-фторпентан-4-олид (20).

В колбу вводят (4R)-5-(трет-бутилдифенилсилокси)пентан-4-олид (20,0 г, 0,564 моль, 1,0 экв.) и N-фтор-(бис)бензолсульфонимид (NFSi) 5 (17,80 г, 0,0564 моль, 1,0 экв.) в 250 мл безводного ТГФ. Раствор охлаждают до -78°C, и 68,0 мл (0,0680 моль, 1,2 экв.) 1,0М раствора LiHMDS в ТГФ добавляют по каплям в течение 1 ч. Полученную смесь перемешивают при температуре -78°C в течение еще 2 ч, нагревают до комнатной температуры и перемешивают еще 1 ч. После окончания реакции реакционную смесь гасят 10 мл насыщенного раствора NH₄Cl. Смесь разбавляют тремя объемами диэтилового эфира и выливают в равный объем насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой дважды промывают насыщенным раствором NaHCO₃ и один раз насыщенным раствором NaCl. Органический слой сушат над MgSO₄, фильтруют и концентрируют до образования светло-желтого масла. Полученное масло очищают хроматографией на колонках из силикагеля, используя систему растворителей, состоящую из 30% диэтилового эфира/70% гексанов. Полученное белое твердое вещество кристаллизуют из горячих гексанов, что дает 13,04 г (выход 62%) прозрачного кристаллического твердого вещества: R_f (30% диэтилового эфира/70% гексанов)=0,26; т.пл.115-116°C.

¹H ЯМР (360 МГц, CDCl₃) δ 7,63-7,60 (м, 4H), 7,45-7,35 (м, 6H), 5,49 (дт, J=52,9 и 7,9 Гц, 1H), 4,69 (д, J=9,36 Гц, 1H), 3,91 (д, J=11,5 Гц, 1H), 3,60 (д, J=11,5 Гц, 1H), 2,72-2,40 (м, 2H), 1,05 (с, 9H).

¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 172,1 (д, J=20,5 Гц), 135,5, 135,4, 132,3, 131,7, 130,1, 128,0, 127,9, 85,6 (д, J=186,6 Гц), 77,3 (д, J=5,3 Гц), 65,0, 31,8 (д, J=20,5 Гц), 26,7, 19,1. ИКС (тонкая пленка) 2958, 1796, 1252, 1192, 1111, 1016 см⁻¹.

Масс-спектрометрия высокого разрешения (MCBP), высчитано для [M+Li] C₂₁H₂₅O₃FSiLi: 379,1717.

Обнаружено: 379,1713.

Элементный анализ, высчитано для CHAFFS: C, 67,71; H, 6,76.

Обнаружено: C, 67,72; H, 6,78.

5-O-(трет-Бутилдифенилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-(L)-эритронпентофураноза (21).

В колбу вводят лактон 20 (12,12 г, 0,0325 моль, 1,0 экв.) и 240 мл безводного ТГФ. Раствор охлаждают до температуры -78°C, и 65 мл (0,065 моль, 2,0 экв.) 1,0М раствора DIBALH в гексанах добавляют по каплям в течение 30 мин. Полученную смесь перемешивают при температуре -78°C в течение 3 ч и гасят, медленно добавляя 2,93 мл (0,163 моль, 5,0 экв.) воды. Реакционную смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 1 ч, в результате чего в колбе образуется прозрачное желеобразное твердое вещество. Реакционную смесь разбавляют двумя объемами диэтилового эфира и выливают в равный объем насыщенного водного раствора тартрата калия-натрия в колбе Эрленмейера. Полученную смесь перемешивают в течение 20 мин до разрушения эмульсии. Органический слой отделяют, и водный слой трижды экстрагируют 250 мл диэтилового эфира. Объединенные органические слои сушат над MgSO₄, фильтруют и концентрируют до образования светло-желтого масла. Полученный продукт очищают хроматографией на колонках из силикагеля, используя систему растворителей, состоящую из гексанов/этилацетата (6:1). Полученное прозрачное масло кристаллизуют из кипящих гексанов, что дает 11,98 г (выход 98%) белого кристаллического твердого вещества: R_f (30% диэтилового эфира/70% гексанов)=0,33; т.пл. 66-67°C.

¹H ЯМР (360 МГц, CDCl₃) δ 7,68-7,66 (м, 4H), 7,55-7,38 (м, 6H), 5,39 (т, J=7,6 Гц, 1H), 4,99 (дд, J=52,2 и 4,3 Гц, 1H), 4,52 (м, 1H), 3,88 (дд, J=10,8 и 2,5 Гц, 1H), 3,65 (д, J=7,9 Гц, 1H), 3,49 (дд, J=7,9 и 1,8 Гц, 1H), 2,44-2,07 (м, 2H), 1,07 (с, 9H).

¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 135,7, 135,5, 132,2, 132,1, 130,2, 130,0, 129,8, 127,9, 127,7, 99,8 (д, J=31,1 Гц), 96,6 (д, J=178,3 Гц), 79,4, 64,8, 29,9 (д, J=21,2 Гц), 26,8, 19,2. ИКС (тонкая пленка) 3423, 2932, 1474, 1362, 1113 см⁻¹.

MCBP, высчитано для [M+Li] C₂₁H₂₇O₃FSiLi: 381,1874.

Обнаружено: 381,1877.

Элементный анализ, высчитано для C₂₁H₂₇O₃FSi: C, 67,35; H, 7,27.

Обнаружено: C, 67,42; H, 7,31.

1-O-Ацетил-5-O-(трет-бутилдифенилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-(L)-эритронпентофураноза (22).

В колбу вводят лактон 21 (8,50 г, 0,0227 моль, 1,0 экв.) и 170 мл безводного CH₂Cl₂. Затем добавляют DMAP (0,277 г, 0,00277 моль, 0,1 экв.) и уксусный ангидрид (13,5 мл, 0,143 моль, 6,3 экв.) и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. После окончания реакции реакционную смесь выливают в насыщенный раствор NaHCO₃. Органический слой отделяют, и водный слой трижды экстрагируют хлороформом. Объединенные органические слои сушат над MgSO₄, фильтруют, и удаляют растворитель с получением светло-желтого масла. Полученное масло очищают хроматографией на колонках из силикагеля, используя систему растворителей, состоящую из гексанов/этилацетата (8:1), что дает 9,85 г (выход 99%) прозрачного бесцветного масла: R_f (30% диэтилового эфира/70% гексанов)=0,44.

¹H ЯМР (360 МГц, CDCl₃) δ 7,69-7,67 (м, 4H), 7,43-7,38 (м, 6H), 6,30 (д, J=10,4 Гц, 1H), 5,06 (д, J=54,9 Гц, 1H), 4,53 (м, 1H), 3,81 (дд, J=10,8 и 4,3 Гц, 1H), 3,72 (дд, J=10,8 и 4,3 Гц, 1H), 2,38-2,12 (м, 2H), 1,89 (с, 3H), 1,07 (с, 9H).

¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 169,4, 135,6, 135,5, 133,2, 133,1, 129,8, 129,7, 127,8, 127,7, 99,3 (д, J=34,1 Гц), 95,5 (д, J=178,2 Гц), 81,4, 65,3, 31,6 (д, J=20,5 Гц), 26,8, 21,1, 19,3. ИКС (тонкая пленка) 3074,

2860, 1750, 1589, 1229, 1113 cm^{-1} .

МСВР, высчитано для $[\text{M}-\text{OCOCH}_3] \text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{FSi}$: 357,1686.

Обнаружено: 357,1695.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{FSi}$: C, 66,32; H, 7,02.

Обнаружено: C, 66,30; H, 7,04.

Типичный способ сочетания силилированного основания с соединением 22: (L)-5'-O-(трет-бутилдифенилсилил)-2',3-дидезокси-2'-фтор-5-фторцитидин (25).

В колбу, оснащенную насадкой для молекулярной перегонки, вводят 5-фторцитозин (2,01 г, 15,6 ммоль, 5,0 экв.), 35 мл 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазана (HMDS) и катализитическое количество (~1 мг) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Белую суспензию нагревают до температуры кипения в течение 1 ч до силилирования основания и превращения реакционной смеси в прозрачный раствор. Избыток HMDS отгоняют, и оставшийся масляный остаток помещают в вакуум на 1 ч, чтобы удалить последние следы HMDS. Полученное белое твердое вещество растворяют в атмосфере аргона в 5 мл безводного 1,2-дихлорэтана. К этому прозрачному раствору добавляют раствор ацетата 22 (1,30 г, 3,12 ммоль, 1,0 экв.) в 5 мл безводного 1,2-дихлорэтана. К полученной смеси добавляют при комнатной температуре триметилсилилтрифторметансульфонат (3,32 мл, 17,2 ммоль, 5,5 экв.). Ход реакции контролируют ТСХ (10% метанола/90% CH_2Cl_2), по результатам которой реакция заканчивается через 4 ч. Реакционную смесь выливают в насыщенный раствор NaHCO_3 . Органический слой отделяют, и водный слой трижды экстрагируют хлороформом. Объединенные органические слои сушат над MgSO_4 , фильтруют, и удаляют растворитель с получением белой пены. Полученное соединение очищают хроматографией на колонках из силикагеля, используя градиентную систему растворителей от 100% CH_2Cl_2 до 10% метанола в CH_2Cl_2 . Соединение выделяют в виде 1,51 г (выход 99%) белой пены: смесь аномеров R_f (100% EtOAc)=0,36; т.пл. 74-80°C.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) d 8,84 (шс, 1H), 8,04 (д, 33,4 Гц, 0,67 H), 7,67-7,63 (м, 4H), 7,51-7,39 (м, 6,33H), 6,11 (д, $J=20$ Гц, 0,33H), 5,98 (д, $J=16,4$ Гц, 0,67H), 5,88 (шс, 1H), 5,41 (д, $J=52,4$ Гц, 0,33H), 5,23 (дд, $J=50,4$ и 4 Гц, 0,67H), 4,56 (м, 0,33H), 4,45 (м, 0,67H), 4,23 (дд, $J=12,0$ и 1,6 Гц, 0,67H), 3,89 (дд, $J=11,2$ и 3,2 Гц, 0,33H), 3,74-3,66 (м, 1H), 2,45-1,96 (м, 2H), 1,09 (с, 6H), 1,06 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) d 158,6 (д, $J=14,4$ Гц), 158,4 (д, $J=14,4$ Гц), 153,9, 153,8, 136,6 (д, $J=240,5$ Гц), 136,3 (д, $J=239,7$ Гц), 135,6, 135,56, 135,5, 135,4, 133,1, 132,9, 132,5, 132,4, 130,1, 130,0, 129,9, 127,9, 127,8, 125,8 (д, $J=33,4$ Гц), 124,6 (д, $J=32,6$ Гц), 96,5 (д, $J=182,0$ Гц), 91,7 (д, $J=185,1$), 90,7 (д, $J=35,6$ Гц), 87,7 (д, $J=15,2$ Гц), 81,5, 79,5, 64,9, 63,0, 33,5 (д, $J=20,5$ Гц), 30,6 (д, $J=20,4$ Гц), 26,9, 26,8, 19,22, 19,18. ИКС (тонкая пленка) 3300, 2960, 1682, 1608, 1513, 1109 cm^{-1} .

МСВР, высчитано для $[\text{M}+\text{Li}] \text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3\text{SiF}_2\text{Li}$: 492,2106.

Обнаружено: 492,2085.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3\text{SiF}_2 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 60,71; H, 6,11; N, 8,50.

Обнаружено: C, 60,67; H, 6,03; N, 8,44.

Типичный способ удаления защитной группы из силилзащищенных нуклеозидов: α - и β -(L)-2',3'-дидезокси-2'-фтор-5-фторцитидин (28a и 28b).

Нуклеозид 25 (1,098 г, 2,26 ммоль, 1,0 экв.) растворяют в 15 мл метанола, в который добавляют фторид аммония (0,838 г, 22,6 ммоль, 10,0 экв.). Полученную смесь интенсивно перемешивают в течение 24 ч и выполняют ТСХ (15% этанола/85% этилацетата), результаты которой показывают, что реакция закончена. Реакционную смесь разбавляют тремя объемами этилацетата и фильтруют через небольшой слой (1 см) силикагеля. Слой промывают 200 мл раствора 15% этанола/85% этилацетата, и удаляют растворитель с получением белой пены. Полученное соединение очищают хроматографией на колонках из силикагеля, используя систему растворителей, состоящую из 15% этанола/85% этилацетата, которая также влияет на разделение α - и β -аномеров. Выход α -аномера в виде белой пены равен 0,190 г (0,768 ммоль, выход 34%) и выход β -аномера в виде белой пены равен 0,290 г (1,17 ммоль, выход 52%): (28a) R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,22; т.пл. 199-203°C (разложение).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) d 7,78 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 6,07 (д, $J=19,2$ Гц, 1H), 5,37 (д, $J=54,0$ Гц, 1H), 4,60 (м, 1H), 3,80 (дд, $J=12,0$ и 3,2 Гц, 1H), 3,56 (дд, $J=12,4$ и 4,4 Гц, 1H), 2,40-2,00 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, DMCO-d_6) d 157,7 (д, $J=13,6$ Гц), 153,2, 135,9 (д, $J=239,0$ Гц), 126,2 (д, $J=31,1$ Гц), 92,4 (д, $J=183,6$ Гц), 86,7 (д, $J=15,2$ Гц), 79,6, 62,7, 33,3 (д, $J=20,5$ Гц). ИКС (КВр) 3343, 3100, 1683, 1517, 1104 cm^{-1} .

МСВР, высчитано для $[\text{M}+\text{Li}] \text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_2\text{Li}$: 254,0929.

Обнаружено: 254,0919.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_2 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 42,19; H, 4,72; N, 16,40.

Обнаружено: C, 42,44; H, 4,56; N, 16,56. (28b) R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,37; т.пл. 182-186°C (разложение).

^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) d 8,32 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,79 (шс, 1H), 7,53 (шс, 1H), 5,81 (д, $J=16,8$ Гц, 1H), 5,37 (т, $J=4,8$ Гц), 5,18 (дд, $J=51,6$ и 3,2 Гц, 1H), 4,32 (м, 1H), 3,88 (дд, $J=12,0$ и 2,8 Гц, 1H), 3,59 (дд, $J=12,4$ и 2,4 Гц, 1H), 2,20-1,99 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, DMCO-d_6) d 157,7 (д, $J=13,7$ Гц), 153,2, 136,1 (д, $J=237,4$ Гц), 125,3 (д,

J=33,4 Гц), 97,3 (д, J=176,8 Гц), 89,9 (д, J=35,7 Гц), 81,6, 60,2, 30,3 (д, J=19,7 Гц). ИКС (KBr) 3487, 2948, 1678, 1509, 1122 cm^{-1} .

MCBР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_2\text{Li}$: 254,0929.

Обнаружено: 254,0935.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_2$: C, 43,73; H, 4,49; N, 17,00.

Обнаружено: C, 43,69; H, 4,53; N, 16,92.

(D)-5'-O-(трет-Бутилдифенилсилил)-2',3'-дидезокси-2'-фтор-5-фторуридин (9).

Смесь аномеров R_f (гексаны/EtOAc, 1:1)=0,48; т.пл. 65-70°C.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) d 10,0 (шм, 1Н), 7,99 (д, J=5,6 Гц, 0,63Н), 7,65 (м, 4Н), 7,42 (м, 6,37Н), 6,12 (дд, J=18,0 и 1,6 Гц, 0,37Н), 6,00 (д, J=16 Гц, 0,63Н), 5,37 (дд, J=54,6 и 2,4 Гц, 0,37Н), 5,22 (дд, J=50,4 и 4 Гц, 0,63Н), 4,57 (м, 0,37Н), 4,44 (м, 0,63Н), 4,22 (дд, J=12,2 и 2,0 Гц, 0,63Н), 3,92 (дд, J=11,2 и 3,2 Гц, 0,37Н), 3,70 (м, 1Н), 2,22 (м, 2Н), 1,09 (с, 5,67Н), 1,074 (с, 3,33Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) d 157,2 (д, J=31,7 Гц), 157,1 (д, J=25,8 Гц), 149,1, 148,8, 140,4 (д, J=236,6 Гц), 140,1 (д, J=235,2 Гц), 135,6, 135,5, 135,4, 132,9, 132,7, 132,4, 132,3, 130,1, 130,0, 129,9, 127,9, 127,8, 125,1 (д, J=34,9 Гц), 123,6 (д, J=34,1 Гц), 96,4 (д, J=182,0 Гц), 92,0 (д, J=185,9 Гц), 90,2 (д, J=37,2 Гц), 87,0 (д, J=15,2 Гц), 81,7, 79,8, 64,8, 63,0, 33,3 (д, J=21,2 Гц), 31,0 (д, J=21,2 Гц), 26,9, 26,8, 19,2. ИКС (тонкая пленка) 3185, 1722, 1117 cm^{-1} .

MCBР, высчитано для [M+1] $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{SiF}_2$: 487,1866.

Обнаружено: 487,1853.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{SiF}_2$: C, 61,71; H, 5,80; N, 5,76.

Обнаружено: C, 61,72; H, 5,86; N, 5,72.

(D)-5'-O-(трет-Бутилдифенилсилил)-2',3'-дидезокси-2'-фтор-5-фторцитидин (10).

Смесь аномеров R_f (100% EtOAc)=0,36; т.пл. 75-81°C.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) d 8,50 (шм, 1Н), 8,05 (д, J=6,0 Гц, 0,67Н), 7,67-7,63 (м, 4Н), 7,51-7,39 (м, 6,33Н), 6,10 (д, J=20 Гц, 0,33Н), 5,98 (д, J=16,4 Гц, 0,67Н), 5,62 (шм, 1Н), 5,41 (д, J=52,4 Гц, 0,33Н), 5,23 (дд, J=51,6 и 4 Гц, 0,67Н), 4,57 (м, 0,33Н), 4,48 (м, 0,67Н), 4,24 (дд, J=12,4 и 2,0 Гц, 0,67Н), 3,89 (дд, J=11,2 и 3,2 Гц, 0,33Н), 3,74-3,66 (м, 1Н), 2,39-1,95 (м, 2Н), 1,09 (с, 6Н), 1,06 (с, 3Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) d 158,4 (д, J=14,4 Гц), 158,3 (д, J=15,2 Гц), 153,8, 153,7, 136,5 (д, J=240,5 Гц), 136,2 (д, J=241,8 Гц), 135,59, 135,56, 135,4, 133,0, 132,9, 132,5, 132,4, 130,1, 130,0, 129,9, 127,9, 127,8, 124,8 (д, J=31,9 Гц), 96,5 (д, J=181,3 Гц), 91,8 (д, J=175,2 Гц), 90,7 (д, J=24,9 Гц), 87,8 (д, J=21,2 Гц), 81,6, 79,6, 64,9, 63,0, 33,5 (д, J=19,7 Гц), 30,6 (д, J=21,3 Гц), 26,9, 26,8, 19,2, 14,2. ИКС (тонкая пленка) 3304, 2959, 1680, 1621, 1508, 1105 cm^{-1} .

