

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **028742**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2017.12.29**

**(21)** Номер заявки  
**201370186**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2010.05.20**

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

**(54) ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ  
НУКЛЕОЗИДНЫХ ФОСФОРАМИДАТОВ**

**(31)** 61/319,513; PCT/US2010/035641

**(32)** 2010.03.31; 2010.05.20

**(33)** US; WO

**(43)** 2015.02.27

**(62)** 201171417; 2010.05.20

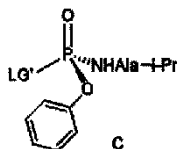
**(56)** WO-A2-2008121634  
WO-A2-2007095269  
US-A1-20060241064

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

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

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

**(57)** Изобретение относится к соединениям, представленным структурой С, где LG' представляет собой п-нитрофеноксид, п-хлорфеноксид, о-хлорфеноксид, 2,4-динитрофеноксид или пентафторфеноксид. Соединения предложено применять в качестве промежуточных продуктов для получения нуклеозидных фосфорамидатов, которые используют в качестве средств для лечения вирусных заболеваний.

**B1****028742****028742****B1**

### Область техники

В данной заявке описаны промежуточные соединения для получения нуклеозидных фосфорамидатов, которые применяют в качестве средств для лечения вирусных заболеваний. Нуклеозидные фосфорамидаты являются ингибиторами РНК-зависимой РНК вирусной репликации и являются полезными в качестве ингибиторов NS5В полимеразы вируса гепатита С, в качестве ингибиторов репликации вируса гепатита С (HCV) и для лечения инфекции гепатита С у млекопитающих.

### Уровень техники

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

Вирион вируса гепатита С является оболочечным позитивно-цепочечным вирусом РНК с одной олигорибонуклеотидной геномной последовательностью, состоящей из приблизительно 9600 оснований, которая кодирует полипротеин, состоящий из приблизительно 3,010 аминокислот. Белковые продукты гена вируса гепатита С состоят из структуральных белков С, Е1 и Е2 и не структуральных белков NS2, NS3, NS4А и NS4В, и NS5А и NS5В. Неструктуральные (НС) белки, как считают, должны обеспечивать каталитический механизм для вирусной репликации. NS3 протеаза высвобождает NS5В, РНК-зависимую РНК полимеразу из полипротеиновой цепи. NS5В полимеразу вируса гепатита С необходима для синтеза двухцепочечной РНК из одноцепочечной вирусной РНК, которая служит темплатой в цикле репликации вируса гепатита С. Поэтому NS5В полимеразу считают необходимым компонентом в комплексе репликации вируса гепатита С (K. Ishi, et al., *Heptology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118). Ингибирование полимеразы NS5В вируса гепатита С предотвращает образование двухцепочечной РНК вируса гепатита С и поэтому представляет собой привлекательный подход для разработки противовирусной терапии, специфичной к вирусу гепатита С.

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

#### Флавивирусы.

Семейство вирусов *Flaviviridae* (флавивирусов) содержит как минимум три различных рода: пестивирусы, которые вызывают заболевание у крупного рогатого скота и свиней; флавивирусы, которые являются первичной причиной заболеваний, таких как лихорадка Денге и желтая лихорадка; и гепацивирусы, единственным членом которых является вирус гепатита С. Род флавивирусов включает более чем 68 членов, разделенных на группы на основании серологической связанности (Calisher et al., *J. Gen. Virol.*, 1993, 70, 37-43). Клинические симптомы варьируются и включают лихорадку, энцефалит и гемморагическую лихорадку (Fields *Virology*, Editors: Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). Флавивирусы в глобальном масштабе, связанные с человеческими заболеваниями, включают гемморагическую форму лихорадки Денге (ФЛД), вирус желтой лихорадки, шоковый синдром и вирус японского энцефалита (Halstead, S.B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984, 6, 251-264; Halstead, S.B., *Science*, 239:476-481, 1988; Monath, T.P., *New Eng. J. Med.*, 1988, 319, 641-643).

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

Пестивирусы и гепацивирусы являются близкородственными группами вирусов в семействе *Flaviviridae*. Другие близкородственные вирусы в данном семействе включают GB вирус-А, GB вирус А-подобные агенты, GB вирус-В и GB вирус-С (который также называют вирусом гепатита G, HGV). Гепа-

цивирусная группа (вирус гепатита С) состоит из ряда близкородственных, но генотипно различных вирусов, инфицирующих людей. Существует как минимум 6 генотипов вируса гепатита С и более чем 50 подтипов. Ввиду подобия между пестивирусами и гепацивирусами, в сочетании с низкой способностью гепацивирусов к эффективному росту в клеточной культуре, вирус диареи крупного рогатого скота (ВДКРС) часто используют в качестве суррогата для изучения вируса гепатита С.

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

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

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

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

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

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

Нуклеозидные ингибиторы NS5B полимеры могут действовать либо в качестве неструктурального субстрата, что приводит к обрыванию цепи, или в качестве конкурентного ингибитора, который конку-

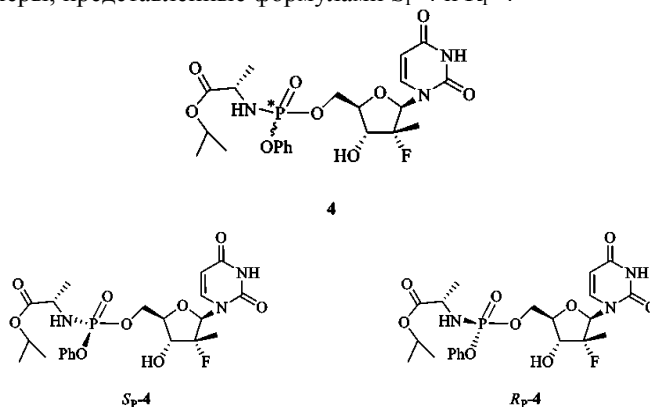
рирует с нуклеотидом за связывание полимеразы. Для функционирования в качестве агента, обрывающего цепь, нуклеозидный аналог должен быть поглощен клеткой и превращен *in vivo* в трифосфат для конкуренции за полимеразный нуклеотидный сайт связывания. Такое превращение в трифосфат обычно опосредовано клеточными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