MCBР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{SiF}_2\text{Li}$: 492,2106.

Обнаружено: 492,2110.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3\text{SiF}_2$: C, 61,84; H, 6,02; N, 8,65.

Обнаружено: C, 61,86; H, 6,09; N, 8,55.

(D)-N⁴-Ацетил-5'-O-(трет-бутилдифенилсилил)-2',3'-дидезокси-2'-фторцитидин (11).

Смесь аномеров R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,75; т.пл. 81-86°C.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) d 10,58 (шс, 1Н), 8,40 (д, J=7,2 Гц, 0,61Н), 7,86 (д, J=7,6 Гц, 0,38Н), 7,67-7,65 (м, 4Н), 7,51-7,41 (м, 6Н), 7,27 (д, J=8,4 Гц, 1Н), 6,12 (т, J=15,8 Гц, 1Н), 5,51 (д, J=52,6 Гц, 0,38Н), 5,21 (дд, J=50,8 и 2,9 Гц, 0,61Н), 4,62 (м, 0,38Н), 4,54 (м, 0,61Н), 4,28 (д, J=11,5 Гц, 0,61Н), 3,95 (дд, J=11,9 и 3,2 Гц, 0,38Н), 3,79-3,70 (м, 1Н), 2,46-2,04 (м, 5Н), 1,12 (с, 5,49Н), 1,07 (с, 3,42Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) d 171,5, 171,3, 163,4, 154,9, 144,9, 144,1, 135,5, 135,4, 133,0, 132,8, 132,5, 132,2, 130,2, 130,1, 129,9, 128,0, 127,8, 96,8 (д, J=91,1 Гц), 96,2 (д, J=147,9 Гц), 92,3, 91,2 (д, J=35,7 Гц), 90,5, 88,5 (д, J=15,9 Гц), 81,9, 80,1, 64,7, 62,9, 33,5 (д, J=20,5 Гц), 30,5 (д, J=20,5 Гц), 26,9, 26,8, 24,9, 24,8, 19,3, 19,2. ИКС (тонкая пленка) 3237, 2932, 1722, 1671, 1559, 1493, 1107 cm^{-1} .

MCBР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{FSiLi}$: 516,2306.

Обнаружено: 516,2310.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{FSi}$: C, 63,63; H, 6,33; N, 8,24.

Обнаружено: C, 63,45; H, 6,42; N, 8,09.

(D)-5'-O-(трет-Бутилдифенилсилил)-2',3'-дидезокси-2'-фторцитидин (12).

Смесь аномеров R_f (15% EtOH, 85% EtOAc) 0,50; т.пл. 98-104°C.

^1H ЯМР (360 МГц, CDCl_3) d 7,97 (д, J=7,2 Гц, 0,64Н, H-6), 7,65 (м, 4Н), 7,47-7,38 (м, 6,36Н), 6,15 (д, J=20,5 Гц, 0,36Н), 6,05 (д, J=16,6 Гц, 0,64Н), 5,83 (д, J=7,9 Гц, 0,36Н), 5,46 (д, J=7,2 Гц, 0,64Н), 5,30-5,10 (м, 1Н), 4,55 (м, 0,36Н), 4,44 (м, 0,64Н), 4,22 (д, J=9,7 Гц, 0,64Н), 3,88-3,63 (м, 1,36Н), 2,38-1,95 (м, 2Н), 1,09 (с, 5,76Н), 1,06 (с, 3,24Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) d 166,1, 155,8, 141,5, 140,5, 135,6, 135,4, 133,1, 132,9, 132,8, 132,4, 130,1, 130,0, 129,8, 128,0, 127,9, 127,8, 96,7 (д, J=181,3 Гц), 93,4 (д, J=140,3 Гц), 94,5, 90,8 (д, J=35,6 Гц), 90,8, 87,8 (д, J=15,9 Гц), 81,2, 79,4, 65,0, 63,2, 33,7 (д, J=21,2 Гц), 30,8 (д, J=20,4 Гц), 26,9, 26,8, 19,3, 19,2. ИКС (тонкая пленка) 3470, 3339, 1644, 1487, 1113 cm^{-1} .

MCBР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3\text{FSiLi}$: 474,2201.

Обнаружено: 474,2198.

Элементный анализ, высчитано для $C_{25}H_{30}N_3O_3FSi$: C, 64,21; H, 6,47; N, 8,99.

Обнаружено: C, 64,04; H, 6,58; N, 8,76.

α -(D)-2',3'-Дидезокси-2'-фтор-5-фторуридин (14a).

R_f (100% EtOAc)=0,38; т.пл.153-155°C.

1H ЯМР (360 МГц, CD_3OD) d 7,80 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 6,11 (д, $J=18,7$ Гц, 1H), 5,35 (д, $J=52,9$ Гц, 1H), 4,59 (м, 1H), 3,81 (д, $J=11,9$ Гц, 1H), 3,57 (дд, $J=12,6$ и 3,6 Гц, 1H), 2,36-2,15 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 159,6 (д, $J=25,8$ Гц), 150,7, 141,5 (д, $J=230,6$ Гц), 127,0 (д, $J=34,9$ Гц), 93,9 (д, $J=185,1$ Гц), 88,5 (д, $J=15,1$ Гц), 81,8, 64,3, 34,3 (д, $J=20,5$ Гц). ИКС (КBr) 3421, 3081, 1685, 1478, 1111 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_9H_{10}N_2O_4F_2Li$: 255,0769.

Обнаружено: 255,0778.

Элементный анализ, высчитано для $C_9H_{10}N_2O_4F_2$: C, 43,56; H, 4,06; N, 11,29.

Обнаружено: C, 43,59; H, 4,11; N, 11,17.

β -(D)-2',3'-Дидезокси-2'-фтор-5-фторуридин (14b).

R_f (100% EtOAc)=0,54; т.пл.152-154°C.

1H ЯМР (360 МГц, CD_3OD) d 8,41 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 5,89 (д, $J=16,6$ Гц, 1H), 5,21 (дд, $J=51,5$ и 3,6 Гц, 1H), 4,41 (м, 1H), 4,00 (д, $J=12,6$ Гц, 1H), 3,67 (д, $J=12,2$ Гц, 1H), 2,25-2,09 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 159,7 (д, $J=25,8$ Гц), 150,7, 141,8 (д, $J=229,8$ Гц), 126,3 (д, $J=36,4$ Гц), 98,3 (д, $J=179$ Гц), 91,9 (д, $J=37,1$ Гц), 83,6, 61,9, 31,9 (д, $J=20,5$ Гц). ИКС (КBr) 3417, 3056, 1684, 1474, 1105 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_9H_{10}N_2O_4F_2Li$: 255,0769.

Обнаружено: 255,0764.

Элементный анализ, высчитано для $C_9H_{10}N_2O_4F_2$: C, 43,56; H, 4,06; N, 11,29.

Обнаружено: C, 43,37; H, 3,98; N, 11,22.

α -(D)-2',3'-Дидезокси-2'-фтор-5-фторцитидин (15a).

R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,22; т.пл.198-202°C (разложение).

1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) d 7,78 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 6,07 (д, $J=18,8$ Гц, 1H), 5,37 (д, $J=54,0$ Гц, 1H), 4,59 (м, 1H), 3,80 (дд, $J=12,0$ и 3,2 Гц, 1H), 3,57 (дд, $J=12,4$ и 4,4 Гц, 1H), 2,38-2,14 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 159,9 (д, $J=13,6$ Гц), 156,5, 138,3 (д, $J=240,4$ Гц), 127,5 (д, $J=33,4$ Гц), 93,6 (д, $J=184,3$ Гц), 89,5 (д, $J=15,9$ Гц), 81,8, 64,4, 34,5 (д, $J=20,5$ Гц). ИКС (КBr) 3486, 3098, 1681, 1519, 1108 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_9H_{11}N_3O_3F_2Li$: 254,0929.

Обнаружено: 254,0929.

Элементный анализ, высчитано для $C_9H_{10}N_3O_3F_2 \cdot 1/2H_2O$: C, 42,19; H, 4,72; N, 16,40.

Обнаружено: C, 41,86; H, 4,75; N, 16,36.

β -(D)-2',3'-Дидезокси-2'-фтор-5-фторцитидин (15b).

R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,37; т.пл.181-183°C (разложение).

1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) d 8,45 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 5,92 (дд, $J=16,2$ и 1,2 Гц, 1H), 5,18 (дд, $J=50,8$ и 4,0 Гц, 1H), 4,46 (м, 1H), 4,05 (дд, $J=12,4$ и 2,4 Гц, 1H), 3,72 (дд, $J=12,8$ и 2,4 Гц, 1H), 2,27-2,05 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 159,9 (д, $J=13,6$ Гц), 156,5, 138,5 (д, $J=240,5$ Гц), 126,9 (д, $J=33,4$ Гц), 98,4 (д, $J=179,0$ Гц), 92,5 (д, $J=36,4$ Гц), 83,6, 61,9, 31,6 (д, $J=20,5$ Гц). ИКС (КBr) 3494, 2944, 1689, 1522, 1106 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_9H_{11}N_3O_3F_2Li$: 254,0929.

Обнаружено: 254,0936.

Элементный анализ, высчитано для $C_9H_{11}N_3O_3F_2$: C, 43,73; H, 4,49; N, 17,00.

Обнаружено: C, 43,84; H, 4,47; N, 17,05.

α -(D)-N⁴-Ацетил-2',3'-дидезокси-2'-фторцитидин (16a).

R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,40; т.пл.208-212°C.

1H ЯМР (360 МГц, $DMCO-d_6$) d 10,91 (шс, 1H), 8,05 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 7,25 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,08 (дд, $J=19,1$ и 2,9 Гц, 1H), 5,42 (д, $J=52,2$ Гц, 1H), 4,97 (шс, 1H), 4,54 (м, 1H), 3,63 (д, $J=13,0$ Гц, 1H), 3,47 (д, $J=13,3$ Гц, 1H), 2,35-2,15 (м, 2H), 2,11 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, $DMCO-d_6$) d 171,0, 162,6, 154,3, 145,7, 94,9, 92,0 (д, $J=183,6$ Гц), 87,5 (д, $J=15,9$ Гц), 80,2, 62,6, 33,3 (д, $J=19,7$ Гц), 24,4. ИКС (КBr) 3436, 3227, 1702, 1661, 1442, 1102 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_{11}H_{14}N_3O_4FLi$: 278,1128.

Обнаружено: 278,1136.

Элементный анализ, высчитано для $C_{11}H_{14}N_3O_4F$: C, 48,71; H, 5,20; N, 15,49.

Обнаружено: C, 48,73; H, 5,23; N, 15,52.

β -(D)-N⁴-Ацетил-2',3'-дидезокси-2'-фторцитидин (16b).

R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,50; т.пл. 174-178°C.

1H ЯМР (360 МГц, $DMCO-d_6$) d 10,90 (шс, 1H), 8,46 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 7,18 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 5,90 (д, $J=16,9$ Гц, 1H), 5,27 (д, $J=52,9$ Гц, 1H), 5,27 (шс, 1H), 4,39 (м, 1H), 3,88 (д, $J=13,0$ Гц, 1H), 3,61 (д,

$J=13,0$ Гц, 1Н), 2,09 (с, 3Н), 2,20-1,85 (м, 2Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО- d_6) d 171,0, 162,6, 154,4, 144,7, 97,0 (д, $J=177,5$ Гц), 95,0, 90,7 (д, $J=36,6$ Гц), 82,2, 60,3, 30,3 (д, $J=19,7$ Гц), 24,3. ИКС (KBr) 3447, 3245, 1703, 1656, 1497, 1122 cm^{-1} . МСВР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4\text{FLi}$: 278,1128. Обнаружено: 278,1133. Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4\text{F}$: С, 48,71; Н, 5,20; Н, 15,49. Обнаружено: С, 48,65; Н, 5,22; Н, 15,46.

α -(D)-2',3'-Дидезокси-2'-фторцитидин (17а).

R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,08; т.пл.234-237°C (разложение).

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) d 7,52 (д, $J=7,6$ Гц, 1Н), 7,21 (шм, 2Н), 6,05 (дд, $J=20,4$ и 3,2 Гц, 1Н), 5,73 (д, $J=7,2$ Гц, 1Н), 5,28 (д, $J=52,4$ Гц, 1Н), 4,93 (т, $J=5,6$ Гц, 1Н), 4,45 (м, 1Н), 3,58 (м, 1Н), 3,43 (м, 1Н), 2,26-2,13 (м, 2Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО- d_6) d 165,8, 155,0, 141,6, 93,3, 92,2 (д, $J=182,8$ Гц), 86,6 (д, $J=15,1$ Гц), 79,4, 62,8, 33,3 (д, $J=19,7$ Гц). ИКС (KBr) 3366, 3199, 1659, 1399, 1122 cm^{-1} .

МСВР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{FLi}$: 236,1023.

Обнаружено: 236,1014.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}$: С, 47,16; Н, 5,28; Н, 18,33.

Обнаружено: С, 47,40; Н, 5,34; Н, 18,51.

β -(D)-2',3'-Дидезокси-2'-фторцитидин (17б).

Нуклеозид 25 (0,160 г, 0,59 ммоль) растворяют в 10 мл насыщенного раствора аммиака в метаноле. Полученный раствор перемешивают в течение 5 мин, и реакцию прекращают. Раствор аммиака в метаноле удаляют, полученное белое твердое вещество помещают в вакуум и осторожно нагревают на водяной бане с температурой 60°C в течение 2 ч, чтобы удалить сублимацией побочный продукт ацетамида. Белое твердое вещество кристаллизуют из 5% метанола/95% метиленхлорида, что дает количественный выход белого кристаллического твердого вещества. R_f (15% EtOH, 85% EtOAc)=0,18; т.пл.191-195°C (разложение).

^1H ЯМР (360 МГц, CD_3OD) d 8,10 (д, $J=7,2$ Гц, 1Н), 5,92 (д, $J=17,3$ Гц, 1Н), 5,82 (д, $J=7,6$ Гц, 1Н), 5,13 (д, $J=50,0$ Гц, 1Н), 4,39 (м, 1Н), 3,97 (д, $J=12,2$ Гц, 1Н), 3,68 (дд, $J=13,0$ и 2,5 Гц, 1Н), 2,21-2,00 (м, 2Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 165,9, 155,0, 140,8, 97,3 (д, $J=176,8$ Гц), 93,6, 90,3 (д, $J=35,6$ Гц), 81,3, 60,7, 31,0 (д, $J=20,5$ Гц). ИКС (KBr) 3397, 3112, 1680, 1400, 1178, 1070 cm^{-1} .

МСВР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{FLi}$: 236,1024.

Обнаружено: 236,1028.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}$: С, 47,16; Н, 5,28; Н, 18,33.

Обнаружено: С, 47,01; Н, 5,21; Н, 18,29.

(L)-5'-O-(трет-Бутилдифенилсилил)-2',3'-дидезокси-2'-фортимидин (23).

Смесь аномеров R_f (10% MeOH/90% CH_2Cl_2)=0,56; т.пл.61-65°C.

^1H ЯМР (360 МГц, CDCl_3) d 9,48 (шс, 1Н), 7,67 (м, 4Н), 7,45-7,37 (м, 7Н), 6,15 (дд, $J=20,2$ и 3,2 Гц, 0,36Н), 5,99 (д, $J=18,4$ Гц, 0,64Н), 5,34 (д, $J=51,8$ Гц, 0,36Н), 5,24 (дд, $J=52,2$ и 4,3 Гц, 0,64Н), 4,59 (м, 0,36Н), 4,45 (м, 0,64Н), 4,17 (дд, $J=12,2$ и 2,5 Гц, 0,64Н), 3,91 (дд, $J=11,9$ и 2,9 Гц, 0,36Н), 3,81 (дд, $J=11,5$ и 2,9 Гц, 0,64Н), 3,68 (дд, $J=10,8$ и 3,6 Гц, 0,36Н), 2,40-2,12 (м, 2Н), 1,94 (с, 1,08Н), 1,61 (с, 1,92Н), 1,10 (с, 5,76Н), 1,07 (с, 3,24Н).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) d 164,1, 164,0, 150,4, 150,2, 136,4, 135,6, 135,5, 135,4, 135,3, 135,2, 133,0, 132,8, 132,6, 130,1, 130,0, 129,9, 127,94, 127,90, 127,8, 110,8, 109,8, 96,4 (д, $J=181,3$ Гц), 92,1 (д, $J=185,8$ Гц), 90,7 (д, $J=36,4$ Гц), 86,6 (д, $J=15,2$ Гц), 80,9, 79,4, 64,9, 63,6, 33,4 (д, $J=20,5$ Гц), 32,0 (д, $J=21,2$ Гц), 27,0, 26,8, 19,4, 19,2, 12,6, 12,2. ИКС (тонкая пленка) 3183, 3050, 1696, 1506, 1188 cm^{-1} .

МСВР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{SiF}$: 489,2197.

Обнаружено: 489,2175.

Элементный анализ, высчитано для $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{SiF}$: С, 64,71; Н, 6,47; Н, 5,80.

Обнаружено: С, 64,88; Н, 6,56; Н, 5,76.

(L)-5'-O-(трет-Бутилдифенилсилил)-2',3'-дидезокси-2'-фтор-5-фторуридин (24).

Смесь аномеров R_f (гексаны/EtOAc, 1:1)=0,48; т.пл. 65-71°C.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) d 9,08 (шс, 0,4Н), 9,00 (шс, 0,6Н), 8,01 (д, $J=5,4$ Гц, 0,6Н), 7,65 (м, 4Н), 7,42 (м, 6,4Н), 6,10 (дд, $J=20,2$ и 1,4 Гц, 0,4Н), 6,00 (д, $J=16,0$ Гц, 0,6Н), 5,35 (дд, $J=52,4$ и 1,6 Гц, 0,4Н), 5,22 (дд, $J=51,2$ и 4 Гц, 0,6Н), 4,57 (м, 0,4Н), 4,44 (м, 0,6Н), 4,22 (дд, $J=12,4$ и 2,0 Гц, 0,6Н), 3,91 (дд, $J=11,2$ и 2,9 Гц, 0,4Н), 3,70 (м, 1Н), 2,45-2,00 (м, 2Н), 1,09 (с, 5,4Н), 1,07 (с, 3,6Н). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) d 156,9 (д, $J=26,5$ Гц), 148,8, 148,6, 140,3 (д, $J=236,7$ Гц), 140,1 (д, $J=235,1$ Гц), 135,6, 135,5, 135,4, 132,9, 132,7, 132,4, 132,3, 130,2, 130,1, 129,9, 127,9, 127,8, 125,1 (д, $J=34,9$ Гц), 123,6 (д, $J=34,2$ Гц), 96,4 (д, $J=182,9$ Гц), 92,0 (д, $J=186,6$ Гц), 90,2 (д, $J=36,0$ Гц), 86,9 (д, $J=15,1$ Гц), 81,7, 79,8, 64,8, 63,0, 33,2 (д, $J=20,5$ Гц), 30,9 (д, $J=20,4$ Гц), 26,9, 26,8, 19,2. ИКС (тонкая пленка) 3191, 1719, 1113 cm^{-1} .