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

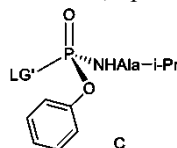
Также полезность нуклеозидов в качестве жизнеспособных терапевтических агентов ограничена их иногда плохими физико-химическими и фармакокинетическими свойствами. Такие плохие свойства могут ограничивать абсорбцию агента в кишечнике и ограничивать поглощение в ткани или клетки-мишени. Для улучшения их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

#### Краткое описание изобретения

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

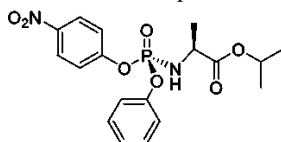


Настоящее изобретение относится к соединению, представленному структурой С

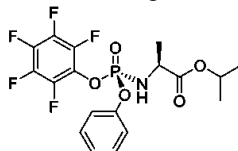


где LG' представляет собой п-нитрофеноксид, п-хлорфеноксид, о-хлорфеноксид, 2,4-динитрофеноксид или пентафторфеноксид. Предпочтительно LG' представляет собой п-нитрофеноксид, 2,4-динитрофеноксид или пентафторфеноксид.

В предпочтительном варианте предложенное изобретение относится к соединению формулы

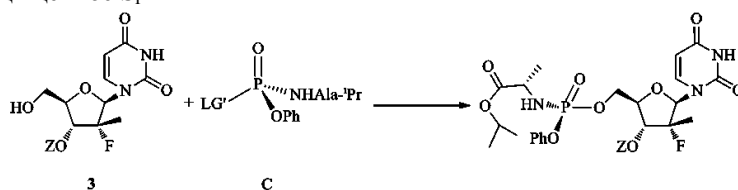


В предпочтительном варианте предложенное изобретение относится к соединению формулы



Предложенное соединение С предназначено для получения нуклеозидного фосфоамидата указанной выше формулы S<sub>p</sub>-4.

Получение соединения S<sub>p</sub>-4, включает: а) реакцию изопропил-аланил-фосфоамидата (С) с 3'-О-защищенным или незащищенным 3 и основным реагентом с получением композиции, содержащей защищенное или незащищенное S<sub>p</sub>-4

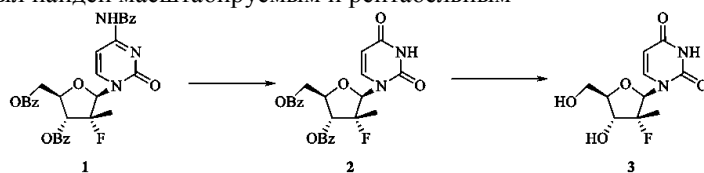


где Z является защитной группой или водородом, LG' представляет собой отходящую группу, и б) необязательно подвергание полученного защищенного или незащищенного S<sub>p</sub>-4 хроматографии, экстракции или кристаллизации с получением очищенного защищенного или незащищенного S<sub>p</sub>-4. В подварианте исполнения LG' представляет собой тозилат, камфоросульфат или арилоксид, замещенный как минимум одной электроноакцепторной группой, более преимущественно LG' выбирают из п-нитрофеноксида, 2,4-динитрофеноксида и пентафторфеноксида. В дополнительном подварианте исполнения, если S<sub>p</sub>-4 защищен, т.е. Z не является водородом, способ дополнительно включает снятие защитных групп с S<sub>p</sub>-4. В дополнительном подварианте исполнения реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, тетрагидрофуран или другой эфирный растворитель, отдельно по одному или в комбинации друг с другом или с C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub> нитрилом, например ацетонитрилом.

### Примеры

Синтетические аспекты.

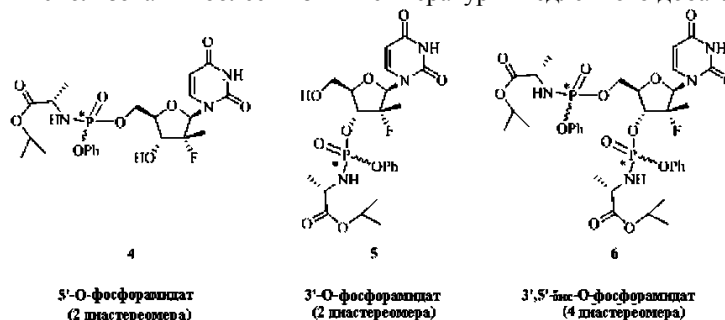
Для получения уридинового нуклеозида можно использовать преимущество усовершенствованного трибензоилированного цитидинового промежуточного вещества в синтезе определенных 3',5'-диацилированных аналогов 3 (см ниже), уже эффективно полученных на опытной установке (см WO 2006/031725 или US 2006/0122146,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



3',5'-О-Дибензоил-2'-дезоксигуанидин-2'-фтор-2'-С-метил-N<sup>4</sup>-бензоилцитидин (1) получали способом, описанным в WO 2006/031725 и WO 2008/045419, обе из которых полностью включены этим в данную заявку путем ссылки 1, обрабатывали 70% водной уксусной кислотой с образованием 3',5'-О-дибензоил-2'-дезоксигуанидин-2'-фтор-2'-С-метилуридина (2). Бензоиловые сложные эфиры могут быть подвергнуты гидролизу при помощи ряда способов, а также, например, алкоксидами в спиртовом растворителе, например метоксидом натрия в метаноле, карбонатом калия в метаноле, или аналогами этанола, алкиламинами, например метиламином в метаноле, бутиламином и т.д. Метанольный аммоний был выбран ввиду большего масштаба. Уридиновый продукт (3) может быть очищен кристаллизацией с получением 70% выхода из трибензоилированного цитидина.