МСВР, высчитано для [M+Li] $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{SiF}_2\text{Li}$: 493,1946.

Обнаружено: 493,1952.

Элементный анализ, высчитано для $C_{25}H_{28}N_2O_4SiF_2$: C, 61,71; H, 5,80; N, 5,76.

Обнаружено: C, 61,73; H, 5,83; N, 5,77.

α -(L)-2',3'-Дидезокси-2'-фтортиимидин (26a).

R_f (100% EtOAc)=0,25; т.пл.147-149°C.

1H ЯМР (360 МГц, CD_3OD) d 7,45 (c, 1H), 6,11 (дд, J=19,4 и 2,9 Гц, 1H), 5,30 (д, J=53,6 Гц, 1H), 4,58 (м, 1H), 3,79 (дд, J=12,2 и 2,2 Гц, 1H), 3,55 (дд, J=12,2 и 3,6 Гц, 1H), 2,40-2,15 (м, 2H), 1,87 (c, 3H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 166,6, 152,3, 138,6, 110,5, 93,9 (д, J=185,1 Гц), 88,3 (д, J=15,1 Гц), 81,7, 64,4, 34,5 (д, J=20,5 Гц), 12,6. ИКС (KBr) 3436, 3166, 1727, 1667, 1362, 1186 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_{10}H_{13}N_2O_4FLi$: 251,1019.

Обнаружено: 251,1014.

Элементный анализ, высчитано для $C_{10}H_{13}N_2O_4F$: C, 49,18; H, 5,37; N, 11,47.

Обнаружено: C, 49,32; H, 5,40; N, 11,29.

β -(L)-2',3'-Дидезокси-2'-фтортиимидин (26b).

R_f (100% EtOAc) = 0,38; т.пл. 186-188°C.

1H ЯМР (360 МГц, CD_3OD) d 7,94 (c, 1H), 5,93 (д, J=17,6 Гц, 1H), 5,20 (д, J=51,8 Гц, 1H), 4,40 (м, 1H), 3,98 (д, J=11,9 Гц, 1H), 3,68 (д, J=13,0 Гц, 1H), 2,37-2,10 (м, 2H), 1,83 (c, 3H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 166,7, 152,3, 138,2, 111,0, 98,4 (д, J=178,3 Гц), 92,1 (д, J=36,4 Гц), 83,1, 62,4, 32,5 (д, J=20,5 Гц), 12,6. ИКС (KBr) 3478, 3052, 1684, 1363, 1192, 1005 cm^{-1} .

Элементный анализ, высчитано для $C_{10}H_{13}N_2O_4F$: C, 49,18; H, 5,37; N, 11,47.

Обнаружено: C, 49,29; H, 5,44; N, 11,36.

α -(L)-2',3'-Дидезокси-2'-фтор-5-фторуридин (27a).

R_f (100% EtOAc)=0,38; т.пл.155-157°C.

1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) d 7,80 (д, J=6,8 Гц, 1H), 6,13 (д, J=20,0 Гц, 1H), 5,35 (д, J=54,4 Гц, 1H), 4,63 (м, 1H), 3,81 (дд, J=11,9 и 3,2 Гц, 1H), 3,58 (дд, J=12,4 и 2,0 Гц, 1H), 2,41-2,15 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 159,6 (д, J=25,8 Гц), 150,7, 141,5 (д, J=230,6 Гц), 127,0 (д, J=34,9 Гц), 93,9 (д, J=184,3 Гц), 88,5 (д, J=15,1 Гц), 81,9, 64,3, 34,3 (д, J=20,5 Гц). ИКС (KBr) 3401, 3098, 1661, 1458, 1018 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_9H_{10}N_2O_4F_2Li$: 255,0769.

Обнаружено: 255,0771.

Элементный анализ, высчитано для $C_9H_{10}N_2O_4F_2$: C, 43,56; H, 4,06; N, 11,29.

Обнаружено: C, 43,70; H, 4,17; N, 11,15.

β -(L)-2',3'-Дидезокси-2'-фтор-5-фторуридин (27b).

R_f (100% EtOAc)=0,54; т.пл. 153-156°C.

1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) d 8,46 (д, J=6,8 Гц, 1H), 5,94 (д, J=16,4 Гц, 1H), 5,25 (дд, J=51,6 и 4,0 Гц, 1H), 4,41 (м, 1H), 4,05 (дд, J=12,8 и 2,4 Гц, 1H), 3,72 (дд, J=12,4 и 2,4 Гц, 1H), 2,34-2,09 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CD_3OD) d 159,7 (д, J=25,8 Гц), 150,7, 141,8 (д, J=230,6 Гц), 126,3 (д, J=35,7 Гц), 98,3 (д, J=184,6 Гц), 91,9 (д, J=36,4 Гц), 83,6, 61,9, 31,9 (д, J=20,5 Гц). ИКС (KBr) 3482, 3037, 1702, 1654, 1402, 1103 cm^{-1} .

MCBP, высчитано для $[M+Li] C_9H_{10}N_2O_4F_2Li$: 255,0769.

Обнаружено: 255,0764.

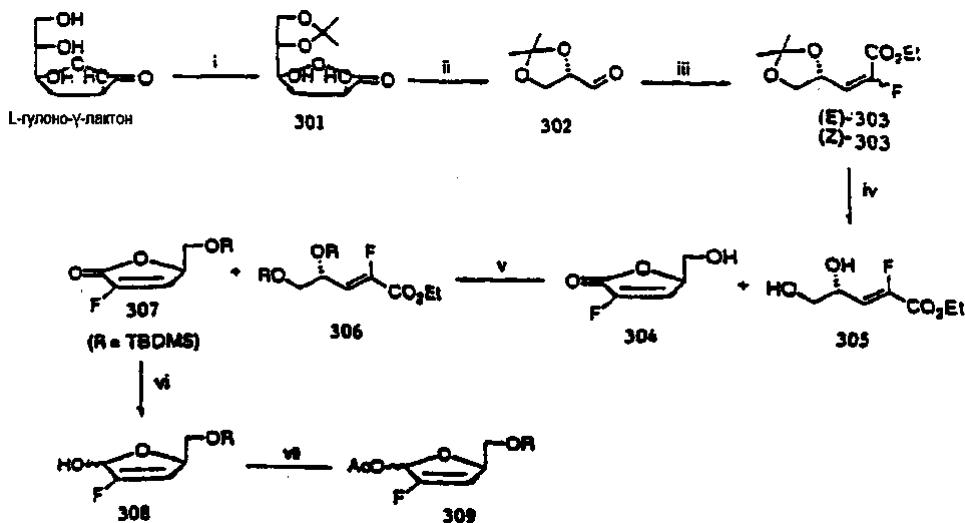
Элементный анализ, высчитано для $C_9H_{10}N_2O_4F_2$: C, 43,56; H, 4,06; N, 11,29.

Обнаружено: C, 43,59; H, 4,06; N, 11,17.

Получение L-2'-фтор-2',3'-ненасыщенных нуклеозидов.

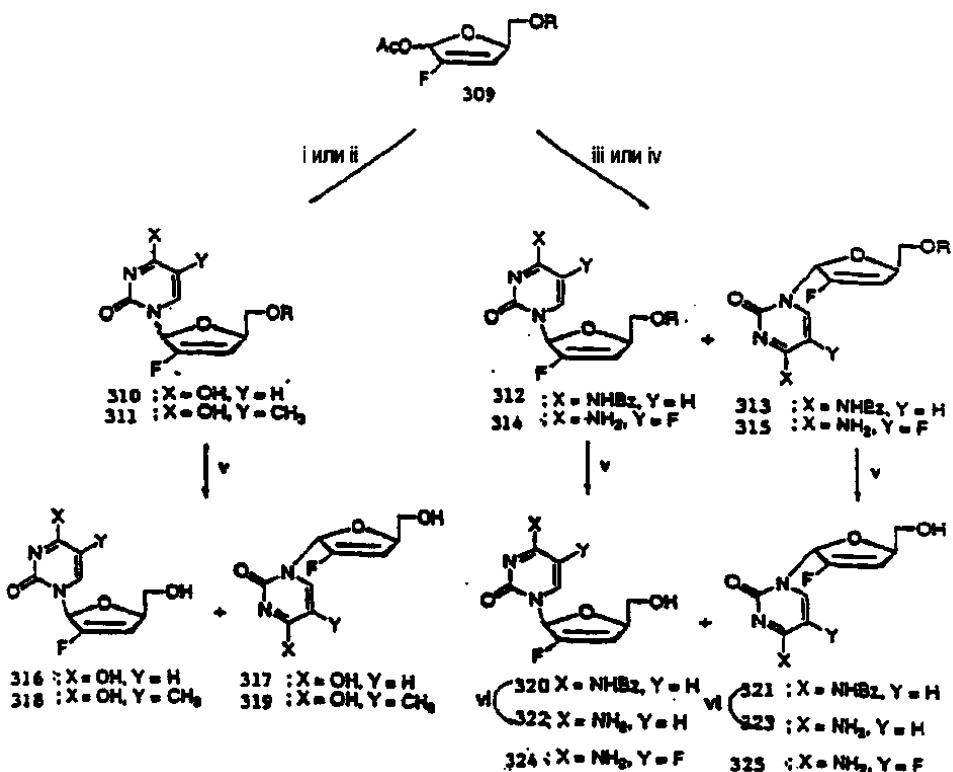
В настоящее время разработан второй простой метод синтеза ненасыщенных 2'-фторнуклеозидов, который описан ниже. Этот метод синтеза включает взаимодействие защищенного пиримидинового или пуринового основания с основным промежуточным соединением 309 в присутствии кислоты Льюиса, как это показано на схеме 9. В табл. 5, 6 приведены типичные соединения, полученные в соответствии с этим методом синтеза.

Схема 9

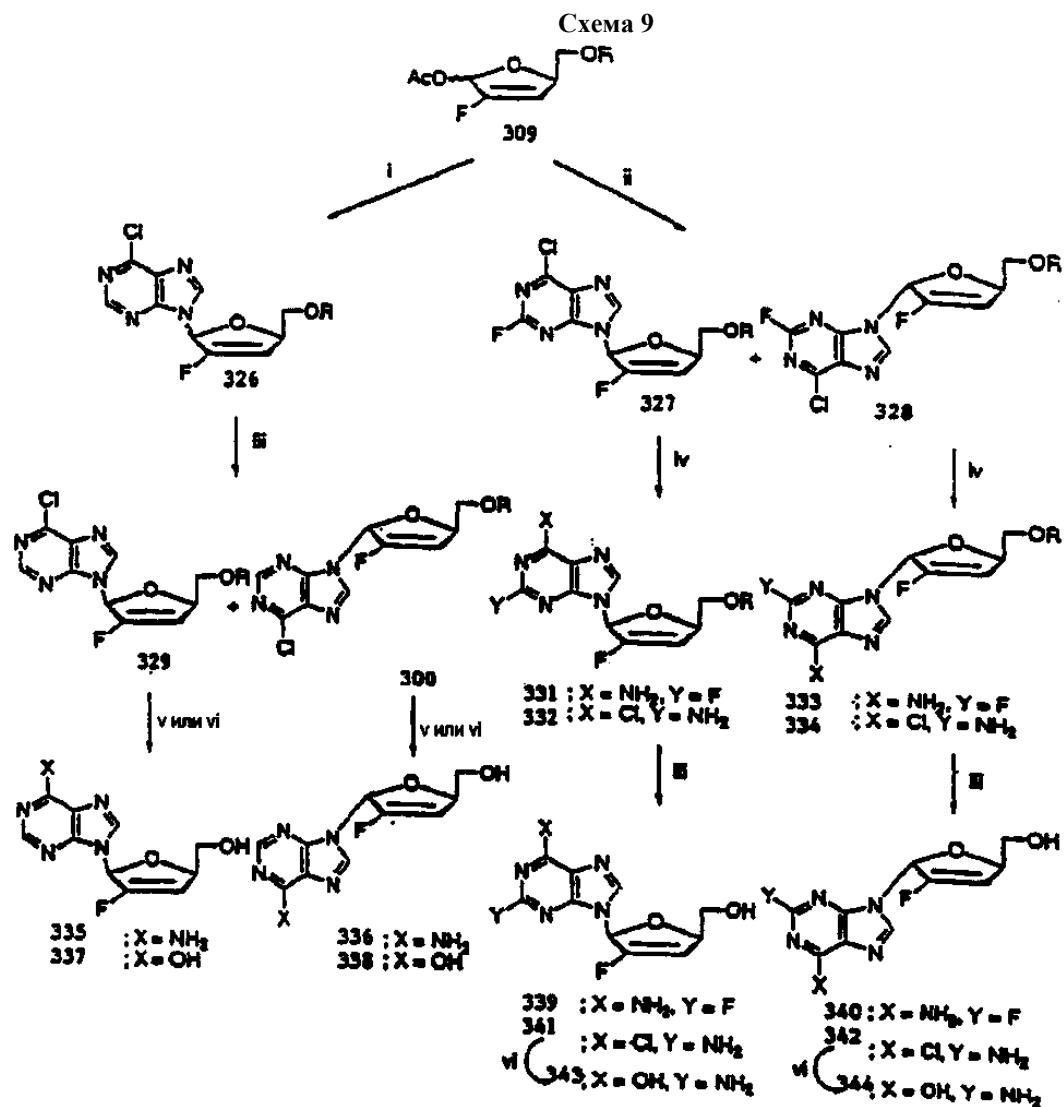


Реагенты: (i) 2-метоксипропен, ДМФ, п-TsOH, (ii) NaIO₄, H₂O, (iii) (EtO)₂P(O)CHFCO₂Et, NaHMDS, ТГФ, -78°C, (iv) с-HCl, EtOH, (v) TBDMSCl, имидазол, CH₂Cl₂, (vi) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78°C, (vii) Ac₂O, пиридин, CH₂Cl₂.

Схема 9



Реагенты: (i) силилированный урацил, TMSOTf, DCE, (ii) силилированный тимин, TMSOTf, DCE, (iii) силилированный N₄-Bz-цитозин, TMSOTf, CH₃CN, (iv) 5-F-цитозин, TMSOTf, CH₃CN, (v) TBAF, CH₃CN, (vi) NH₃/MeOH.



Реагенты: (i) силилированный 6-Cl-пурин, TMSOTf, DCE, (ii) силилированный 6-Cl-2-F-пурин, TMSOTf, (iii) TBAF, CH₃CN, (iv) NH₃/DME, (v) NH₃/MeOH, 90°C, (vi) HSCH₂CH₂OH, NaOMe, MeOH, нагревание с обратным холодильником.

| No. | H-1' | H-3' | H-4' | H-4' | H-5' | ДРУГИЕ |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|------|----------|--------|
| 10 ^a | 6.09 (m) | 5.72 (m) | 4.37 (m), 4.09 (m) | | 3.00 (m) | |
| 11 ^a | 6.06 (s), 6.87 (m) | 5.73 (s), 5.88 (s) | 4.88 (m), 4.74 (m) | | 3.76 (m) | |
| 12 ^a | 7.12 (s) | 5.61 (s) | 4.84 (s) | | 3.08 (m) | |
| 13 ^a | 7.08 (s) (s) | 5.75 (s) | 5.05 (ps, t, J = 4.4, 2.8 Hz) | | 3.76 (m) | |
| 14 ^a | | | | | | |
| 15 ^a | | | | | | |
| 16 ^a | 6.77 (s) | 8.01 (s) | 4.81 (s) | | 3.58 (s) | |
| 17 ^a | 6.77 (s, J = 4.4 Hz) | 8.02 (s, t, J = 1.2 Hz) | 5.02 (ps, t, J = 4, 4.4 Hz) | | 3.50 (m) | |
| 18 ^a | 6.77 (s) | 8.00 (s) | 4.80 (s) | | 3.60 (s) | |
| 19 ^a | 6.78 (ps, t, J = 4, 4.4 Hz) | 8.01 (s) | 5.05 (t, J = 4 Hz) | | 3.51 (m) | |
| 20 ^a | 7.01 (s) | 5.71 (s) | 4.90 (s) | | 3.68 (m) | |
| 21 ^a | 7.16 (ps, t, J = 3.6, 4.4 Hz) | 5.74 (s) | 5.19 (ps, t, J = 3.2, 4.8 Hz) | | 3.79 (m) | |
| 22 ^a | 6.85 (s) | 5.84 (d, J = 1.2 Hz) | 4.76 (s) | | 3.55 (s) | |
| 23 ^a | 6.86 (s, t, J = 4.4, 4.8 Hz) | 5.84 (d, J = 1.8 Hz) | 4.84 (m) | | 3.40 (m) | |
| | | | | | | |

^aCDCl₃, ^bDMSO-*d*₆

| No. | H-1' | H-3' | H-4' | H-5' | Другие | |
|-----------------|--------------------|----------------------|-------------------------|----------|---|--|
| | | | | | | |
| 39 ^a | 6.80 (s) | 6.00 (s) 1.84 (s) | 4.90 (s) | 3.82 (m) | 7.38 (s, H-8), 7.92 (2m s, NH ₂), 5.05 (l, J = 5.6 Hz, OH) | |
| 40 ^a | 6.82 (m) | 6.07 (s, J = 1.2 Hz) | 5.12 (m) | 3.85 (m) | 8.30 (s, H-8), 7.93 (2s, NH ₂) | |
| 41 ^a | 6.78 (s) | 6.09 (s) | 4.91 (s) | 3.80 (q) | 8.38 (s, H-8), 7.07 (s, NH ₂), 5.10 (s, OH) | |
| 42 ^a | 6.72 (l, J = 4 Hz) | 6.08 (s, J = 1.2 Hz) | 5.16 (m, J = 3.6, 4 Hz) | 3.80 (m) | 8.30 (s, H-8), 7.04 (s, NH ₂), 4.98 (l, J = 8 Hz, OH) | |
| 43 ^a | 6.80 (s) | 6.03 (s, J = 1.2 Hz) | 4.96 (s) | 3.80 (q) | 10.74 (2m s, NH ₂), 8.96 (s, H-8), 8.57 (s, NH ₂), 5.08 (l, J = 5.2 Hz, OH) | |
| 44 ^a | 6.82 (m) | 6.01 (s, J = 1.8 Hz) | 5.00 (m) | 3.80 (m) | 7.82 (s, H-8), 6.67 (s, NH ₂), 4.85 (s, J = 5.6 Hz, OH) | |