В многочисленной литературе подробно описаны различные маршруты и условия получения фосфоамида при помощи нескольких кратных эквивалентов реагентов; см., например, McGuigan et al., J. Med. Chem. 2005, 48, 3504-3515 и McGuigan et al., J. Med. Chem. 2006, 49, 7215. Для масштабирования процесса, в настоящее время существует только один известный пример, описанный в Lehsten et al., Org. Process Res. Dev. 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). В данной ссылке авторы вводят концепцию "одностадийной процедуры", в которой гидрохлоридная соль аминокислоты и фенилдихлорфосфат реагируют вместе с N-метилимидазолом в дихлорметане. Далее добавляют нуклеозид с образованием целевого 5'-О-

фосфорамиданого продукта, который в данном случае может приводить к получению соединения, представленного формулой 4. К сожалению, процедура Lehsten имеет недостатки. Например, процедура Lehsten использует гораздо больший избыток реагентов, чем это требуется, что добавляет затраты и трудности при хроматографической очистке. Дополнительно, Lehsten предложил, что можно контролировать селективность реакции при 5'-гидроксиле, а не при 3'-гидроксиле по сравнению с литературной ссылкой, посредством использования более низких температур и медленного добавления нуклеозида.



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

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

Для стехиометрии реагентов было проведено исследование, в котором стехиометрия реагентов была систематически изменена и результаты контролировали при помощи ЯМР на ядрах фосфора неочищенной реакционной смеси, как было сообщено Lehsten. В более успешных реализациях сравнивали выход выделенного продукта и чистоту целевого продукта. Наблюдали, что первичный 5'-гидроксил реагирует с более высокой скоростью, чем вторичный 3'-гидроксил. Это создает конкурирующую ситуацию между ходом реакции с расходом всего исходного нуклеозида и превращения 5'- и 3'-монозамещенных продуктов (4 и 5) в 5',3'-бис замещенные продукты (6). 3'-Монозамещенный продукт превращается в бис-продукт при более высокой скорости, чем 5'-монозамещенный продукт, так что возможно уменьшить уровень загрязнения 3'-диастереомером путем подталкивания реакции в образование большего количества бис-замещенных продуктов. Однако при эффективном способе удаления 3'-диастереомеров реакция может быть оптимизирована для получения большего количества целевого 5'-диастереомера без потребности в потере того количества 5'-диастереомера, который превращается в бис-замещенный (6). Также наблюдали, что гидрохлорид аминокислоты является крайне гигроскопичным. Поскольку любая присутствующая вода будет загрязнять эквивалентное количество фенилдиблорфосфатного реагента, необходимо уделить внимание тому, чтобы аминокислота была существенно безводной, либо ее нужно сделать существенно безводной перед применением. Кратко, Lehsten сообщил, что оптимальное соотношение аминокислоты и фенилдиблорфосфата и нуклеозида составляет 3,5:2,5:1 соответственно. Было найдено, что оптимальное соотношение аминокислоты и фенилдиблорфосфата и нуклеозида, составляющее приблизительно 1,6 к приблизительно 1,3 к приблизительно 1, является оптимальным в условиях, в которых 3'-диастереомер может быть эффективно удален, и в которых гидрохлорид аминокислоты является существенно безводным. Путем применения меньшего количества реагентов, достигают экономии средств наряду с упрощением хроматографического разделения целевого продукта от побочных продуктов реагента и от уменьшенного уровня бис-диастереомеров.

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

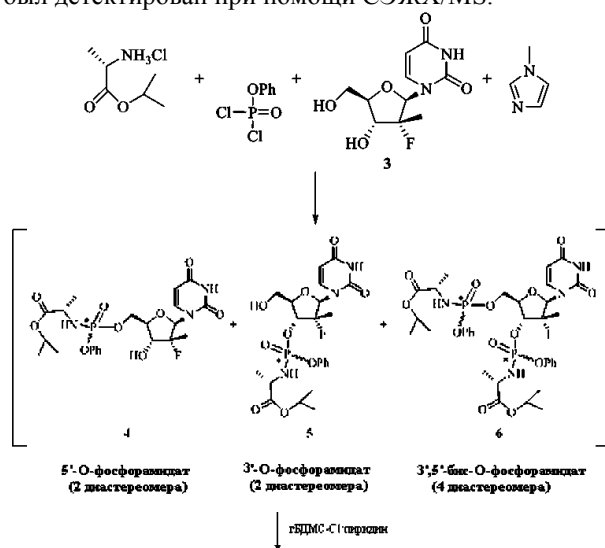
Другим альтернативным подходом было использование прямого синтеза и затем химии для того, чтобы способствовать дифференциации 3'-диастереомерных примесей 5 от целевых 5'-диастереомеров 4 для того, чтобы способствовать разделению. Целевой являлась группа, которая могла селективно реагировать со свободным первичным гидроксидом 3'-О-фосфорамидатной примеси 5 по сравнению с вторич-

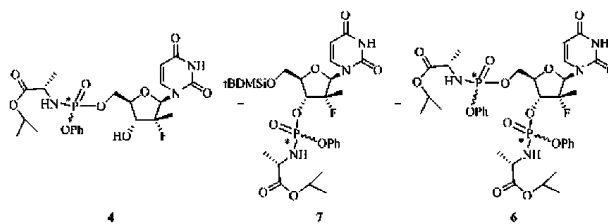
ным гидроксильным целевого 5'-О-фосфорамидата 4. Также было желательным, чтобы блокирующая группа значительно изменяла полярность полученного в результате 5'-О-блокированного 3'-О-фосфорамидатного продукта от целевого 5'-О-фосфорамидата 4. Отсутствовала дополнительная стадия, необходимая для удаления блокирующей группы, поскольку целевые 5'-диастереомеры 4 не были изменены. Химически измененные 3'-диастереомеры затем могли позволить более легкое хроматографическое разделение или разделение при помощи специальных улавливающих подложек или экстракций.