^aDMSO-*d*₆

Таблица 5

| № | т.п. °С (растворитель) ^а | [a] _D , градусы | формула | анализ |
|----|-------------------------------------|--------------------------------------|---|---------|
| 10 | сироп | | C ₁₅ H ₂₃ FN ₂ O ₄ Si | C, H, N |
| 11 | сироп | | C ₁₆ H ₂₅ FN ₂ O ₄ Si | C, H, N |
| 12 | 144-146(А) | -20,47 (с 0,36, CHCl ₃) | C ₂₂ H ₂₈ FN ₃ O ₄ Si | C, H, N |
| 13 | 139-141(А) | +157,68 (с 0,31, CHCl ₃) | C ₂₂ H ₂₈ FN ₃ O ₄ Si | C, H, N |
| 14 | сироп | | | C, H, N |
| 15 | сироп | | | C, H, N |
| 16 | 161-162 (C) | -13,412 (с 0,20, MeOH) | C ₉ H ₉ FN ₂ O ₄ 0,3H ₂ O | C, H, N |
| 17 | 136-137 (E) | +138,55 (с 0,14, MeOH) | C ₉ H ₉ FN ₂ O ₄ 0,2H ₂ O | C, H, N |
| 18 | 149-151 (D) | -30,44 (с 0,20, MeOH) | C ₁₆ H ₁₅ FN ₂ O ₅ | C, H, N |
| 19 | 116-118 (E) | +132,42 (с 0,25, MeOH) | C ₁₆ H ₁₃ FN ₂ O ₅ | C, H, N |
| 20 | 200-202 разложение (C) | -54,89 (с 0,39, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O ₄ | C, H, N |
| 21 | 170-172 (C) | +136,38 (с 0,45, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O ₄ 0,3H ₂ O | C, H, N |
| 22 | 198-200 разложение (B) | -21,31 (с 0,25, MeOH) | C ₉ H ₁₀ FN ₃ O ₃ 4H ₂ O | C, H, N |
| 23 | 120-121 (E) | +159,15 (с 0,21, MeOH) | C ₉ H ₁₀ FN ₃ O ₃ | C, H, N |
| 24 | сироп | | | C, H, N |
| 25 | сироп | | | C, H, N |
| 26 | сироп | | C ₁₆ H ₂₂ FClN ₅ O ₂ Si | C, H, N |
| 27 | пена | +9,80 (с 0,20, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₂₁ F ₂ ClN ₄ O ₂ Si | C, H, N |
| 28 | сироп | +139,67 (с 0,18, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₂₁ F ₂ ClN ₄ O ₂ Si | C, H, N |
| 29 | | | | C, H, N |
| 30 | пена | | | C, H, N |
| 31 | 180-182 (A) | +13,33 (с 0,54, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₂₃ F ₂ N ₅ O ₂ Si 0,2 ацетон | C, H, N |
| 32 | 129-130 (A) | +90,22 (с 0,23, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₂₃ FClN ₅ O ₂ Si | C, H, N |
| 33 | 184-186 (A) | +116,53 (с 0,13, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₂₃ F ₂ N ₅ O ₂ Si 0,3 ацетон | C, H, N |
| 34 | 128-130 (A) | +89,87 (с 0,15, CHCl ₃) | C ₁₆ H ₂₃ FClN ₅ O ₂ Si | C, H, N |
| 35 | 188-189 (C) | -54,91 (с 0,17, MeOH) | C ₁₀ H ₁₀ FN ₅ O ₂ 0,2H ₂ O | C, H, N |
| 36 | 169-171 (C) | +160,62 (с 0,19, MeOH) | C ₁₀ H ₁₀ FN ₅ O ₂ 0,3MeOH | C, H, N |
| 37 | 128-130 (E) | -50,21 (с 0,20, MeOH) | C ₁₀ H ₉ FN ₄ O ₃ 0,2H ₂ O | C, H, N |
| 38 | >200 разложение (C) | +169,60 (с 0,20, MeOH) | C ₁₀ H ₉ FN ₄ O ₃ 0,3H ₂ O | C, H, N |
| 39 | 185-188 разложение (B) | -56,15 (с 0,16, MeOH) | | C, H, N |
| 40 | 180 разложение (B) | +178,22 (с 0,10, MeOH) | | C, H, N |
| 41 | 155-156 разложение (B) | +10,64 (с 0,17, MeOH) | | C, H, N |
| 42 | 150-152 (B) | +142,49 (с 0,17, MeOH) | | C, H, N |
| 43 | >200 разложение (B) | +24,42 (с 0,10, ДМФ) | | C, H, N |
| 44 | >210 разложение (B) | +58,68 (с 0,10, ДМФ) | | C, H, N |

^aРастворители; А; EtOAc-гексаны, В; CH₂Cl₂-MeOH, С; CHCl₃-MeOH, D; ТГФ-циклогексан, Е; лиофилизованный.

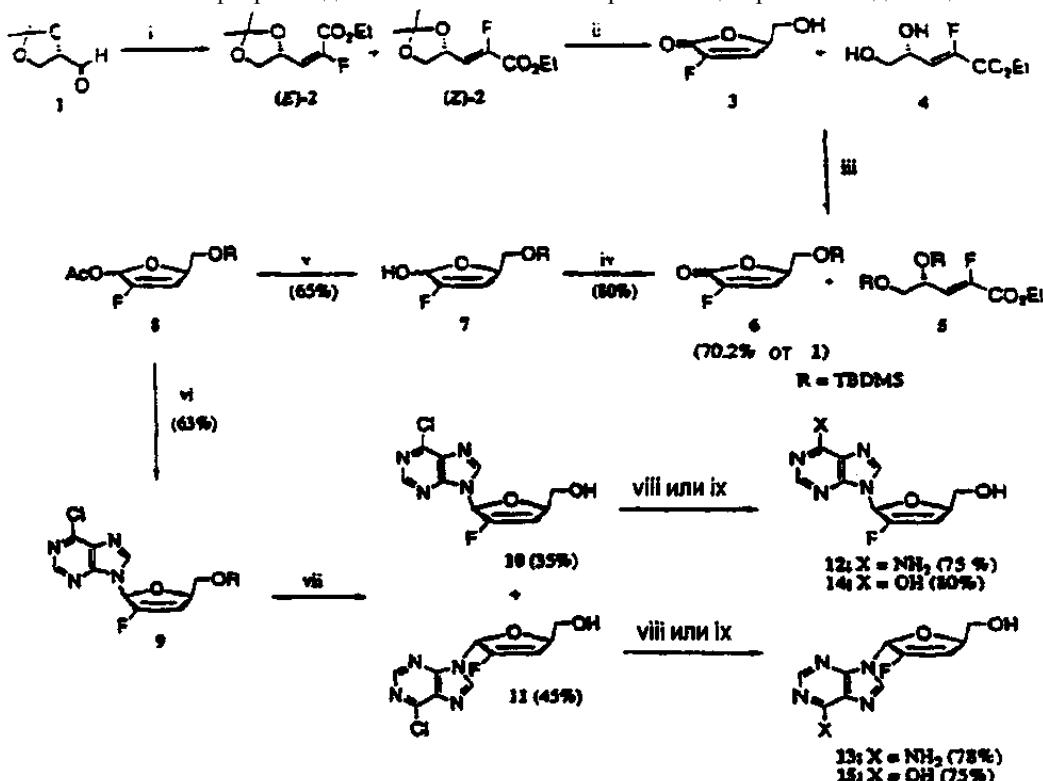
Синтез 2',3'-ненасыщенных D-нуклеозидов ранее осуществляли при помощи реакции элиминирования, используя в качестве исходного вещества легко доступный аналог нуклеозида, который представляет собой модификацию отдельных нуклеозидов с длинной цепью. Некоторые исследователи сообщили о получении D-2'-фтор-2',3'-ненасыщенных пиримидиннуклеозидов путем элиминирования приемлемых аналогов 2'-фторированных нуклеозидов (Martin, J.A., et al., J. Med. Chem. 1990, 33, 2137-2145; Stezycki,

R.Z., et al., J. Med. Chem. 1990, 33, 2150-2157). Однако этот метод синтеза L-Fd4N связан с дополнительными трудностями получения L-нуклеозидов в качестве исходного вещества. Можно привести всего несколько примеров синтеза 2',3'-ненасыщенных пуриннуклеозидов прямой конденсацией, что обусловлено неустойчивостью фрагмента 2,3-ненасыщенного сахара в условиях сочетания в присутствии кислоты Льюиса, за исключением одного случая получения аналога пиримидина, в котором использовано тиофенильное промежуточное соединение (Abdel-Medied, A.W.-S., et al. Synthesis 1991, 313-317; Sujino, K., et al., Tetrahedron Lett. 1996, 37, 6133-6136). Предполагается, что в отличие от фрагмента 2,3-ненасыщенного сахара 2-фтор-2,3-ненасыщенный сахар, который характеризуется более высокой устойчивостью гликозильной связи во время конденсации с гетероциклом, более пригоден для выполнения прямой реакции сочетания. Таким образом, в качестве предшественника для основного промежуточного соединения 508 выбран (R)-2-фторбутенолид 506, который получают из L-глицеральдегидакетонида 501.

Получают смесь (E)-502/(Z)-2 (9:1 по результатам ^1H ЯМР), используя в качестве исходного вещества L-глицеральдегидакетонид и выполняя реакцию Хорнера-Эммонса в присутствии триэтил- α -фторфосфоноацетата и бис(триметилсilyл)амида натрия в ТГФ (Thenappan, A., et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 4639-4642; Morikawa, T., et al., Chem. Pharm. Bull. 1992, 40, 3189-3193; Patrick, T.B., et al., J. Org. Chem. 1994, 59, 1210-1212). Из-за трудностей, связанных с разделением изомеров (E)-502/(Z)-502, при осуществлении последующей реакции циклизации в кислотных условиях используют смеси, что дает требуемый лактон 503 и нециклизованный диол 504. Полученную смесь превращают в силиллактон 506 и восстанавливают при помощи DIBAL-H в CH_2Cl_2 при температуре 78°C, что дает лактон 507. Лактон 507 обрабатывают уксусным ангидридом с получением основного промежуточного соединения 508, которое конденсируют силированным 6-хлорпурином в условиях реакции Ворбургена, что дает смеси аномеров 509. Обработка смеси 509 соединением TBAF в ТГФ позволяет получить свободные нуклеозиды 510 и 511, которые можно легко разделить хроматографией на колонках из силикагеля. Аналоги аденина 512 и 513 получают в результате обработки соответственно соединений 510 и 511 меркаптоэтанолом и NaOMe в стальном автоклаве при 90°C. В результате обработки соединений 510 и 511 меркаптоэтанолом и NaOMe получают соответственно аналоги инозина 514 и 515. Стереохимические характеристики этих соединений определены спектроскопией NOESY (пик поперечной связи между H-1' и H-4' в B-изомере 512).

Схема 10

Синтез L-2'-фтор-d4-аденина и гипоксантина при помощи прямой конденсации



Реагенты: (i) $(\text{EtO}_2)_2\text{P}(\text{O})\text{CHF-CO}_2\text{Et}[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]_2\text{NNa}$, ТГФ, -78°C, (ii) HCl/EtOH , (iii) TBDMSCl, имидазол, CH_2Cl_2 , (iv) 1M раствор DiBAL-H в CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , -78°C, (v) Ac_2O , пиридин, CH_2Cl_2 , (vi) силированный 6-Cl-пурин, TMSOTf, DCE, (vii) TBAF, CH_3CN , (viii) NH_3/MeOH , 90°C, (ix) $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, NaOMe/MeOH, нагревание с обратным холодильником.

Таблица 6

Средняя эффективная (EC_{50}) и ингибирующая (IC_{50}) концентрация
L-2'-фтор-d4-аденина и гипоксантина против ВИЧ-1 в клетках РВМ

| Соединение № | EC_{50} (мкМ) (клетки РВМ) | EC_{90} (мкМ) (клетки РВМ) | Цитотоксичность | | |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | Клетки РМС | Клетки Vero | Клетки СЕМ |
| | | | IC_{50} (мкМ) | IC_{50} (мкМ) | IC_{50} (мкМ) |
| 512 | 1,5 | 15,1 | >100 | >100 | >100 |
| 513 | 47,6 | 332 | >100 | >100 | >100 |
| 514 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 515 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 316(β) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 317(α) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 318((β)) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 319(α) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 322(β) | 0,51 | 4,3 | >100 | >100 | >100 |
| 323(α) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 335((β)) | 1,5 | 15,1 | >100 | >100 | >100 |
| 336(α) | 47,6 | 332 | >100 | >100 | >100 |
| 337((β)) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 338(α). | >100 | >100 | >100 | | >100 |
| AZT | 0,004 | 0,04 | >100 | 29,0 | 14,3 |

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли в лабораторном устройстве Mel-temp II и не корректировали. Спектры ядерного магнитного резонанса получены в спектрометрах Bruker 250 и AMX400 400 МГц с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего эталона; химические сдвиги (δ) указаны в миллионных долях (ppm), сигналы имеют обозначения: с (s) - синглет, д (d) -дублет, т (t) - триплет, к (q) - квартет, широкий синглет, широкий дублет, м (m) - мультиплет и Гц (Hz) - герцы. УФ-спектры получены на спектрофотометре Beckman DU 650. Оптические вращения измерены в цифровом поляриметре DIP-370. Масс-спектры измерены в масс-спектрометрах высокого разрешения с двойной фокусировкой (EBE) Autospec фирмы Micromass Inc. Инфракрасные спектры получены в спектрометре Nicolet 510 FT-IR. Элементные анализы выполнены фирмой Atlantic Microlab, Inc., Norcross, GA. Ход всех реакций контролировали тонкослойной хроматографией на 200-мм пластинках из силикагеля GF фирмы Analtech. Сухие 1,2-дихлорэтан, дихлорметан и ацетонитрил получали перегонкой из CaH_2 перед использованием. Сухой ТГФ получали перегонкой из Na и бензофенона, когда раствор становился пурпурным.

L-(S)-Глицеральдегидоацетонид (302).

Раствор L-гулоно- γ -лактона (175 г, 0,98 моль) в ДМФ (1 л) охлаждают до 0°C, и п-толуолсульфоновую кислоту (1,1 г, 5,65 ммоль) добавляют порциями при перемешивании. К полученному раствору по каплям добавляют 2-метоксипропен (87,7 г, 0,92 моль) через капельную воронку при 0°C. Реакционную смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение 24 ч. После окончания реакции добавляют карбонат натрия (124 г), и полученную суспензию интенсивно перемешивают в течение 3 ч. Затем суспензию фильтруют через стеклянный фильтр и фильтрат упаривают в вакууме. К желтому остатку добавляют толуол (170 мл), в результате чего происходит кристаллизация. Твердое вещество фильтруют вакуумной фильтрацией, промывают гексанами/этанолом (9:1, 1 л) и сушат, что дает желтоватое твердое вещество 301 (99,1 г, 65%).

К перемешиваемой суспензии 5,6-О-изопропилиден-L-гулоно-1,4-лактона (70,0 г, 0,32 моль) в воде (270 мл) порциями добавляют метапериодат натрия (123 г, 0,58 моль) при 0°C в течение 30 мин, поддерживая pH равным 5,5 (который регулируют, добавляя 2 н раствор NaOH). Суспензию перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч, насыщают хлоридом натрия и фильтруют. Показатель pH фильт-

рата доводят до 6,5-7,0 и экстрагируют дихлорметаном (5 раз, 200 мл) и этилацетатом (5 раз, 300 мл). Объединенный органический слой сушат безводным сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении (<20°C). Полученный остаток перегоняют, что дает соединение 302 (23,2 г, 69%) в виде бесцветного масла; т.к. 49-51°C/16 торр. $[\alpha]^{25}_D$ -66,4 (с 6,3, бензол).

(E)/(Z)-Этил-3-[(R)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил]-2-фторакрилат (E-303 и Z-303).

Раствор триэтил-2-фторфосфоацетата (39,2 г, 162 ммоль) в ТГФ (70 мл) охлаждают до -78°C, и по каплям добавляют раствор бис(триметилсилил)амида натрия (1,0М раствор в ТГФ, 162 мл, 162 ммоль). Смесь выдерживают в течение 30 мин при -78°C, и добавляют раствор соединения 303 (19,14 г, 147 ммоль) в ТГФ. Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при -78°C, обрабатывают водным раствором NH₄Cl и экстрагируют простым эфиrom. Эфирную фазу промывают насыщенным раствором NaCl, сушат над MgSO₄, фильтруют и упаривают. Остаток хроматографируют на силикагеле, что дает соединения E-303 и Z-303 (9:1 по результатам ¹H ЯМР) в виде бледно-желтоватого масла (34,6 г, 97,9%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,34, 1,36 (2t, J=8 Гц, -CH₂CH₃), 1,40, 1,45 (2c, -CH₃), 3,69 (м, H_a-5), 4,28 (м, H_b-5, -CH₂CH₃), 5,02 (м, H-4), 5,40 (м, H-4), 6,02 (дд, J=8,20 Гц, H-3), 6,18 (дд, J=8,32 Гц, H-3).

(R)-(+)-4-[(трет-Бутилдиметилсилокси)метил]-2-фтор-2-бутен-4-олид (307).

Раствор соединений E-303 и Z-303 (19,62 г, 89,89 ммоль) в 110 мл безводного EtOH обрабатывают 30 мл концентрированной HCl и перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель удаляют в вакууме, и остаток упаривают вместе с толуолом (3 раза, 300 мл), что дает лактон 304 и нециклизованный сложный эфир 305. Полученный желтоватый сироп используют при осуществлении следующей реакции без дополнительной очистки. трет-Бутилдиметилсилоксилорид (27,1 г, 180 ммоль) добавляют к смеси соединений 304, 305 и имидазола (12,3 г, 180 ммоль) в CH₂Cl₂ (250 мл), и реакционную смесь перемешивают в течение 4 ч при комнатной температуре. Полученную смесь промывают водой, сушат (MgSO₄), фильтруют и концентрируют до сухого состояния. Остаток отделяют хроматографией на колонках из силикагеля, используя в качестве элюента 4% EtOAc-гексанов, что дает соединение 307 (28,0 г, 70,2% от соединения 302) в виде белого кристаллического твердого вещества, т.пл.48-50°C; $[\alpha]^{28}_D$ +105,3 (с 1,60, CHCl₃); ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 0,07, 0,08 (2c, 2×CH₃), 0,88 (с, ¹Bu), 3,88 (м, 2H, H-5), 5,01 (м, 1H, H-4), 6,73 (ps т, 1H, J=4 Гц).

Элементный анализ, высчитано для C₁₀H₁₉FO₃Si: C, 53,63; H, 7,77.

Обнаружено: C, 53,70; H, 7,75.

1-Ацетил-4-[(трет-бутилдиметилсилокси)метил]-2-фтор-2-бутен-4-олид (309).

Лактон 307 (20,58 г, 83,54 ммоль) растворяют в 200 мл CH₂Cl₂ в атмосфере азота, смесь охлаждают до -78°C и добавляют 1,0М раствор DIBAL-H в CH₂Cl₂ (125 мл). Полученную смесь перемешивают в течение 2 ч при -78°C. Холодную смесь обрабатывают разбавленной азотной кислотой, промывают водой и сушат (Na₂SO₄). Выпаривание растворителя дает аномеры соединения 308 в виде бледно-желтого масла (16,6 г, выход сырого продукта 80%), которое используют на следующей стадии без дальнейшей очистки.

Ac₂O (25 мл, 0,27 моль) добавляют к раствору соединения 308 и пиридина (22 мл, 0,27 моль) в CH₂Cl₂ (200 мл) при 0°C, и полученную смесь перемешивают в течение 16 ч. Реакционную смесь промывают разбавленной HCl, насыщенным раствором NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Объединенный органический слой сушат, фильтруют и концентрируют до сухого состояния. Остаток хроматографируют на колонках (6,5% EtOAc/гексаны), что дает соединение 309 (12,6 г, 65%) в виде бесцветного масла.

Общий способ конденсации ацетата 309 с пиримидиновыми основаниями

Смесь урацила (420 мг, 3,75 ммоль), гексаметилдисилазана (15 мл) и сульфата аммония (20 мг) нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 3 ч в атмосфере азота. Полученный прозрачный раствор концентрируют до сухого состояния в вакууме. TMSOTf (0,7 мл, 3,14 ммоль) добавляют к раствору сахара 309 (728 мг, 2,50 ммоль) и силицированного основания в сухом DCE (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч в атмосфере азота, выливают в охлажденный насыщенный раствор NaHCO₃ (30 мл) и перемешивают в течение 15 мин. Полученную смесь промывают, сушат (Na₂SO₄), фильтруют и концентрируют в вакууме. Сырой продукт очищают хроматографией на колонках (3% MeOH/CHCl₃), что дает соединение 310 (0,960 г, 2,73 ммоль, 73%) в виде неразделимой смеси аномеров, которую используют на следующей стадии, не разделяя.

1-[5-O-(трет-Бутилдиметилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-L-глицеропент-2-енофуранозил]урацил (310).

УФ (CHCl₃) λ_{max} 257,5 нм. Элементный анализ (C₁₅H₂₃FN₂O₄Si) C, H, N.

1-[5-O-(трет-Бутилдиметилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-L-глицеропент-2-енофуранозил]тимин (311).

Силицированный тимин (242 мг, 1,92 ммоль), соединение 307 (500 мг, 1,72 моль) и TMSOTf (0,5 мл, 2,25 ммоль) подвергают взаимодействию в течение 2 ч с получением смеси 311, которую очищают хроматографией на колонках из силикагеля (3% MeOH/CHCl₃) в виде неразделимой смеси аномеров (0,392 г, 1,10 ммоль, 64%). УФ (CHCl₃) λ_{max} 262,0 нм.

Элементный анализ ($C_{16}H_{25}FN_2O_4Si$) C, H, N.

N^6 -Бензоил-1-[5-O-(трет-бутилдимитилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-(a,b)-L-глицеропент-2-енофуранозил]цитозин (312 и 313).

Силированный N^6 -бензоилцитозин (790 мг, 3,67 ммоль), соединение 307 (470 мг, 1,62 ммоль) и TMSOTf (0,5 мл, 2,25 ммоль) подвергают взаимодействию в течение 2 ч с получением смесей соединений 312 и 313, которые очищают хроматографией на колонках из силикагеля (30% EtOAc/гексан), что дает β -аномер 312 (0,34 г, 0,76 ммоль, 47,1%) в виде белого твердого вещества и α -аномер 313 (0,23 г, 0,52 ммоль, 31,8 %) в виде белого твердого вещества.

Соединение 312: УФ ($CHCl_3$) λ_{max} 260,5 нм.

Элементный анализ ($C_{22}H_{28}FN_3O_4Si$) C, H, N.

Соединение 313: УФ ($CHCl_3$) λ_{max} 260,5 нм.

Элементный анализ ($C_{22}H_{28}FN_3O_4Si$) C, H, N.

5-Фтор-1-[5-O-(трет-бутилдиметилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-(a,b-L-глицеропент-2-енофуранозил]цитозин (314 и 315).

Силированный 5-фторцитозин (300 мг, 2,32 ммоль), соединение 309 (360 мг, 1,24 ммоль) и TMSOTf (0,4 мл, 1,86 ммоль) подвергают взаимодействию в течение 2 ч с получением смеси соединений 314 и 315, которую очищают хроматографией на колонках из силикагеля (3% MeOH/CH₂Cl₂), что дает β -аномер 314 в виде белого твердого вещества (168 мг, 37,8%) и α -аномер 315 (121 мг, 27,1%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 314: УФ (MeOH) λ_{max} 281,5 нм.

Соединение 315: УФ (MeOH) λ_{max} 281,5 нм.

1-(2,3-Дидезокси-2-фтор-(α,β)-L-глицеропент-2-енофуранозил)урацил (316 и 317).

Фторид тетра-н-бутиламмония (0,6 мл, 0,6 ммоль) добавляют к смеси соединения 310 (177 мг, 0,52 ммоль) в ТГФ (15 мл), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Растворитель удаляют, и остаток очищают хроматографией на колонках из силикагеля (2% MeOH/CHCl₃), что дает β -аномер 316 (52,8 мг, 0,23 ммоль, 44,5%) и α -аномер 317 (35,1 мг, 0,15 ммоль, 29,6%).

Соединение 316: УФ (H_2O) λ_{max} 261,0 нм (pH 7).

Элементный анализ ($C_9H_9FN_2O_4 \cdot 0,3H_2O$) C, H, N.

Соединение 317: УФ (H_2O) λ_{max} 261,0 нм (pH 7).

Элементный анализ ($C_9H_9FN_2O_4 \cdot 0,2H_2O$) C, H, N.

1-(2,3-Дидезокси-2-фтор-(α,β)-L-глицеропент-2-енофуранозил)тимин (318 и 319).

Фторид тетра-н-бутиламмония (0,8 мл, 0,8 ммоль) добавляют к смеси соединений 311 (240 мг, 0,67 ммоль) в ТГФ (10 мл) при 0°C и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Растворитель удаляют, и остаток очищают хроматографией на колонках из силикагеля (40% ТГФ/циклогексан), что дает β -аномер 318 (66,5 мг, 0,28 ммоль, 41%) и α -аномер 319 (52,8 мг, 0,23 ммоль, 26%).

Соединение 318: УФ (H_2O) λ_{max} 265,5 нм (pH 7).

Элементный анализ ($C_{10}H_{11}FN_2O_4 \cdot 0,4H_2O$) C, H, N.

Соединение 319: УФ (H_2O) λ_{max} 266,0 нм (pH 7).

Элементный анализ ($C_9H_9FN_2O_4 \cdot 0,3H_2O$) C, H, N.

N^6 -Бензоил-1-(2,3-дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил)цитозин (320).

Фторид тетра-н-бутиламмония (1М раствор в ТГФ) (1 мл, 1 ммоль) добавляют к раствору β -аномера 312 (280 мг, 0,63 ммоль) в ТГФ (10 мл), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении, и остаток очищают флеш-хроматографией на колонках из силикагеля, используя 2,5% MeOH/CHCl₃, что дает соединение 320 (218 мг, 0,66 ммоль, 75%) в виде белого твердого вещества. УФ (MeOH) λ_{max} 260,5 нм.

Элементный анализ ($C_{16}H_{14}FN_3O_4$) C, H, N.

N^6 -Бензоил-1-(2,3-дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил)цитозин (321).

Фторид тетра-н-бутиламмония (1М раствор в ТГФ) (1 мл, 1 ммоль) добавляют к раствору α -аномера 313 (280 мг, 0,63 ммоль) в ТГФ (10 мл), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении, и остаток очищают хроматографией на колонках из силикагеля, используя 2,5% MeOH/CHCl₃, что дает соединение 321 (145,8 мг, 0,44 ммоль, 69%) в виде белого твердого вещества. УФ (MeOH) λ_{max} 260,5 нм.

Элементный анализ ($C_{16}H_{14}FN_3O_4 \cdot 0,3H_2O$) C, H, N.

1-(2,3-Дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил)цитозин (322).

Раствор β -аномера (67,60 мг, 0,204 ммоль) в MeOH (5 мл) обрабатывают NH₃/MeOH (10 мл насыщенного раствора), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре до исчезновения исходного вещества (10 ч). Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении, и остаток очищают препаративной ТСХ, используя в качестве элюента 12% MeOH/CH₂Cl₂. Вещество, снятое с пла-

стинки, растирают в порошок с гексанами и диэтиловым спиртом, что дает соединение 322 (43 мг, 93,1%) в виде твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 266,5 нм (pH 7).

Элементный анализ (C₉H₁₀FN₃O₃·0,4H₂O) C, H, N.

1-(2,3-Дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил) цитозин (323).

Раствор α -аномера (65,90 мг, 0,199 ммоль) в MeOH (5 мл) обрабатывают NH₃/MeOH (10 мл насыщенного раствора), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре до исчезновения исходного вещества (16 ч). Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении, и остаток очищают препаративной ТСХ, используя в качестве элюента 12% MeOH/CH₂Cl₂. Вещество, снятое с пластиинки, растирают в порошок с гексанами и диэтиловым эфиром, что дает соединение 322 (42,5 мг, 94,5%) в виде твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 276,0 нм (pH 2).

Элементный анализ (C₉H₁₀FN₃O₃) C, H, N.

5-Фтор-1-(2,3-дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил)цитозин (324).

Фторид тетра-н-бутиламмония (1М раствор в ТГФ) добавляют к раствору β -аномера 314 в ацетонитриле, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении, и остаток очищают флеш-хроматографией на колонках из силикагеля, используя 12% MeOH/CHCl₃, что дает соединение 324.

5-Фтор-1-(2,3-дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил)цитозин (325).

Фторид тетра-н-бутиламмония (1М раствор в ТГФ) добавляют к раствору β -аномера 315 в ацетонитриле, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении, и остаток очищают флеш-хроматографией на колонках из силикагеля, используя 12% MeOH/CHCl₃, что дает соединение 325.

Общий способ конденсации ацетата 309 с пуриновыми основаниями

Смесь 6-хлорпурина (1/20 г, 7,75 ммоль), гесаметилдисилазана (25 мл) и сульфата аммония (катализическое количество) нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 4 ч в атмосфере азота. Полученный прозрачный раствор концентрируют в вакууме, остаток растворяют в сухом DCE (10 мл) и подвергают взаимодействию с раствором соединения 307 (1,50 г, 5,17 ммоль) в DCE (40 мл) и триметилсилитрифлате (1,5 мл, 7,75 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре в атмосфере азота, после чего реакционный раствор выливают в охлаждаемый льдом насыщенный раствор NaHCO₃ (20 мл) и перемешивают в течение 15 мин. Органический слой промывают водой и насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄. Растворители удаляют при пониженном давлении, и остаток отделяют хроматографией на колонках из силикагеля, используя 12,5% EtOAc/гексаны, что дает смесь аномеров 326 (1,25 г, 62,9%) в виде сиропа.

6-Хлор-9-[5-O-(трет-бутилдиметилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-L-глицеропент-2-енофуранозил]пурин (326).

Соединение 326: УФ (MeOH) λ_{\max} 265,0 нм.

Элементный анализ (C₁₆H₂₂ClFN₄O₂Si) C, H, N.

6-Хлор-2-фтор-9-[5-O-(трет-бутилдиметилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор-(α,β)-L-глицеропент-2-енофуранозил]пурин (327 и 328).

Смесь силицированного 2-фтор-6-хлорпурина [полученного из 1,170 г (6,78 ммоль) 2-фтор-6-хлорпурина] и сухого DCE (40 мл) перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре. Полученную смесь обрабатывают аналогично соединению 326, очищают хроматографией на колонках из силикагеля (12% EtOAc/гексаны), что дает β -аномер 327 (685 мг, 1,70 ммоль, 30,0%) в виде белой пены и α -аномер 328 (502 мг, 1,25 ммоль, 22,1%) в виде желтоватого сиропа.

Соединение 327: УФ (MeOH) λ_{\max} 268,5 нм.

Элементный анализ (C₁₆H₂₁F₂CIN₄O₂Si) C, H, N.

Соединение 328: УФ (MeOH) λ_{\max} 269,0 нм.

Элементный анализ (C₁₆H₂₁F₂CIN₄O₂Si) C, H, N.

6-Хлор-9-(2,3-дидезокси-2-фтор-(α,β)-L-глицеропент-2-енофуранозил)пурин (329 и 330).

Раствор соединения 326 (1,2 г, 3,12 ммоль) в сухом CH₃CN (20 мл) обрабатывают TBAF (1М раствор в ТГФ) (3,2 мл, 3,2 ммоль) и перемешивают в течение 1 ч. Растворитель выпаривают и полученный продукт очищают хроматографией на колонках (3% MeOH/CHCl₃), что дает β -аномер 329 (296 мг, 35%) в виде белого твердого вещества и α -аномер 330 (380 мг, 45%) в виде пены.

Соединение 329: УФ (MeOH) λ_{\max} 265,0 нм.

Соединение 330: УФ (MeOH) λ_{\max} 265,0 нм.

6-Амино-2-фтор-9-[5-O-(трет-бутилдиметилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил]пурин (331) и 6-хлор-2-амино-9-[5-O-(трет-бутилдиметилсилил)-2,3-дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил]пурин (332).

Сухой аммиак барботируют в перемешиваемый раствор соединения 327 (420 мг, 1,04 ммоль) в сухом DME (35 мл) при комнатной температуре в течение ночи. Соли отфильтровывают, и фильтрат упаривают при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией на колонках из силикагеля (25%

EtOAc/гексаны), что дает два соединения, 331 (114 мг, 0,30 ммоль) в виде белого твердого вещества и 332 (164 мг, 0,41 ммоль) в виде белого твердого вещества.

Соединение 331: УФ (MeOH) λ_{\max} 268,5 нм.

Элементный анализ ($C_{16}H_{23}F_2N_5O_2Si$ ·0,2 ацетон) C, H, N.

Соединение 332: УФ (MeOH) λ_{\max} 307,5 нм.

Элементный анализ ($C_{16}H_{23}FN_5O_2ClSi$) C, H, N, Cl.

6-Амино-2-фтор-9-[5-O-(трет-бутилдиметилсил)или-2,3-дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил]пурина (333) и 6-хлор-2-амино-9-[5-O-(трет-бутилдиметилсил)или-2,3-дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил]пурина (334).

Сухой аммиак барботируют в перемешиваемый раствор соединения 333 (420 мг, 1,04 ммоль) в сухом DME (35 мл) при комнатной температуре в течение ночи. Соли отфильтровывают, и фильтрат упаривают при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией на колонках из силикагеля (25% EtOAc/гексаны), что дает два соединения, 332 (150 мг, 0,38 ммоль) в виде белого твердого вещества и 333 (69,3 мг, 0,18 ммоль) в виде белого твердого вещества.

Соединение 333: УФ (MeOH) λ_{\max} 269,0 нм.

Элементный анализ ($C_{16}H_{23}F_2N_5O_2Si$ ·0,3 ацетон) C, H, N.

Соединение 334: УФ (MeOH) λ_{\max} 309,5 нм.

Элементный анализ ($C_{16}H_{23}FClN_5O_2Si$) C, H, N.

9-(2,3-Дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил)аденин (335).

Раствор соединения 329 (100 мг, 0,369 ммоль) и насыщенный раствор NH_3 /MeOH (50 мл) нагревают при 90°C в стальном автоклаве в течение 24 ч. Смесь охлаждают до комнатной температуры, растворитель удаляют при пониженном давлении, и остаточный сироп очищают хроматографией на колонках, используя в качестве элюента 6% MeOH/CHCl₃, что дает соединение 335 (70 мг, 75%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 335: УФ (H₂O) λ_{\max} 258 нм (ϵ 18800) (pH 2), 258,5 нм (ϵ 18800) (pH 7), 258,5 нм (ϵ 19100) (pH 11).

Элементный анализ ($C_{10}H_{10}FN_5O_2$ ·0,2H₂O) C, H, N.

9-(2,3-Дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил)аденин (336).

Раствор соединения 330 (99 мг, 0,366 ммоль) и насыщенный раствор NH_3 /MeOH (50 мл) нагревают при 90°C в стальном автоклаве в течение 24 ч. Смесь охлаждают до комнатной температуры, растворитель удаляют при пониженном давлении и остаточный сироп очищают хроматографией на колонках, используя в качестве элюента 6% MeOH/CHCl₃, что дает соединение 336 (72 мг, 78%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 336: УФ H₂O λ_{\max} 258 нм (ϵ 21100) (pH 2), 259 нм (ϵ 21500) (pH 7), 259 нм (ϵ 22600) (pH 11).

Элементный анализ ($C_{10}H_{10}FN_5O_2$ ·0,3MeOH) C, H, N.

9-(2,3-Дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил)гипоксантин (337).

Смесь соединения 329 (100 мг, 0,369 ммоль), NaOMe (0,5M раствор в MeOH) (2,94 мл, 1,46 ммоль) и HSCH₂CH₂OH (0,1 мл, 1,46 ммоль) в MeOH (20 мл) нагревают с обратным холодильником в течение 4 ч в атмосфере азота. Реакционную смесь охлаждают, нейтрализуют ледяной AcOH и упаривают до сухого состояния в вакууме. Остаток очищают хроматографией на колонках из силикагеля (10% MeOH/CHCl₃), что дает соединение 337 (74 мг, 80%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 337: УФ (H₂O) λ_{\max} 247 нм (ϵ 12400) (pH 2), 247,5 нм (ϵ 13000) (pH 7), 253 нм (ϵ 13100) (pH 11).

Элементный анализ ($C_{10}H_9FN_4O_3$ ·0,2H₂O) C, H, N.

9-(2,3-Дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил)гипоксантин (338).