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

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

Следующая схема является основной схемой реакции, проиллюстрированной для получения изопропил L-аланатфенилфосфорамидата 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина с основным продуктом, в виде целевого 5'-О-фосфорамидата (4, два диастереомера) и побочного продукта, в виде 3'-О-фосфорамидата (5, два диастереомера) и 3',5'-бис-О-фосфорамидата (6, четыре диастереомера). Реагент добавляют в стехиометрических соотношениях, как описано в разделе "Способ получения". Реакции позволяли проходить до того, как осталось приблизительно 5% исходного материала, по данным УФ-визуализации тонкослойной хроматографии (ТСХ). Также СЭЖХ/МС показало, что было образовано приблизительно 10% 3',5' бис-фосфорамидата 6 по сравнению с целевым 5'-продуктом. После гашения и обработки водным кислым раствором неочищенный остаток из органического слоя получали для силилирования. В описанных условиях реакции силильная группа преимущественно реагировала со свободным 5'-гидроксильным 3'-О-фосфорамидатом с образованием 7. Реакцию продолжали, пока 3'-О-фосфорамидат больше не был детектирован при помощи СЭЖХ/МС.





3'-О-фосфорамидат-5'-О-тБДМС  
(2 диастереомера)

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

Способ получения.

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

В 10-литровую колбу добавляли 3', 5'-О-дипбензоил-2'-дезоксидезокси-2'-фтор-2'-С-метил-N4-бензоилцитидина (500 г, 0,874 моль) и 70% водную уксусную кислоту (7,5 л). Раствор нагревали до возврата флегмы (110°C) в течение 20 ч. ТСХ указывала на завершение реакции (фактор ретенции 0,6 в 5% метаноле в дихлорметане (ДХМ)). Смесь охлаждали до температуры окружающей среды и разбавляли водой (2 л). После перемешивания в течение 2 ч полученный в результате осадок собирали путем фильтрования и твердое вещество промывали водой (5 л), сушили на открытом воздухе при температуре окружающей среды в течение 12 ч с получением 360 г (88%). Данное дипбензоилуридиновое промежуточное вещество использовали непосредственно в следующей стадии путем добавления его всего к свежеполученному метанольному аммонiu (5,4 л, прибл. 25%) при 0°C. Данную температуру поддерживали в течение 3 ч и затем позволяли нагреваться до 15°C в течение 24 ч. ТСХ указывала на завершение реакции (фактор ретенции 0,4 в 10% метаноле в ДХМ). Реакционную смесь фильтровали через целитную подложку и концентрировали при сниженном давлении с получением неочищенного продукта (216 г). Неочищенный продукт перемешивали с этилацетатом (325 мл) в течение 3 ч при температуре окружающей среды. Полученное в результате собирали путем фильтрования и промывали этилацетатом (216 мл). Твердое вещество высушивали в вакууме при температуре окружающей среды в течение 4 ч с получением 160 г (78%) целевого продукта с 98,7% ВЭЖХ чистоты. <sup>1</sup>H-ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,44 (br s, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, C-6H), 5,97 (d, 1H, C-1'H), 5,64 (d, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (m, 3H, C-5'-Ha, C-3'H, C-4'H), 3,63-3,60 (m, 1H, C5'-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'-CH<sub>3</sub>). ES-MS (масс-спектрометрия с электрораспылением) M-1259.

Пример 2. Получение изопропильного эфира (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]феноксифосфориламино}пропионовой кислоты (4).

Синоним: диастереоизомерная смесь 5'-О-(изопропил-L-аланат, фенилфосфорамидил)-2'-дезоксидезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина.

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

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

К неочищенному продукту добавляли безводный пиридин (1700 мл). Растворитель испаряли при сниженном давлении и затем в высоком вакууме для уменьшения содержания воды неочищенной смеси посредством совместного испарения. Полученное в результате масло повторно растворяли в безводном пиридине (500 мл) и затем добавляли избыток трет-бутилдиметилсилил хлорида (9,0 г, 60 мМ). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Ход реакции контролировали при по-



мощи СЭЖХ/МС. Через 3 ч 3' примесь 5 не могла быть более детектирована и реакцию гасили путем добавления метанола (50 мл).

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

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

Для получения аморфного твердого вещества диастереомерной смеси 74 г белой пены перемешивали с трет-бутилметиловым простым эфиром (750 мл) с получением в результате частичного раствора и смолистого твердого остатка. При перемешивании медленно добавляли гептан (750 мл) и суспензию механически перемешивали в течение 1 ч до превращения большей части смолы в белое твердое вещество. Твердое вещество соскребали шпателем и полученную в результате суспензию фильтровали. Твердое вещество промывали гептаном (4 × 50 мл) и сушили в вакууме (50°C, 0,2 мм Hg, 24 ч) с получением белого аморфного порошка (64 г) с широким интервалом температур плавления, составляющим прикл. 70-80°C. <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P ЯМР подтвердили структуру и ВЭЖХ показал чистоту, составляющую 99,8% с диастереомерным соотношением 46:54 (также подтверждено при помощи <sup>31</sup>P ЯМР).

Альтернативный способ получения твердой смеси 4.

После хроматографии остаток совместно испаряли дихлорметаном дважды (5 мл/г) и сушили в течение 24 ч при 35-40°C при 35-45 мТорр. Пенный остаток просеивали через 250-микронный экран и подвергали дополнительной сушке при аналогичных условиях, пока содержание остаточного дихлорметана не падало ниже 400 ppm согласно измерениям при помощи паровфазной газовой хроматографии. Полученный в результате мелкодисперсный серовато-белый и белый аморфный порошок имел диапазон температур стеклования, составляющий 53,7-63,5°C.