Смесь соединения 330 (100 мг, 0,369), NaOMe (0,5M раствор в MeOH) (2,94 мл, 1,46 ммоль) и HSCH₂CH₂OH (0,1 мл, 1,46 ммоль) в MeOH (20 мл) нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 4 ч в атмосфере азота. Реакционную смесь охлаждают, нейтрализуют ледяной AcOH и упаривают до сухого состояния в вакууме. Остаток очищают хроматографией на колонках из силикагеля (10% MeOH/CHCl₃), что дает соединение 338 (70 мг, 80%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 338: УФ (H₂O) λ_{\max} 247,5 нм (ϵ 12700) (pH 2), 247,5 нм (ϵ 13700) (pH 7), 252,5 нм (ϵ 13100) (pH 11). Элементный анализ ($C_{10}H_9FN_4O_3$ ·0,2 H₂O) C, H, N.

2-Фтор-6-амино-9-(2,3-дидезокси-2-фтор- β -L-глицеропент-2-енофуранозил)пурина (339). Раствор соединения 31 (101 мг, 0,26 ммоль) в сухом ацетонитриле (15 мл) обрабатывают TBAF (1 M раствор в TГФ) (0,35 мл, 0,35 ммоль) и перемешивают в течение 30 мин. Растворитель выпаривают и сухой продукт очищают хроматографией на колонках (9% CH₂Cl₂/MeOH), что дает соединение 339 (64,7 мг, 0,24 ммоль, 92,3%) в виде белого кристаллического твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 269,0 нм (pH 7).

2-Фтор-6-амино-9-(2,3-дидезокси-2-фтор- α -L-глицеропент-2-енофуранозил)пурина (340).

Раствор соединения 333 (73,4 мг, 0,19 ммоль) в сухом ацетонитриле (10 мл) обрабатывают TBAF

(1М раствор в ТГФ) (0,25 мл, 0,25 ммоль) и перемешивают в течение 30 мин. Растворитель выпаривают и сухой продукт очищают хроматографией на колонках (9% CH₂Cl₂/MeOH), что дает соединение 340 (46,2 мг, 0,17 ммоль, 90,3%) в виде белого кристаллического твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 269,0 нм (pH 7).

2-Амино-6-хлор-9-(2,3-дидезокси-2-фтор- β -L-глициеропент-2-енофуранозил)пуурин (341).

Раствор соединения 332 (143,5 мг, 0,40 ммоль) в сухом ацетонитриле (15 мл) обрабатывают TBAF (1М раствор в ТГФ) (0,6 мл, 0,60 ммоль) и перемешивают в течение 30 мин. Растворитель выпаривают, и сухой продукт очищают хроматографией на колонках (5% CH₂Cl₂/MeOH), что дает соединение 341 (109 мг, 0,382 ммоль, 95,5%) в виде белого кристаллического твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 308,5 нм (pH 7).

2-Амино-6-хлор-9-(2,3-дидезокси-2-фтор- α -L-глициеропент-2-енофуранозил)пуурин (342).

Раствор соединения 334 (145 мг, 0,36 ммоль) в сухом ацетонитриле (10 мл) обрабатывают TBAF (1М раствор в ТГФ) (0,5 мл, 0,50 ммоль) и перемешивают в течение 30 мин. Растворитель выпаривают, и сухой продукт очищают хроматографией на колонках (9% CH₂Cl₂/MeOH), что дает соединение 342 (99,9 мг, 0,35 ммоль, 96,4%) в виде белого кристаллического твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 309,0 нм (pH 7).

9-(2,3-Дидезокси-2-фтор- β -L-глициеропент-2-енофуранозил)гуанин (343).

Смесь соединения 341 (63,6 мг, 0,223 ммоль), 2-меркаптоэтанола (0,06 мл, 0,89 ммоль) и 1 н раствора NaOMe (0,89 мл, 0,89 ммоль) в MeOH (10 мл) нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 5 ч в атмосфере азота. Смесь охлаждают, нейтрализуют ледяной AcOH и концентрируют до сухого состояния при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией на колонках (12% CH₂Cl₂/MeOH), что дает соединение 343 (30,1 мг, 0,113 ммоль, 50,7%) в виде белого твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 253,5 нм (pH 7).

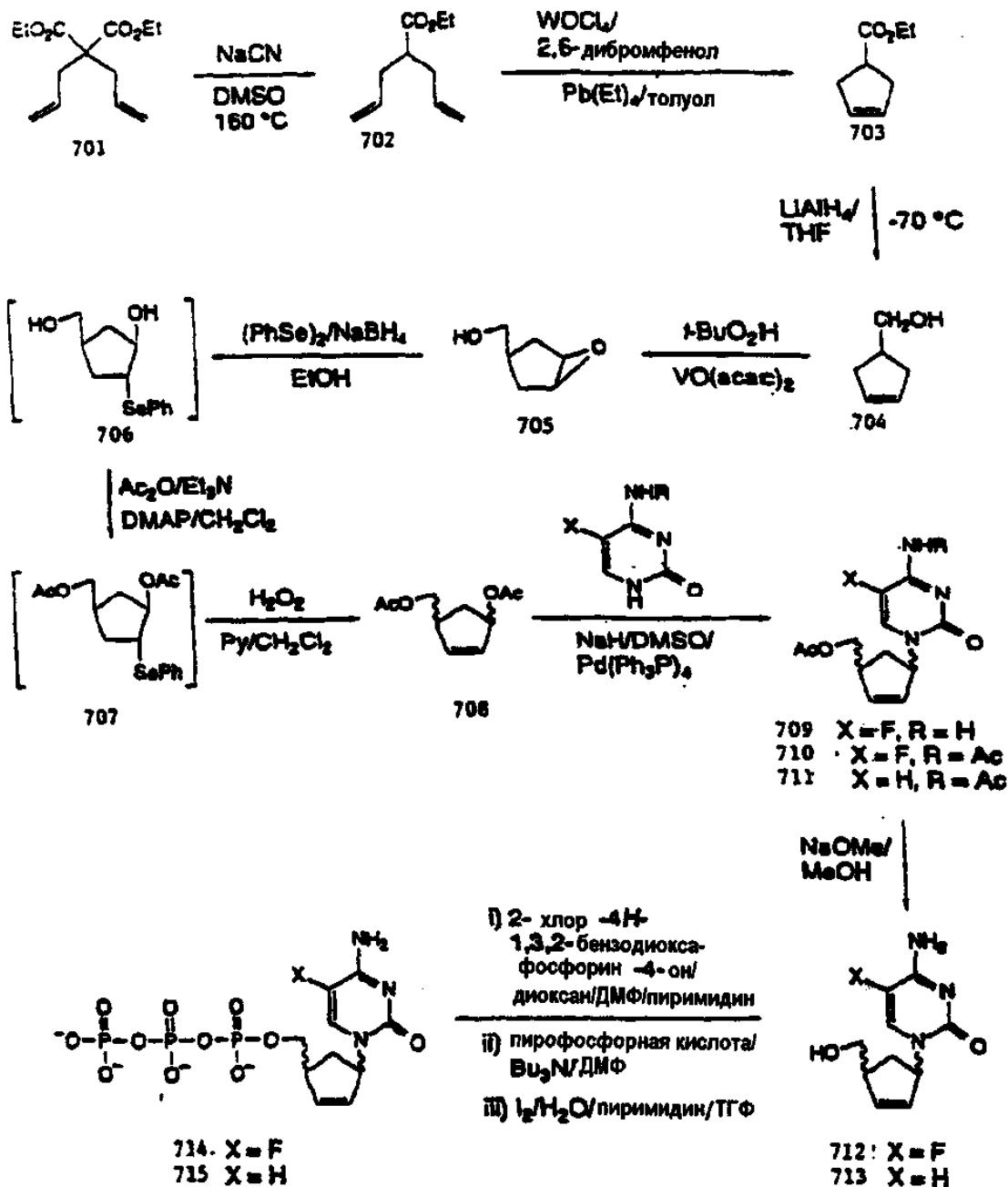
9-(2,3-Дидезокси-2-фтор- α -L-глициеропент-2-енофуранозил)гуанин (344).

Смесь соединения 342 (59,3 мг, 0,208 ммоль), 2-меркаптоэтанола (0,07 мл, 1,04 ммоль) и 1 н раствора NaOMe (1,04 мл, 1,04 ммоль) в MeOH (10 мл) нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 5 ч в атмосфере азота. Смесь охлаждают, нейтрализуют ледяной AcOH и концентрируют до сухого состояния в вакууме. Остаток очищают хроматографией на колонках (12,5% CH₂Cl₂/MeOH), что дает соединение 344 (28,0 мг, 0,105 ммоль, 50,5%) в виде белого твердого вещества. УФ (H₂O) λ_{\max} 253,0 нм (pH 7).

Синтез цис-(\pm)-карбоциклических d4-цитозиннуклеозидов и их 5'-трифосфатов

В соответствии со схемой 11 при использовании в качестве исходного вещества диэтилдиаллилмалоната (701) синтезирован 4-карбетокси-1,6-гептадиен (702) с 78% выходом (W.A. Nugent, J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 8992-8998). Соединение 703 синтезировано из соединения 702 с 71% выходом (L.E. Martinez, J. Org. Chem., 1996, 61, 7963-7966), и соединение 705 синтезировано из соединения 704 с 43% выходом (D.M. Hodgson, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1994, 3373-3378). Основное промежуточное соединение, цис-(\pm)-3-ацетокси-5-(ацетоксиметил)цикlopентен (708), можно альтернативно синтезировать из цикlopентадиена и формальдегида в уксусной кислоте, выполняя реакцию Принса (E.A. Saville-Stones, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1991, 2603-2604), хотя для этого способа получения характерны такие недостатки, как низкий выход и невозможность разделения компонентов; или из бициклического лактона, который синтезируют многостадийным методом, состоящим из 4 стадий (F. Burlina, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7, 247-250). При помощи последнего метода можно получить хиральное соединение 708 [(-)-энантиомер], хотя для этого необходимо синтезировать хиральный бициклический лактон. N⁴-Ацетил-5-фторцитозин синтезирован из 5-фторцитозина и п-нитрофенилацетата (A.S. Steinfeld, J. Chem. Research (M), 1979, 1437-1450).

Схема 11



Экспериментальная часть

Общая информация.

Все реагенты использовали в том виде, в каком они были получены, за исключением особо оговоренных случаев. Безводные растворители были приобретены в компании Aldrich Chemical Co. Температуры плавления (т.пл.) измеряли в электротермическом цифровом устройстве для определения температуры плавления и не корректировали. Спектры ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР определены в спектрометре Varian Unity Plus 400 при комнатной температуре и указаны в миллионных долях со сдвигом в сторону слабого поля от внутреннего стандарта тетраметилсилана.

4-Карбокси-1,6-гептадиен (702).

Смесь диэтилдиаллилмалоната (701; 50 г, 208 ммоль), цианида натрия (20,7 г, 422 ммоль) и ДМСО (166 мл) нагревают при 160 °C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют 400 мл воды, и полученный продукт экстрагируют в гексан (4×100 мл). Растворитель выпаривают при пониженном давлении и остаток перегоняют (42-43 °C/1 торр), что дает 27,34 г (78%) соединения 702 в виде бесцветной жидкости.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,80-5,70 (м, 2H, $2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,10-5,02 (м, 4H, $2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,14 (к, 2H, $J=7,2$ Гц, OCH_2), 2,54-2,48 (м, 1H, CH), 2,41-2,34, 2,29-2,23 (2м, 4H, 2CH_2), 1,25 (т, $J=7,2$ Гц, 3H, CH_3).

Этиловый эфир (\pm)-3-цикlopентенкарбоновой кислоты (703).

В высушенному пламенем 500 мл колбу вводят 2,6-дигромфенол (1,20 г, 4,76 ммоль), оксихлорид

вольфрама (0,813 г, 2,38 ммоль) и безводный толуол (25 мл). Полученную суспензию нагревают при кипении с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 1 ч, после чего растворитель выпаривают в вакууме. Твердый остаток разбивают шпателем и сушат в вакууме в течение 30 мин. К остатку добавляют толуол (160 мл), Et_4Pb (1,54 г, 4,76 мл) и соединение 702 (22 г, 131,0 ммоль). Смесь нагревают при 90°C в атмосфере азота в течение 1,5 ч. Смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через целик, и целик промывают трет- BuOMe . Объединенные фильтраты промывают 1% раствором NaOH , водой и насыщенным раствором соли и концентрируют, упаривая при пониженном давлении. Остаток перегоняют (37-38°C/1 торр), что дает 13,06 г (71%) соединения 703 в виде бесцветной жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,67 (с, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 4,14 (к, 2H, $J=7,2$ Гц, OCH_2), 3,11 (пентаплет, $J=7,6$ Гц, 1H, CH), 2,65 (д, $J=7,6$ Гц, 4H, 2CH_2), 1,27 (т, $J=7,2$ Гц, 3H, CH_3).

(+)-1-(Гидроксиметил)-3-цикlopентен (704).

К холодному (-78°C) раствору соединения 703 (7 г, 50 ммоль) в сухом ТГФ (150 мл) добавляют LiAlH_4 (1М раствор в ТГФ, 25 мл, 25 ммоль), и реакционный раствор перемешивают при -78°C в атмосфере аргона в течение 4 ч. Затем реакционный раствор оставляют нагреваться до 0°C и последовательно добавляют 2,5 мл воды, 2,5 мл 15% NaOH и 7,5 мл воды. Смесь нагревают до комнатной температуры, осадок фильтруют через целик, и промывают целик горячим EtOAc . Объединенные фильтраты промывают 0,1 н раствором NaOH и насыщенным раствором соли, сушат (MgSO_4), фильтруют, концентрируют и сушат в вакууме, что дает 4,294 г (84%) соединения 704 в виде бледно-желтой жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,68 (с, 2H, $2\text{CH}=\text{CH}$), 3,57 (д, $J=6,0$ Гц, 2H, CH_2OH), 2,54-2,48 (м, 3H, $\text{CH}+\text{CH}_2$), 2,15-2,10 (м, 2H, CH_2).

цис-(±)-4-(Гидроксиметил)-1,2-эпоксицикlopентан (705).

К раствору соединения 704 (930 мг, 9,1 ммоль) и ванадилацетилацетоната (10 мг) в безводном CH_2Cl_2 (20 мл) по каплям добавляют трет- BuO_2H [3М раствор в CH_2Cl_2 , полученный из смеси трет- BuO_2H (70 вес.% в воде, 41 мл, 0,3 моль) и CH_2Cl_2 (59 мл) в результате сушки (2MgSO_4) и хранения на молекулярном сите 4 Å, 10 мл, ~30 ммоль]. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч, добавляют водный Na_2SO_3 (15% раствор, 60 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение 6 ч. Органический слой отделяют, промывают насыщенным раствором NaHCO_3 и насыщенным раствором соли и концентрируют. Остаток очищают флеш-хроматографией на силикагеле, производя элюирование гексаном/ EtOAc (2:1), что дает 460 мг (43%) соединения 705 в виде бесцветной жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 3,54 (с, 2H, $(\text{CH})_2\text{O}$), 3,49 (т, $J=4,0$ Гц, 2H, CH_2OH), 2,95 (шс, 1H, OH), 2,44-2,40 (м, 1H, CH), 2,05-2,02 (м, 4H, 2CH_2). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 66,9 (д, $(\text{CH})_2\text{O}$), 59,2 (т, CH_2OH), 36,5 (д, CH), 31,4 (т, 2CH_2).

цис-(±)-3-Ацетокси-5-(ацетоксиметил)цикlopентен (708).

К раствору дифенилдиселенида (2,70 г, 8,65 ммоль) в безводном EtOH (100 мл) порциями добавляют NaBH_4 . Раствор желтого цвета перемешивают до тех пор, пока он не становится бесцветным, после чего добавляют раствор соединения 705 (1,70 г, 14,4 ммоль) в безводном ТГФ (10 мл). Реакционный раствор нагревают с обратным холодильником в течение 1 ч в атмосфере азота, и растворитель выпаривают в вакууме. К остатку добавляют EtOAc (80 мл) и воду (30 мл). Органическую фазу отделяют, промывают насыщенным раствором соли, сушат (MgSO_4), фильтруют, концентрируют и сушат в вакууме. Полученный (±)-1-гидрокси-4-(гидроксиметил)-2-(фенилселенил)цикlopентан (706; светло-желтое масло) используют при выполнении следующей реакции без дальнейшей очистки. К сырому продукту 706 добавляют безводный CH_2Cl_2 (60 мл), Et_3N (30 мл, 216 ммоль) и DMAp (50 мг). Полученный раствор охлаждают до 0°C и по каплям добавляют Ac_2O (14,7 г, 144 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение ночи и растворитель выпаривают, что дает (±)-1-ацетокси-4-(ацетоксиметил)-2-(фенилселенил)цикlopентан (707; светло-желтое масло). К холодному (0°C) раствору соединения 707 в CH_2Cl_2 (50 мл), содержащему 3 капли пиридина, добавляют 30% раствор H_2O_2 (20 мл) в течение 5 мин. Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин и при комнатной температуре еще 30 мин, после чего смесь разбавляют, добавляя CH_2Cl_2 (50 мл). Органическую фазу отделяют, промывают водой, насыщенным раствором NaHCO_3 и насыщенным раствором соли, сушат (MgSO_4), фильтруют и концентрируют, упаривая в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией на силикагеле, производя элюирование 0-10% EtOAc в гексане, что дает 2,254 г (79%, для трех стадий) соединения 708 в виде бледно-коричневой жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 6,01-6,00, 5,92-5,90 (2м, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5,66-5,64 (м, 1H, H-3), 4,04 (д, $J=6,8$ Гц, 2H, CH_2O), 2,98-2,92 (м, 1H, H-5), 2,53-2,46 (м, 1H, H-4a), 2,08, 2,04 (2с, 6H, 2CH_3), 1,60-1,54 (м, 2H, H-4b). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 171,1, 170,9 (2с, $2\text{C}=\text{O}$), 137,0, 131,4 (2д, $\text{CH}=\text{CH}$), 79,2 (д, C-3), 67,4 (т, CH_2O), 43,7 (д, C-5), 33,4 (т, C-4), 21,3, 20,9 (2к, 2CH_3).

цис-(±)-Карбоциклический 5'-О-ацетил-2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси-5-фторцитидин (709).

Суспензию 5-фторцитозина (258 мг, 2 ммоль) и NaH (58 мг, 2,4 ммоль) в безводном ДМСО (15 мл) нагревают на предварительно нагретой масляной бане при 70°C в течение 30 мин. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры и добавляют $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (73 мг, 0,063 ммоль) и раствор соединения 708 (298 мг, 1,5 ммоль) в безводном ТГФ (2 мл). Реакционную смесь перемешивают при 70°C в атмосфере аргона в течение 3 дней. Растворитель выпаривают в вакууме и остаток обрабатывают CH_2Cl_2 (50 мл).

Осадок фильтруют через целин и промывают целин CH_2Cl_2 . Объединенные фильтраты концентрируют и остаток очищают фреш-хроматографией на силикагеле, производя элюирование 0-5% MeOH в CH_2Cl_2 , что дает 40 мг (10%) соединения 709 в виде светло-коричневого твердого вещества. Перекристаллизация из MeOH/ CH_2Cl_2 /гексана дает чистый продукт в виде белого порошка. Т.пл. 182-184°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,43 (д, $J=6,0$ Гц, 1Н, Н-6), 6,18-6,16 (м, 1Н, Н-3'), 5,83-5,81 (м, 1Н, Н-2'), 5,73-5,71 (м, 1Н, Н-1'), 4,23-4,21, 4,08-4,04 (2м, 2Н, CH_2O), 3,14-3,12 (м, 1Н, Н-4'), 2,92-2,84 (м, 1Н, Н-6'a), 2,08 (с, 3Н, CH_3), 1,41-1,35 (м, 1Н, Н-6'b).

цис-(\pm)-Карбоциклический $\text{N}^4,5'$ -О-диацетил-2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси-5-фторцитидин (710).

Аналогично способу получения соединения 709 целевое соединение 710 получают из соединения 708 (560 мг, 2,828 ммоль) и N^4 -ацетил-5-фторцитозина (726 мг, 4,24 ммоль): 560 мг (64%, коричневое масло). Этот сырой продукт используют при выполнении следующей реакции без дальнейшей очистки.

цис-(\pm)-Карбоциклический $\text{N}^4,5'$ -О-диацетил-2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксицитидин (711).

Аналогично способу получения соединения 709 целевое соединение 711 получают из соединения 708 (272 мг, 1,37 ммоль) и N^4 -ацетилцитозина (316 мг, 2,06 ммоль): 108 мг (27%) белого порошка. Т.пл. 169,5-171,5°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,80 (шс, 1Н, NH), 7,72 (д, $J=6,8$ Гц, 1Н, Н-6), 7,39 (д, $J=6,8$ Гц, 1Н, Н-5), 6,19-6,17 (м, 1Н, Н-3'), 5,86-5,81 (м, 1Н, Н-2'), 5,77-5,75 (м, 1Н, Н-1'), 4,17-4,13, 4,07-4,02 (2м, 2Н, CH_2O), 3,18-3,10 (м, 1Н, Н-4'), 2,96-2,88 (м, 1Н, Н-6'a), 2,27, 2,06 (2с, 6Н, 2CH_3), 1,43-1,37 (м, 1Н, Н-6'b). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 170,8 (с, 2C=O), 162,0 (с, C-4), 155,6 (с, C-2), 145,3 (д, C-6), 139,2 (д, C-3'), 130,0 (д, C-2'), 96,8 (д, C-5), 66,3 (т, C-5'), 62,8 (д, C-1'), 44,2 (д, C-4'), 34,7 (т, C-6'), 25,0, 20,9 (2к, 2 CH_3).

цис-(\pm)-Карбоциклический 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси-5-фторцитидин (712).

В колбу, содержащую соединение 709 (33 мг, 0,12 ммоль), добавляют NaOMe (0,5M раствор в MeOH, 0,5 мл). Реакционный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего растворитель выпаривают в вакууме. Остаток очищают фреш-хроматографией на силикагеле, производя элюирование 5-10% MeOH в CH_2Cl_2 , что дает 17 мг (61%) соединения 712 в виде светло-коричневого твердого вещества. Перекристаллизация из MeOH/ CH_2Cl_2 /гексана дает чистый продукт в виде белого порошка. Т.пл. 205,5-206,0°C. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-D₆) δ 7,66 (д, $J=6,0$ Гц, 1Н, Н-6), 7,60, 7,40 (2шс, 2Н, NH₂), 6,06-6,05 (м, 1Н, Н-3'), 5,68-5,65 (м, 1Н, Н-2'), 5,53-5,50 (м, 1Н, Н-1'), 4,77-4,75 (м, 1Н, Н-4'), 3,50-3,48, 3,41-3,37 (2м, 2Н, Н-5'), 2,79-2,77 (м, 1Н, Н-6'a), 1,34-1,27 (м, 1Н, Н-6'b). ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО-D₆) δ 157,0 (д, $J_{\text{C-F}}=11,9$ Гц, C-4), 154,0 (с, C-2), 139,2 (д, C-3'), 135,8 (д, $J_{\text{C-F}}=241,3$ Гц, C-5), 130,2 (д, C-2'), 126,8 (д, $J_{\text{C-F}}=11,8$ Гц, C-6), 63,5 (т, C-5'), 61,3 (д, C-1'), 47,2 (д, C-4'), 33,3 (т, C-6'). МС (FAB) m/e 226 (MH⁺).

Элементный анализ ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_2$), высчитано: C 53,33; H 5,37; N 18,66; обнаружено: C 53,10; H 5,40; N 18,44. Аналогично вышеописанному способу целевое соединение 712 получают также из соединения 710 (750 мг, 2,42 ммоль): 320 мг (59%, белый порошок).

цис-(\pm)-Карбоциклический 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси-цитидин (713).

Аналогично способу получения соединения 712 целевое соединение 713 получают из соединения 711 (75 мг, 0,257 ммоль): 48 мг (90%, белое твердое вещество). Т.пл. 200-201°C. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-D₆) δ 7,40 (д, $J=7,2$ Гц, 1Н, Н-6), 7,03, 6,95 (2шс, 2Н, NH₂), 6,07-6,05 (м, 1Н, Н-3'), 5,67 (д, $J=7,2$ Гц, 1Н, Н-5), 5,65-5,64 (м, 1Н, Н-2'), 5,55-5,52 (м, 1Н, Н-1'), 4,71-4,68 (м, 1Н, Н-4'), 3,43-3,36 (м, 2Н, Н-5'), 2,78-2,76 (м, 1Н, Н-6'a), 1,24-1,18 (м, 1Н, Н-6'b). ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО-D₆) δ 165,5 (с, C-4), 155,8 (с, C-2), 142,2 (д, C-6), 138,6 (д, C-3'), 130,5 (д, C-2'), 93,7 (д, C-5), 63,9 (т, C-5'), 60,8 (д, C-1'), 47,3 (д, C-4'), 34,0 (т, C-6'). МС (FAB) m/e 208 (MH⁺).

Элементный анализ ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$), высчитано: C 57,96; H 6,32; N 20,28; обнаружено: C 57,35; H 6,27; N 20,02. МСВР (FAB) высчитано для ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$): 208,1086; обнаружено 208,1088.

Кислая триэтиламмониевая соль цис-(\pm)-карбоциклического 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси-5-фторцитидин-5'-трифосфата (714).

К раствору соединения 712 (10 мг) в безводном ДМФ (0,3 мл) и пиридина (0,1 мл) добавляют 1М раствор 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-она в безводном 1,4-диоксане (0,05 мл). Реакционный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем последовательно добавляют 1М раствор, пирофосфорной кислоты-Bu₃N в безводном ДМФ (0,12 мл) и Bu₃N (0,05 мл). Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре еще 15 мин и по каплям добавляют раствор I₂/H₂O/пиридина/TГФ до появления устойчивой йодной окраски (около 0,5 мл), после чего смесь концентрируют, упаривая в вакууме. Остаток растворяют в воде (2 мл), промывают CH_2Cl_2 (3×1 мл), фильтруют и очищают жидкостной хроматографией быстрого разрешения (FPLC) (колонка: HiLoad 26/10 Q Sepharose Fast Flow; буфер A: 0,01M Et₃NHCO₃; буфер B: 0,7 M Et₃NHCO₃; скорость потока: 10 мл/мин; градиент: увеличение буфера B от 0 в начале до 10% через 4 мин и до 100% через 64 мин). Сбор и лиофилизация необходимых фракций дает соединение 714 в виде бесцветного сиропа. ВЭЖХ [колонка: 100×4,6 мм с ионным обменом Rainin Hydtopore SAX; буфер A: 10 mM NH₄H₂PO₄ в 10% MeOH/H₂O (pH 5,5); буфер B: 125 mM NH₄H₂PO₄ в 10% MeOH/H₂O (pH 5,5); скорость потока: 1,0 мл/мин; градиент: увеличение буфера B от 0 в начале до 100% через 25 мин]; время удерживания: 11,9 мин. МС (FAB) m/e 464 ([M-H]⁺).

цис-(\pm)-Карбоциклический 2',3'-дидегидро-2',3'-дизокси-цитидин-5'-фосфат (715).

Аналогично способу получения соединения 714 целевое соединение 715 получают из соединения 713. Время удерживания ВЭЖХ (в условиях, аналогичных вышеописанным): 12,1 мин. МС (FAB) м/е 446 ($[\text{M}-\text{H}]^+$).

Ингибирующее действие (\pm)-карбокси-D4FC-трифосфата на обратную транскриптазу ВИЧ-1

Анализ роста цепи выполняли с использованием гомополимерного матричного праймера $\text{r(I)}_n \cdot (\text{dC})_{12-18}$ (Pharmacia, Piscataway, NJ) и обратной транскриптазы p66/51 гетеродимера ВИЧ-1 (RT, Biotechnology General, Rehovot, Israel). Стандартная реакционная смесь (100 мкл) содержала 100 мМ тригидрохлорида (рН 8,0), 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0,05 ед./мл $\text{r(I)}_n \cdot (\text{dC})_{12-18}$, 5 мМ DTT, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина и 1 мкМ ³H-dCTP (23 Ci/ммоль). 3ТСТР (0,001-50 мКМ) использовали в качестве положительного эталона. Соединения инкубировали в течение 1 ч при 37°C в реакционной смеси с 1 единицей обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1. Реакцию останавливали, добавляя равный объем холодной смеси 10% TCA/0,05% пирофосфата натрия, и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Осажденные нуклеиновые кислоты собирали на фильтровальной бумаге из стекловолокна, используя ручной харвестер фирмы Packard (Meriden, CT). Поглощение меченых радиоактивных изотопов, выраженное в количестве отсчетов/минуту (cpm), определяли в счетчике прямого бета-излучения Packard 9600.

Анти-ВИЧ активность

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения описываемые соединения и их фармацевтически приемлемые производные, соли или фармацевтически приемлемые составы, содержащие эти соединения, предназначены для профилактики и лечения ВИЧ-инфекций и других родственных заболеваний, таких как СПИД-ассоциированный комплекс (ARC), хроническая генерализованная лимфаденопатия (PGL), СПИД-ассоциированные неврологические заболевания, положительная реакция на антитела против ВИЧ и ВИЧ-положительная реакция, саркома Капоши, тромбоцитопенический акроангитромбоз и условно-патогенные инфекции. Кроме того, эти соединения или препараты можно использовать в профилактических целях для предотвращения или замедления развития клинических заболеваний у субъектов с положительной реакцией на антитела против ВИЧ или антиген вируса ВИЧ либо у ВИЧ-инфицированных субъектов.

Способность нуклеозидов ингибировать ВИЧ можно измерить разными экспериментальными методами. С помощью одного такого метода, подробно описанного ниже, можно измерить ингибирование репликации вируса в стимулируемых фитогемагглютинином (PHA) периферических кровяных мононуклеарных клетках (PBM) человека, инфицированных ВИЧ-1 (штамм LAV). Количество продуцированного вируса определяют, измеряя количество кодированного вирусом фермента обратной транскриптазы. Количество продуцированного фермента пропорционально количеству продуцированного вируса.

Анализы на антивирусную активность и цитотоксичность.

Анти-ВИЧ-1 активность указанных соединений определяли в периферических кровяных мононуклеарных клетках (PBM) человека в соответствии с ранее описанными методами (Schinazi, R.F.; McMillan, A.; Cannon, D.; Mathis, R.; Lloyd, R.M. Jr.; Peck, A.; Sommadossi, J.-P.; St. Clair, M.; Wilson, J.; Furman, P.A.; Painter, G.; Choi, W.-B.; Liotta, D.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 36, 2423; Schinazi, R.F.; Sommadossi, J.-P.; Saalmann, V.; Cannon, D.; Xie, M.-Y.; Hart, G.; Smith, G.; Hahn, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, 34, 1061). Исходные растворы (20-40 мМ) указанных соединений получали в стерильном ДМСО и разводили до требуемой концентрации в полной среде. Исходные растворы 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT) получали в воде. Клетки инфицировали прототипом ВИЧ-1_{LAI} при множественности заражения 0,01. Количественное определение вируса, полученного из клеточного супернатанта, производили на 6-й день после инфицирования, по анализу обратной транскриптазы с использованием поли(rA)_nолиго(dT)₁₂₋₁₈ в качестве матричного праймера. ДМСО, присутствующий в разведенном растворе (<0,1%), не должен влиять на выход вируса. Токсичность соединений можно определить в клетках PBM, СЕМ и Vero человека. EC₅₀ антивирусной активности и IC₅₀ цитотоксичности определяют на основании кривой концентрация - ответ по методу средней эффективности, описанному Chou и Talalay (Adv. Enzyme Regul. 1984, 22,27).

Трехдневные стимулируемые фитогемагглютинином клетки PBM (10^6 клеток/мл), взятые у здоровых доноров с отрицательной серологической реакцией, инфицировали ВИЧ-1 (штамм LAV) в концентрации, которая примерно в 100 раз превышает 50% инфицирующую дозу культуры ткани (TICD 50) на 1 мл, и культивировали в присутствии и отсутствии антивирусных соединений с разной концентрацией.

Примерно через 1 ч после инфицирования в колбы (5 мл; конечный объем 10 мл) вводили среду с испытуемым соединением (в 2 раза больше конечной концентрации в среде) или без соединения. AZT использовали в качестве положительного эталона.

Клетки подвергали воздействию вируса (примерно 2×10^5 распадов в мин/мл по результатам анализа обратной транскриптазы) и помещали в инкубатор с CO₂. ВИЧ-1 (штамм LAV) предоставлен Центром контроля за болезнями, Атланта, шт. Джорджия. Для культивирования клеток PBM, сбора вируса и определения активности обратной транскриптазы использовали методики, описанные McDougal et al. (J. Immun. Meth., 76, 171-183, 1985) и Spira et al. (J. Clin. Meth., 25, 97-99, 1987), за исключением того, что в

среду не вводили фунгизон (см. Schinazi, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 1784-1787 (1988); там же, 34:1061-1067 (1990)).

На 6-й день клетки и супернатант переносили в 15-мл пробирку и центрифугировали со скоростью около 900 г в течение 10 мин. 5 мл супернатанта удаляли, и вирус концентрировали центрифугированием со скоростью 40000 об./мин в течение 30 мин (ротор Beckman 70.1 Ti). Солюбилизованный вирусный осадок обрабатывали с целью определения уровней обратной транскриптазы. Результаты выражены в виде числа распадов в мин/мл отобранныго супернатанта. Вирус из супернатанта меньшего объема (1 мл) можно также концентрировать центрифугированием до солюбилизации и определения уровней обратной транскриптазы.

Среднюю эффективную концентрацию (EC_{50}) определяли по методу средней эффективности (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 30, 491-498 (1986)). Коротко этот метод можно описать следующим образом: строят график процентного ингибирования вируса, определенного на основании измерений обратной транскриптазы, в зависимости от микромолярной концентрации соединения. EC_{50} означает концентрацию соединения, при которой достигается 50% подавление роста вирусов.

Стимулированные митогеном неинфицированные клетки РВМ человека ($3,8 \times 10^5$ клеток/мл) можно культивировать в присутствии и отсутствии лекарственного средства в тех же условиях, которые использовали для вышеописанного анализа на антивирусную активность. Подсчет клеток производили через 6 дней в гемацитометре и по методу исключения трипана голубого, описанному Schinazi et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(3), 499 (1982). IC_{50} означает концентрацию соединения, которая обеспечивает 50% подавление роста нормальных клеток.

В табл. 7 приведены данные анти-ВИЧ активности выбранных соединений. Результаты этого анализа показывают, что (\pm)-карбоциклический-D4FC-TP ($2',3'$ -ненасыщенный-5-фторцитидин) имеет EC_{50} , равную 0,40 мкМ, и (+)-карбоциклический-D4C-TP ($2',3'$ -ненасыщенный цитидин) имеет EC_{50} , равную 0,38 мкМ.

Активность против гепатита В

Способность активных соединений подавлять рост вируса гепатита в культурах клеток 2.2.15 (клетки HepG2, трансформированные вирионом гепатита) можно определить так, как это подробно описано ниже.

В научной литературе даны краткое изложение и описание анализа для определения антивирусного действия в культуральной системе и анализа ДНК вируса гепатита В (HBV) (Korba and Milman, 1991, *Antiviral Res.*, 15:217). Антивирусную активность оптимально оценивают в двух отдельных пассажах клеток. Все лунки во всех планшетах засеваются с одинаковой плотностью и в одно и то же время.

Из-за существующих различий между уровнями внутриклеточной и внеклеточной ДНК вируса гепатита В (HBV) только величины подавления роста, превышающие в 3,5 раза (для ДНК вириона HBV) или в 3,0 раза (для промежуточных продуктов репликации ДНК HBV) средние уровни для этих форм ДНК HBV в необработанных клетках, считаются статистически значимыми ($P<0,05$). Уровни интегрированной ДНК HBV в каждом клеточном препарате ДНК (которые остаются постоянными в расчете на клетку в этих экспериментах) используют для вычисления уровней внутриклеточных форм ДНК HBV, в результате чего гарантируется сравнение равных количеств клеточной ДНК в разных образцах.

Типичные значения для внеклеточной ДНК вириона HBV в необработанных клетках составляют от 50 до 150 пг/мл культуральной среды (среднее значение равно примерно 76 пг/мл). Промежуточные продукты репликации внутриклеточной ДНК HBV в необработанных клетках составляют от 50 до 100 пг/мкг клеточной ДНК (среднее значение равно примерно 74 пг/мкг клеточной ДНК). Как правило, снижение уровней внутриклеточной ДНК HBV под воздействием антивирусных соединений является менее выраженным и происходит более медленно, чем снижение уровней ДНК вириона HBV (Korba and Milman, 1991, *Antiviral Res.*, 15:217).

Анализы гибридизации, выполненные для этих экспериментов, позволили получить значения эквивалентности, равные примерно 1,0 пг внутриклеточной ДНК HBV на 2-3 геномные копии в клетке и 1,0 пг/мл внеклеточной ДНК HBV на 3×10^5 вирусных частиц/мл.