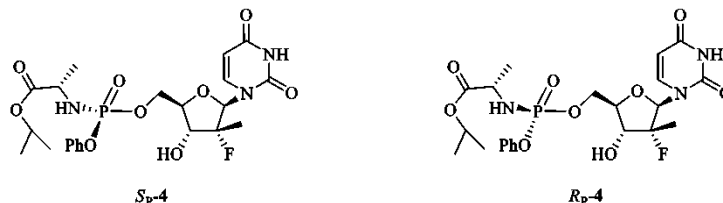
Характеристика смеси изомеров (4): <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 10,05 (br s, 1H, NH, S<sub>p</sub>), 10,00 (br s, 1H, NH, R<sub>p</sub>), 7,49 (d, 1H, C6-H, S<sub>p</sub>), 7,36 (m, 5H, C6-H, R<sub>p</sub>, ароматика), 7,23-7,14 (m, 6H, R<sub>p</sub>/S<sub>p</sub>, ароматика), 6,18 (br d, 2H, C1'-H, R<sub>p</sub>/S<sub>p</sub>), 5,63 (d, 1H, C5-H, S<sub>p</sub>), 5,58 (d, 1H, C5-H, R<sub>p</sub>), 5,01 (m, 2H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>p</sub>/S<sub>p</sub>), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H<sub>2</sub>, ala-NH, C3'-OH, R<sub>p</sub>/S<sub>p</sub>), 4,12 (m, 2 H, ala-CH-CH<sub>3</sub>, R<sub>p</sub>/S<sub>p</sub>), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, R<sub>p</sub>/S<sub>p</sub>), 1,39-1,22 (m, 12H, все CH<sub>3</sub>, R<sub>p</sub>/S<sub>p</sub>).

<sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,60 (R<sub>p</sub>), 3,20 S<sub>p</sub> относительно трифенилфосфата при -17,80 ppm. ES-MS M+1 530,2. Элементный анализ: рассчитано % (включая 0,29% воды, как найдено при помощи анализа по Карлу Фишеру) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90, F, 3,58, P, 5,84; найдено %: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Обсуждение разделения изомеров.

Соединение 4 ввиду хиральности на атоме фосфора состоит из двух диастереомеров, обозначенных как S<sub>p</sub>-4 и R<sub>p</sub>-4. Stereoхимическое распределение выполняли исходя из монокристаллического рентгеноструктурного анализа S<sub>p</sub>-4. Как R<sub>p</sub>-4, так и S<sub>p</sub>-4 давали кристаллический продукт.

Процедуры кристаллизации описаны ниже.



Пример 3. Кристаллизация  $R_{P-4}$  изомера.

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

$R_{P-4}$ :  $^1H$ -ЯМР ( $CDCl_3$ )  $\delta$  9,10 (br s, 1H, NH), 7,36 (m, 2H, o-ароматика), 7,26-7,16 (m, 4 H, C6-H, м,п-ароматика), 6,16 (br d, 1H, C1'-H), 5,58 (d, 1H, C5'-H), 5,01 (sept, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,52-4,47 (m, 2H, C-5'-H<sub>2</sub>), 4,10 (d, 1H, C3'-H), 4,02-3,76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH<sub>3</sub>), 1,37-1,20 (m, 12H, все CH<sub>3</sub>).

Пример 4. Получение и кристаллизация  $S_{P-4}$ .

Способ 1. Непосредственное осаждение из неочищенного 4.

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

Указанную выше пену растворяли в 33 мл ДХМ и затем добавляли 65 мл ИПЭ (изопропилового простого эфира) с получением насыщенного раствора. Раствор фильтровали через небольшой слой целита и фильтрат перемешивали с  $S_{P-4}$  затравкой в течение 72 ч при температуре окружающей среды (приблизительно 22°C - отметьте, что охлаждение суспензии до 0°C происходило до замасливания неочищенного продукта). Белое твердое вещество фильтровали, промывали ИПЭ (20 мл) и сушили с получением 4,58 г (~85:15 смесь  $S_{P-4}$ : $R_{P-4}$  соответственно, как определено при помощи  $^{31}P$  ЯМР) белого порошка. Указанное выше твердое вещество суспендировали в 23 мл ДХМ и затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 ч. Белое твердое вещество фильтровали, промывали 4,5 мл холодного ДХМ и сушили в высоком вакууме при 45°C с получением неочищенного  $S_{P-4}$ , температура плавления 93,9-104,7°C, ВЭЖХ чистоты 99,74% (3,11 г, 15,2% из уридинового нуклеозида).

$S_{P-4}$   $^1H$ -ЯМР ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,63 (br s, 1H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, o-ароматика), 7,26-7,18 (m, 3H, м,п-ароматика), 6,18 (br d, 1H, C1'-H), 5,70 (d, 1H, C5'-H), 5,02 (sept, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,53 (m, 2H, C-5'-H<sub>2</sub>), 4,11 (d, 1H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH<sub>3</sub>), 3,77 (br s, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C2'-CH<sub>3</sub>), 1,37 (d, 3H, ala-CH<sub>3</sub>), 1,24 (d, 6H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Способ 2. Вымасливание из неочищенного 4.

В перемешанный раствор гидрохлорида L-аланин изопропилового сложного эфира (20,6 г, 123 ммоль, азеотропно высушенный, дважды, 75 мл толуола каждый раз) в дихлорметане (200 мл) добавляли фенидихлорфосфат (14,9 мл, 100 ммоль) при комнатной температуре. Смесь охлаждали до -10°C и затем добавляли раствор NMH (61,3 мл, 769 ммоль) в 60 мл дихлорметана в течение периода, составляющего 30 мин. После завершения добавления смесь перемешивали при от -10 до -15°C в течение 1 ч. К указанной выше смеси добавляли 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридин (3) (20 г, 76,9 ммоль) одной партией, смесь перемешивали при менее -10°C в течение 3 ч и затем медленно позволяли нагреваться до 20°C (6 ч). Смесь перемешивали при данной температуре всю ночь (15 ч) и затем гасили 10 мл метанола. Растворитель испаряли и остаток повторно растворяли в EtOAc (400 мл). EtOAc слой промывали водой (200 мл), 1 N HCl (3 × 100 мл), 2% водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (100 мл) и соевым раствором (50 мл). Органический слой высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток высушивали в высоком вакууме в течение 2 ч с получением белой пены (43 г). Указанную выше пену растворяли в 86 мл EtOAc

в двугорлой круглодонной колбе, оснащенной механической мешалкой. При перемешивании медленно добавляли 100 мл гептана и перемешивали суспензию в течение 1 ч. Верхний слой декантировали и остаток снова перемешивали с 50 мл 2:3 EtOAc/гептанового растворов в течение 10 мин и затем декантировали. Остаток высушивали в высоком вакууме с получением белой пены (31 г).