Анализы токсичности выполняли для определения влияния антивирусной активности на жизнеспособность клетки. С этой целью использовали метод измерения поглощения нейтрального красного красителя, стандартный и широко используемый анализ определения жизнеспособности клеток в разных системах вирус-хозяин, включая HSV и ВИЧ. Анализы токсичности выполняли на 96-луночных плоскодонных планшетах для культивирования тканей. Клетки, используемые для анализов токсичности, культивировали и обрабатывали испытуемыми соединениями аналогично схеме, описанной ниже для оценки антивирусного действия. Все соединения испытывали в 4 концентрациях и в трех культурах (лунки "A", "B" и "C"). Относительный уровень токсичности определяли по поглощению нейтрального красного красителя. Поглощение красителя внутри клеток при 510 нм (A_{510}) используют для выполнения количественного анализа. Полученные значения выражены в процентах средних значений A_{510} для 9 разных культур необработанных клеток, находившихся на таком же 96-луночном планшете, что и испытуемые соединения.

Активность против гепатита С

Активность соединений против гепатита С можно определить на основании ингибиования полимеразы вируса гепатита С (HCV), ингибиования других ферментов, необходимых для цикла репликации, или с помощью других известных методик. В научной литературе приведены описания ряда тестов, предназначенных для определения этой активности.

В заявке WO 97/12033, поданной 27 сентября 1996 г. Эмори университетом, список С, авторы изобретения С. Hagedorn и A. Reinoldus, с приоритетом по заявке U.S.S.N. 60/004383, поданной в сентябре 1995 г., рассмотрен анализ полимеразы HCV, который можно использовать для определения активности описываемых здесь соединений. По этой заявке и изобретению выдана лицензия фирме Triangle Pharmaceuticals, Inc., Durham, North Carolina. Другие анализы полимеразы HCV описаны Bartholomeusz, et al., Hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase assay using cloned HCV non-structural proteins; Antiviral Therapy 1996:1 (Supp 4) 18-24.

Подавление аномальной пролиферации клеток

В соответствии с альтернативным вариантом осуществления изобретения указанные соединения используют для подавления аномальной пролиферации клеток. Активность соединения можно определить обычным способом, в частности способом, применяемым Национальным институтом рака, или любым другим известным тестом, например тестом, приведенным в заявке WO 96/07413.

Уровень противораковой активности можно легко определить, анализируя соединение в соответствии с нижеследующим способом, используя клетки СЕМ или другой линии опухолевых клеток. Клетки СЕМ являются клетками лимфомы человека (линию Т-лимфобластоидных клеток можно приобрести в ATCC, Rockville, MD). Токсичность соединения в отношении клеток СЕМ позволяет получить полезную информацию, касающуюся противоопухолевой активности соединения. Токсичность измеряют в виде IC_{50} (микромолярная концентрация). IC_{50} означает такую концентрацию испытуемого соединения, которая подавляет рост 50% опухолевых клеток в культуре. Чем ниже IC_{50} , тем выше активность соединения в качестве противоопухолевого средства. Как правило, 2'-фторнуклеозид оказывает противоопухолевое действие, и его можно использовать для подавления аномальной пролиферации клеток, если он обладает токсичностью в отношении СЕМ или другой линии иммортализованных опухолевых клеток менее 50 мкМ, более предпочтительно менее примерно 10 мкМ и особенно предпочтительно менее 1 мкМ. По три образца лекарственных растворов, включая циклогексимид, используемый в качестве положительного эталона, анализируют на планшетах в 50 мкл питательной среды с концентрацией, в 2 раза превышающей конечную, и уравновешивают при температуре 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Клетки логарифмической фазы добавляют в 50 мкл питательной среды до конечной концентрации 2,5×10³ (СЕМ и SK-MEL-28), 5×10³ (MMAN, MDA-MB-435s, SKMES-1, DU-145, LNCap) или 1×10⁴ (PC-3, MCF-7) клеток/лунку и инкубируют в течение 3 дней (DU-145, PC-3, MMAN), 4 дней (MCF-7, SK-MEL-28, СЕМ) или 5 дней (SK-MES-1, MDA-MB-435s, LNCaP) при температуре 37°C в атмосфере воздуха с 5% CO₂. В контрольные лунки помещают только среду (контрольный опыт) и клетки вместе со средой без лекарственного средства. После окончания периода роста в каждую лунку добавляют 15 мкл раствора красителя из набора Cell Titer 96 (Promega, Madison, WI) и планшеты инкубируют в течение 8 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Затем в каждую лунку добавляют основной раствор из набора Cell Titer 96 и инкубируют 4-8 ч в инкубаторе. Поглощение регистрируют при 570 нм, выполняя контрольное испытание в отношении лунок, содержащих только среду, при помощи спектрофотометра для прочтения планшетов Biotek Biokinetics (Biotek, Winooski, VT). Высчитывают среднее процентное значение подавления роста по сравнению с необработанным контрольным образом. IC_{50}/IC_{90} , наклон кривой и значение г высчитывают по методу Chou и Talalay. Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul. 1984, 22:27-55.

Активное соединение можно вводить специально для подавления аномальной пролиферации клеток и, в частности, гиперпролиферации клеток. Примерами аномальной пролиферации клеток являются, но не ограничиваются ими, доброкачественные опухоли, в том числе папиллома, аденома, фиброма, хондрома, остеома, липома, гемангиома, лимфангиома, лейомиома, рабдомиома, менингиома, неврома, ганглионеврома, невус, феохромоцитома, невринома, фиброаденома, тератома, хорионаденома, гранулематека, опухоль Бреннера, арренобластома, адренокортикоидная аденома яичника, мезенхима зародышевых тяжей, интерстициальный эндокриноцит и тимома, а также пролиферация клеток гладких мышц при образовании тромбов в кровеносных сосудах; злокачественные опухоли (рак), в том числе карцинома, рак почки, аденокарцинома предстательной железы, рак мочевого пузыря и аденокарцинома, фибросаркома, хондросаркома, остеосаркома, липосаркома, гемангиосаркома, лимфангиосаркома, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, миелоцитарный лейкоз, эритролейкоз, множественная миелома, глиома, менингиальная саркома, тимома, листовидная цистосаркома, аденомиосаркома, тератома, хориокарцинома, кожная Т-клеточная лимфома (CTCL), первичные кожные опухоли (например, базально-клеточный рак, плоскоклеточный рак, меланома и болезнь Бовена), рак молочной железы и другие опухоли, инфильтрующие кожу, саркома Капоши, а также предраковые и раковые заболевания слизистой оболочки, включая заболевания ротовой полости, мочевого пузыря и прямой кишки; предраковые образования, микоз,

псориаз, дерматомиозит, ревматоидный артрит, вирусные заболевания (например, бородавки, простой герпес и кондилома), контагиозный моллюск, предраковые и раковые заболевания женских половых путей (шейка матки, влагалище и наружные женские половые органы). Эти соединения можно также использовать для прерывания беременности.

В соответствии с этим вариантом осуществления изобретения активное соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят в эффективном количестве для уменьшения гиперпролиферации клеток-мишеней. Активное соединение может быть модифицировано с введением в него целенаправленного фрагмента, который концентрирует соединение на активном сайте. Целенаправленные фрагменты могут включать антитело или фрагмент антитела, который связывается с белком на поверхности клетки-мишени, включая, но не ограничиваясь ими, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), семейство с-Esb-2 рецепторов и эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF).

Фармацевтические композиции

Субъектам, страдающим вышеуказанными заболеваниями, можно вводить эффективное количество активного соединения, его фармацевтически приемлемого производного или соли в присутствии фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя. Активные вещества можно вводить любым известным способом, например перорально, парентерально, внутривенно, внутрикожно, подкожно или местно, в жидкой или твердой форме. Предпочтительная доза соединения для всех вышеуказанных заболеваний составляет от около 1 до 50, предпочтительно 1-20, обычно от 0,1 до около 100 мг/кг массы тела рецепента в день. Эффективную дозу фармацевтически приемлемых производных можно высчитать с учетом массы исходного нуклеозида, предназначенного для введения. Если производное соединение само обладает необходимой активностью, эффективную дозу можно определить, как это показано выше, исходя из массы производного, или другими способами, известными специалистам в этой области.

Соединение обычно вводят в любой приемлемой лекарственной форме, которая содержит от 7 до 3000, предпочтительно от 70 до 1400 мг активного ингредиента в стандартной лекарственной форме. Доза для перорального введения, равная 50-1000 мг, обычно бывает достаточной.

Активный ингредиент необходимо вводить с достижением максимальных концентраций активного соединения в плазме от около 0,2 до 70 пМ, предпочтительно от около 1,0 до 10 мкМ. Такую дозу обычно вводят внутривенной инъекцией 0,1-5% раствора активного ингредиента, необязательно в физиологическом растворе, или в виде болюса активного ингредиента.

Концентрация активного соединения в лекарственной композиции зависит от скоростей поглощения, инактивации и выведения лекарственного средства, а также от других факторов, известных специалистам в этой области. Следует отметить, что величина дозы может также изменяться в зависимости от серьезности заболевания. Необходимо понять, что для любого конкретного пациента схема приема лекарственного средства должна изменяться с течением времени в зависимости от потребностей пациента и профессионального мнения специалиста, следящего за введением композиций, и что вышеуказанные концентрации приведены только в качестве примеров и не ограничивают объем настоящего изобретения или способы введения заявленной композиции. Активный ингредиент можно вводить в виде однократной дозы или его можно разделить на несколько меньших доз, которые вводят через разные интервалы времени.

Предпочтительным способом введения активного соединения является пероральный. Композиции для перорального введения обычно содержат инертный разбавитель или усваиваемый носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. В случае перорального введения активное соединение может быть соединено с наполнителями и использовано в виде таблеток, лепешек или капсул. В композицию могут быть введены фармацевтически совместимые связывающие агенты и/или адьюванты.

Таблетки, пилюли, капсулы, лепешки и тому подобные формы могут содержать любые из вышеуказанных ингредиентов или соединения подобного характера и связывающее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагант или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза; дезинтегрирующее вещество, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стеротес; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как манго, метилсалцилат или апельсиновый экстракт. Лекарственная форма в виде капсулы содержит помимо вещества вышеуказанного типа жидкий носитель, такой как нелетучее жирное масло. Кроме того, лекарственные формы могут содержать разные другие вещества, модифицирующие физическую форму лекарственной формы, например покрытия из сахара, шеллака или другие энтеросолюбильные оболочки.

Это соединение можно вводить в качестве компонента эликсира, суспензии, сиропа, вафлей, жевательной резинки и т.п. Сироп может содержать помимо активных соединений сахарозу в качестве подсластителя и определенные консерванты, красители, пигменты и ароматизаторы.

Это соединение, его фармацевтически приемлемое производное или соли можно также смешивать с другими активными веществами, которые не ухудшают требуемое действие, или с веществами, которые дополняют требуемое действие, такими как антибиотики, противогрибковые средства, противовоспалительные средства или другие антивирусные средства, в том числе другие нуклеозидные соединения. Рас-

твры или супензии, используемые для парентерального, внутривенного, подкожного или местного применения, могут содержать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и средства, регулирующие тонус, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может находиться в ампулах, одноразовых шприцах или флаконах из стекла или пластика, содержащих несколько доз.

В случае внутривенного введения предпочтительными носителями являются физиологический раствор или физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS).

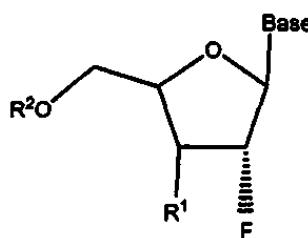
В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения активные соединения смешивают с носителями, защищающими соединение от быстрого выведения из организма и получают препарат с регулируемым высвобождением, в частности имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки лекарственного средства. Можно использовать биологически разлагаемые и биологически совместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимер молочной кислоты. Способы получения таких препаратов известны специалистам в этой области. Необходимые вещества можно также приобрести в корпорации Alza Corporation.

Липосомные супензии (включая липосомы, действующие на инфицированные клетки моноклональными антителами против вирусных антигенов) также являются предпочтительными в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Эти препараты можно получить в соответствии со способами, известными специалистам в этой области, например, описанными в патенте США № 4522811 (который полностью включен в это описание изобретения в качестве ссылки). Липосомные препараты можно получить, растворяя один или несколько соответствующих липидов (таких как стеароилфосфатидилэтаноламин, стеароилфосфатидилхолин, арахадоилфосфатидилхолин и холестерин) в неорганическом растворителе, который затем выпаривают, в результате чего получают тонкую пленку высущенного липида на поверхности сосуда. Затем в этот сосуд вводят водный раствор активного соединения, его монофосфата, дифосфата и/или трифосфата. Сосуд встрихивают рукой, чтобы отслоить липидное вещество от боковых стенок сосуда и диспергировать липидные агрегаты, в результате чего образуется липосомная супензия.

Это изобретение описано со ссылкой на предпочтительные варианты его осуществления. Специалистам в этой области должны быть очевидны варианты и модификации изобретения из приведенного выше подробного описания изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение 2'-фтор-β-D-нуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В у человека, в котором 2'-фтор-β-D-нуклеозид имеет формулу



в которой Base обозначает пуриновое основание;

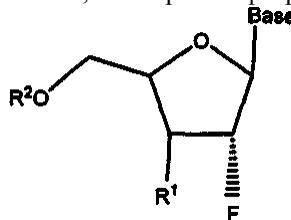
R^1 обозначает OH , H , OR^3 , N_3 , CN , галоген, CF_3 , $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил, амино, $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкиламино, ди- $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкиламино;

R^2 обозначает H , монофосфат, дифосфат, трифосфат, ацил или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна дать соединение, в котором R^2 обозначает H или фосфат; эфир сульфокислоты, включая $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкилсульфонил или $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ арилалкилсульфонил, в том числе метансульфонил; бензил, в котором фенильная группа необязательно замещена одним или несколькими заместителями, выбираемыми из группы, включающей гидроксил, амино, алкиламино, ариламино, аллокси, арилокси, нитро, циано, сульфокислоту, сульфат, фосфоновую кислоту, фосфат или фосфонат; и

R^3 обозначает ацил, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил, фосфат или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна отщепляться с образованием исходного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

2. Применение 2'-фторнуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для

лечения инфекционного гепатита С у человека, в котором 2'-фторнуклеозид имеет формулу



в которой Base обозначает пуриновое или пиримидиновое основание;

R¹ обозначает OH, H, OR³, N₃, CN, галоген, CF₃, C₁-C₄алкил, амино, C₁-C₄алкиламино, ди-C₁-C₄алкиламино или алcoxис;

R² обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат, ацил или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна дать соединение, в котором R² обозначает H или фосфат; эфир сульфокислоты, включая C₁-C₁₀алкилсульфонил или C₁-C₁₀арилалкилсульфонил, в том числе метансульфонил; бензил, в котором фенильная группа необязательно замещена одним или несколькими заместителями, включающими гидроксил, амино, алкиламино, ариламино, алcoxис, арилокси, нитро, циано, сульфокислоту, сульфат, фосфоновую кислоту, фосфат или фосфонат; и

R³ обозначает ацил, C₁-C₁₀алкил, фосфат или другую фармацевтически приемлемую отщепляемую группу, которая при введении *in vivo* способна отщепляться с образованием исходного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

3. Применение по п.1 или 2, где R² обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат или ацил.
4. Применение по п.1 или 2, где R¹ обозначает H, OH, OR³, C₁-C₄алкил или галоген.
5. Применение по пп.1-4, где R³ обозначает ацил.
6. Применение по пп.1-4, где R² обозначает H, монофосфат, дифосфат, трифосфат или ацил; R¹ обозначает H, OH, C₁-C₄алкил или галоген и R³ обозначает ацил.
7. Применение по п.2, где основание обозначает пуриновое основание.
8. Применение по п.2, где основание обозначает пиримидиновое основание.
9. Применение по п.1, где основание является пуриновым основанием, выбираемым из группы, состоящей из гуанина, аденина, гипоксантина, 2,6-диаминопурина и 6-хлорпурина.
10. Применение по п.1 или 2, где R¹ и R² обозначают водород.
11. Применение по п.1 или 2, где R¹ обозначает OH или OR³.
12. Применение по п.1 или 2, где R¹ обозначает OH.
13. Применение по п.1 или 2, где R¹ обозначает H.
14. Применение по п.1 или 2, где R¹ обозначает галоген.
15. Применение по п.1 или 2, где R¹ обозначает C₁-C₄алкил или CF₃.
16. Применение по п.1 или 2, где R² обозначает ацил.
17. Применение по п.1 или 2, где основание обозначает пуриновое основание, выбираемое из аденина, N⁶-алкилпуринов, N⁶-ацилпуринов, где ацил является C(O) (алкилом, арилом, алкиларилом или арилалкилом), N⁶-бензилпурина, N⁶-галогенпурина, N⁶-винилпурина, N⁶-ацетиленпурина, N⁶-ацилпурина, N⁶-гидроксиалкилпурина, N⁶-тиоалкилпурина, N²-алкилпуринов, N²-алкил-6-тиопуринов, гуанина, гипоксантина, 2,6-диаминопурина, 2-хлор-2-аминопурина, инозина или 6-хлорпурина.
18. Применение по п.2, где основание обозначает пиримидиновое основание, выбираемое из тимина, цитозина, 5-фторцитозина, 5-метилцитозина, 6-азапиримидина, в том числе 6-азаситозина, 2- и/или 4-меркаптопиримидина, урацила, 5-галогенурацила, в том числе 5-фторурацила, C⁵-алкилпиримидинов, C⁵-бензилпиримидинов, C⁵-галогенпиримидинов, C⁵-винилпиримидина, C⁵-ацетиленпиримидина, C⁵-ацилпиримидина, C⁵-гидроксиалкилпурина, C⁵-амидопиримидина, C⁵-цианопиримидина, C⁵-нитропиримидина, C⁵-аминопиримидина, 5-азаситидинила, 5-азаурацилила, триазолопиридинила, имидазолопиридинила, пирролопиридинила или пиразолопиридинила.
19. Применение по п.1 или 2, где лекарственное средство является подходящим для орального введения.
20. Применение по п.1 или 2, где лекарственное средство является подходящим для парентерального введения.
21. Применение по п.1 или 2, где лекарственное средство является подходящим для внутривенного введения.
22. Применение 2'-фтор-β-D-пуринового нуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.
23. Применение 2'-фтор-β-D-пуринового или пиримидинового нуклеозида для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита С.
24. Применение по п.22 или 23, где лекарственное средство является подходящим для орального

введения.

25. Применение по п.22 или 23, где лекарственное средство является подходящим для парентерального введения.

26. Применение по п.22 или 23, где лекарственное средство является подходящим для внутривенного введения.