Указанную выше пену растворяли в 46 мл ДХМ и затем добавляли 95 мл ИПЭ с получением насыщенного раствора. Раствор фильтровали через небольшой слой целита и фильтрат перемешивали с затравкой  $S_p-4$  в течение 72 ч при температуре окружающей среды. Белое твердое вещество фильтровали, промывали ИПЭ (30 мл) и сушили с получением 7,33 г (~85:15 смесь  $S_p-4$ : $R_p-4$  соответственно, как определено при помощи  $^{31}P$  ЯМР) белого порошка. Указанное выше твердое вещество суспендировали в 36 мл ДХМ и затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 ч. Белое твердое вещество фильтровали, промывали 7,5 мл холодного ДХМ и сушили в высоком вакууме при 45°C с получением >99% чистого  $S_p-4$ , (4,78 г, 11,6% из уридинового нуклеозида).

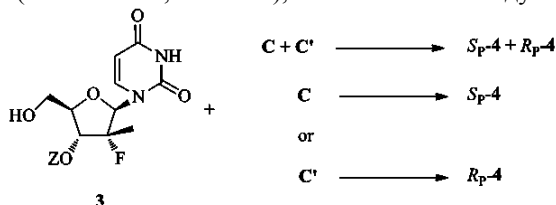
Способ 3. Загрузка силикагеля в неочищенный 4.

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

Способ 4.

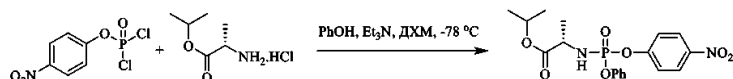
40,0 г 1:1 смеси 4 растворяли в 90 мл дихлорметана. Диизопропиловый простой эфир (70 мл) добавляли в указанный выше раствор с получением насыщенного раствора (количество диизопропилового простого эфира может варьироваться в зависимости от чистоты продукта). В раствор вводили затравку неочищенного  $S_p-4$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

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



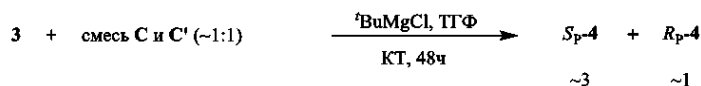
P.D. Howes et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2003, Vol. 22, Nos. 5-8, p. 687-689 ("Howes") описывает 2'- и 5'-фосфорамидаты, полученные реакцией с трет-бутилмагний хлоридом. В данной статье Howes описывает, что если 3'-дезокситидиновый нуклеозид реагирует с метиловым эфиром (S)-2-[хлорфеноксифосфиламино]пропионовой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

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



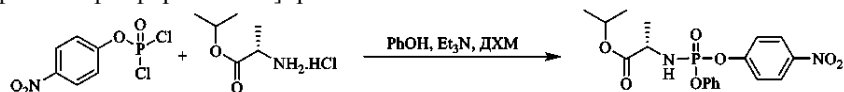
В перемешанный раствор 4-нитрофенил фосфордихлорида (12,8 г, 50 ммоль) в дихлорметане (100 мл) добавляли раствор фенола и триэтиламина (7,7 мл, 55 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при  $-78^{\circ}\text{C}$  в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира (8,38 г, 50 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при  $0^{\circ}\text{C}$ . В смесь добавляли вторую порцию триэтиламина (14,6 мл, 105 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при  $0^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (150 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого масла. Неочищенное масло хроматографировали при помощи 0-20% этилацетат/гексановым градиентом с получением продукта (17 г, 83% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1.  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ ):  $\delta$  -0,31, -0,47;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ ):  $\delta$  8,31-8,27 (m, 2H), 7,51-7,37(m, 4H), 7,27-7,19(m, 3H), 6,70-6,63(m, 1H), 4,85-4,78(m, 1H), 3,97-3,86(m, 1H), 1,21-1,19(m, 3H), 1,11-1,09 (m, 6H); масс-спектрометрия (электроспрей ионизация)  $m/z$  407 ( $\text{M}-1$ ) $^{+}$ .  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -2,05,-2,10;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,22 (d,  $J = 9,2$  Гц, 2H), 7,41-7,33(m, 4H), 7,26-7,18 (m, 3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88(m, 1H), 1,38(d,  $J = 6,8$  Гц, 3H), 1,22 (dd,  $J = 6,2$  &  $3,0$  Гц, 6H); масс-спектрометрия (электроспрей ионизация)  $m/z$  407 ( $\text{M}-1$ ) $^{+}$ .

Пример 5-2. Получение  $S_P$ -4/ $R_P$ -4



В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидроксидиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (130 мг, 0,5 ммоль) в сухом ТГФ (1,5 мл) добавляли 1,0 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,05 мл, 1,05 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 5 мин. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфорил-амино]пропионовой кислоты (1:1 смесь изомеров, 408 мг, 1 ммоль) в ТГФ (1,5 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 5 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 48 ч и затем гасили насыщенным водным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (50 мл) и водой (20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка. Колоночная хроматография остатка при помощи 0-2%  $\text{MeOH}$ /дихлорметанового градиента приводила к получению белого пенного твердого вещества (125 мг, 47% выход, смесь  $S_P$ -4/ $R_P$ -4 в соотношении приблизительно 3,05:1,0).

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



Гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира (330 г, 1,97 моль) предварительно высушивали путем совместного испарения с толуолом ( $2 \times 400$  мл) при сниженном давлении и затем высушивали в вакуумной печи ( $50^{\circ}\text{C}$ , 0,2 мм  $\text{Hg}$ , 17 ч). В перемешанный раствор 4-нитрофенил фосфордихлорида (500,0 г, 1,953 моль) в безводном дихлорметане (3,0 л) добавляли раствор фенола (183,8 г, 1,953 моль) и триэтиламина (300 мл, 2,15 моль) в дихлорметане (900 мл) при  $-60^{\circ}\text{C}$  внутренней температуры в течение периода, составляющего 3 ч. Смесь перемешивали при данной температуре в течение еще 30 мин и затем позволяли нагреваться до  $-5^{\circ}\text{C}$  в течение 2,5 ч. Предварительно высушенный эфир аминокислоты добавляли при  $-5 \sim 0^{\circ}\text{C}$  в атмосфере азота в течение 10 мин. Остаток соли аминокислоты в дополнительной колбе переносили в реакционную смесь посредством вымывания дихлорметаном ( $2 \times 100$  мл). Смесь перемешивали при  $0^{\circ}\text{C}$  в течение 40 мин и вторую порцию триэтиламина (571 мл, 4,10 моль) добавляли в течение периода, составляющего 40 мин при  $0^{\circ}\text{C}$ . Смесь перемешивали при  $0 \sim 10^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч и затем белое твердое вещество (триэтиламин гидрохлорид) отфильтровывали и промывали дихлорметаном ( $3 \times 300$  мл). Фильтрат концентрировали при сниженном давлении и остаток растирали в порошок метил трет-бутиловым простым эфиром (МТБЭ, 4 л). Дополнительную твердую соль, полученную таким образом, отфильтровывали и промывали МТБЭ ( $3 \times 150$  мл). Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением прозрачного светло-коричневого масла. Остаток совместно испаряли с гексаном ( $2 \times 140$  мл) для удаления любого остаточного МТБЭ и подвергали дополнительной сушке в вакууме при  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч. Сухой остаток смешивали с диизопропиловым простым эфиром (ИПЭ, 1,1 л) и пере-

мешивали при 5°C на водно-ледяной бане. Небольшое количество кристаллической затравки целевого S<sub>p</sub>-изомерного продукта добавляли к раствору и смесь перемешивали при 5°C в течение более 22 ч с образованием средне-густой суспензии. Ей позволяли отстаиваться в камере замораживания (-10°C) в течение 44 ч. Осажденный продукт собирали посредством фильтрования и промывали предварительно охлажденной смесью растворителей ИПЭ и гексана (1:1,3 × 190 мл). Твердое вещество высушивали в вакууме (0,5 мм Hg) при температуре окружающей среды до достижения постоянной массы с получением 227,23 г (выход: 28,5%) в виде белого порошкообразного твердого вещества. Соотношение двух диастереомеров S<sub>p</sub>:R<sub>p</sub> составляло 9,65/1, исходя из данных <sup>31</sup>P ЯМР (162 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, δ -0,31 (S<sub>p</sub>), -0,47). Продукт повторно кристаллизовали путем растворения в ИПЭ (840 мл) при нагревании в 60°C бане. Указанный выше раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем добавляли небольшое количество кристаллической затравки S<sub>p</sub>-изомера. Белое порошкообразное твердое вещество образовалось в течение 2 ч и колбу хранили в камере замораживания (-10°C) в течение 16 ч. Полученное белое и мелко-дисперсное кристаллическое вещество фильтровали, промывали предварительно охлажденным ИПЭ (3 × 50 мл) и сушили в вакууме (температура окружающей среды, 0,5 мм Hg) до постоянной массы с получением белого рыхлого твердого вещества (177,7 г, 22% общий выход или 44% общий выход, исходя из теоретического выхода S<sub>p</sub> изомера) при соотношении диастереомеров 48/1, исходя из данных Р-ЯМР. Температура плавления 62-66°C.

<sup>31</sup>P ЯМР (162 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ -0,31; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49(d, J=8,8 Гц, 2H), 7,41-7,37(m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, J=13,6, 10,0 Гц, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, J=7,2 Гц, 3H), 1,10 (d, J=6,4 Гц, 6H).

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

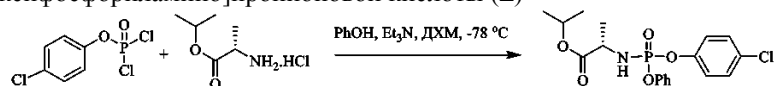
Стереохимия 8 (S<sub>p</sub>-изомера) была подтверждена рентгеновской кристаллографией монокристалла, см. подробное описание, представленное ниже.

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

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

Аналитические данные для изопропилового эфира (S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, R<sub>p</sub>-изомер): <sup>31</sup>P ЯМР (162 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ -0,47; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,46-7,38 (m, 4H), 7,27-7,20 (m, 3H), 6,68 (dd, J=13,8, 10,2 Гц, 1H), 4,86-4,77 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,20 (d, J=7,2 Гц, 3H), 1,10 (dd, J=6,2, 2,2 Гц, 6H); MS (электроспрей ионизация) m/z 407 (M-1)<sup>+</sup>.

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



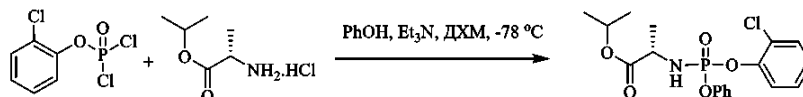
В перемешанный раствор 4-хлорфенил фосфордихлоридата (2,45 г, 10,0 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли раствор фенола (0,94 г, 10 ммоль) и третиламина (1,56 мл, 11 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорида L-аланин изопропилового сложного эфира (1,67 г, 10 ммоль) в дихлорметане (50 мл) при 0°C. В смесь добавляли вторую партию третиламина (2,92 мл, 21 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (30 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при

сниженном давлении с получением бледно-желтого масла. Неочищенное масло хроматографировали при помощи 10-20% этилацетат/гексанового градиента с получением продукта (2,0 г, 50% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1.  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -1,58, -1,62;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,06-7,51 (m, 8H), 7,15-7,28 (m, 2H), 7,29-7,47 (m, 2H), 4,0-4,10 (m, 1H), 3,82-3,88 (m, 3H), 1,35-1,36 (dd, 6H); 1,19-1,22 (m, 3H). MS (электроспрей ионизация)  $m/z$  398 ( $\text{M}-1$ ) $^+$ . Полученный в результате продукт очищали путем экстракции, кристаллизации или хроматографии, как отмечено выше.

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

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

Пример 9-1. Получение рацемического изопропилового эфира 2-[(2-хлорфенокси)феноксифосфиламино]пропионовой кислоты ( $\pm$ )

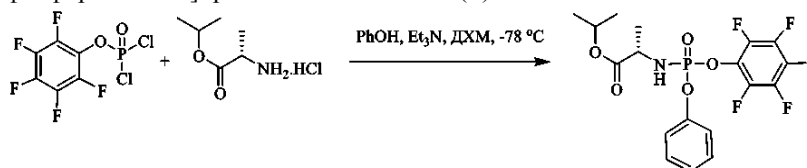


В перемешанный раствор 2-хлорфенилфосфордихлорида (9,8 г, 40 ммоль) в дихлорметане (80 мл) добавляли раствор фенола (3,76 г, 40 ммоль) и триэтиламина (6,16 мл, 44 ммоль) в дихлорметане (80 мл) при  $-78^\circ\text{C}$  в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира (6,7 г, 40 ммоль) в дихлорметане (150 мл) при  $0^\circ\text{C}$ . В смесь добавляли вторую порцию триэтиламина (11,6 мл, 84 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (100 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого масла. Неочищенное масло хроматографировали при помощи 10-20% этилацетат/гексанового градиента с получением продукта (11,3 г, 72% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1.  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -1,58, -1,61;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,06-7,51 (m, 8H), 5,02-5,94 (m, 1H), 4,10-4,16 (m, 1H), 3,31-3,94 (m, 1H), 1,18-1,35 (m, 3H), 1,38-1,40 (dd, 6H); MS (электроспрей ионизация)  $m/z$  398 ( $\text{M}-1$ ) $^+$ . Полученный в результате продукт очищали экстракцией, кристаллизацией или хроматографией, как отмечено выше.

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

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

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



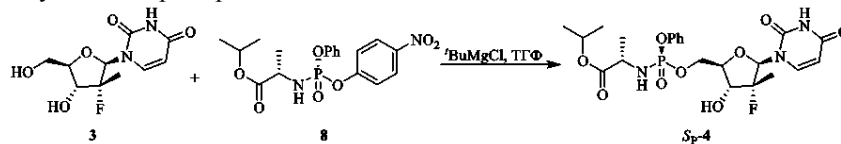
В перемешанный раствор пентафторфенил фосфордихлорида (6,0 г, 20 ммоль) в дихлорметане (40 мл) добавляли раствор фенола и триэтиламина (3,08 мл, 22 ммоль) в дихлорметане (40 мл) при  $-78^\circ\text{C}$  в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид L-аланин изопропилового

сложного эфира (3,35 г, 20 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при 0°C. В смесь добавляли вторую порцию триэтиламина (5,84 мл, 42 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (60 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого масла в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1. <sup>31</sup>P ЯМР (162 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ -0,49, -0,58. Полученный в результате продукт очищали экстракцией, кристаллизацией или хроматографией, как отмечено выше.

Пример 10-2. Получение (S)-изопропил 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорилиламино)пропаноата.

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

Получение и очистка C или C' обеспечивают непосредственный доступ к S<sub>p</sub>-4 или R<sub>p</sub>-4, что проиллюстрировано следующими примерами.



Пример 11. Получение S<sub>p</sub>-4 (32 мг-шкала).

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона 3 (32 мг, 0,12 ммоль) в сухом ТГФ (1 мл) добавляли в 1 М раствор трет-бутилмагний хлорида (0,26 мл, 0,26 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 3 мин. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофеноксифосфорилиламино)пропионовой кислоты (8, S<sub>p</sub>-изомер) в ТГФ (0,5 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 42 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH<sub>4</sub>Cl (10 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом и водой. Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток хроматографировали при помощи 0-4% метанол/дихлорметанового градиента с получением S<sub>p</sub>A в виде пенного твердого вещества (29 мг, 44,5% выход). <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P ЯМР подтверждают то, что описано в данной заявке.

Пример 12. Получение S<sub>p</sub>-4 (2,6 г-шкала, без хроматографии).

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 15 мин. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофеноксифосфорилиламино)пропионовой кислоты (8, S<sub>p</sub>-изомер, 4,08 г, 10 ммоль) в ТГФ (15 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 10 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 60 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH<sub>4</sub>Cl (20 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (150 мл) и последовательно 10% водным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 × 20 мл) и водой (20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка (3,8 г). Остаток растворяли в дихлорметане (7,6 мл) и затем перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре. Белое твердое вещество фильтровали, промывали 1:1 ИПЭ/дихлорметаном (5 мл) и сушили в вакууме с получением неочищенного продукта в виде белого твердого вещества (1,85 г, 35% выход).

Пример 13. Получение S<sub>p</sub>-4 при помощи NaN МДС.

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (71 мг, 0,27 ммоль) в сухом ТГФ (2,0 мл) добавляли 2,0 М раствор натрия бис-(триметилсилил)амида (NaN МДС) в ТГФ (270 мкл, 0,54 ммоль) при -78°C в течение периода, составляющего 2 мин. Через 30 мин в смесь добавляли раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофеноксифосфорилиламино)пропионовой кислоты (8, S<sub>p</sub>-изомер, 111 мг, 0,27 ммоль) в ТГФ (1 мл). Реакционной смеси позволяли перемешиваться при данной температуре в течение 2 ч и затем нагревали до -20°C, при такой температуре ее перемешивали в течение еще 20 ч. ТСХ

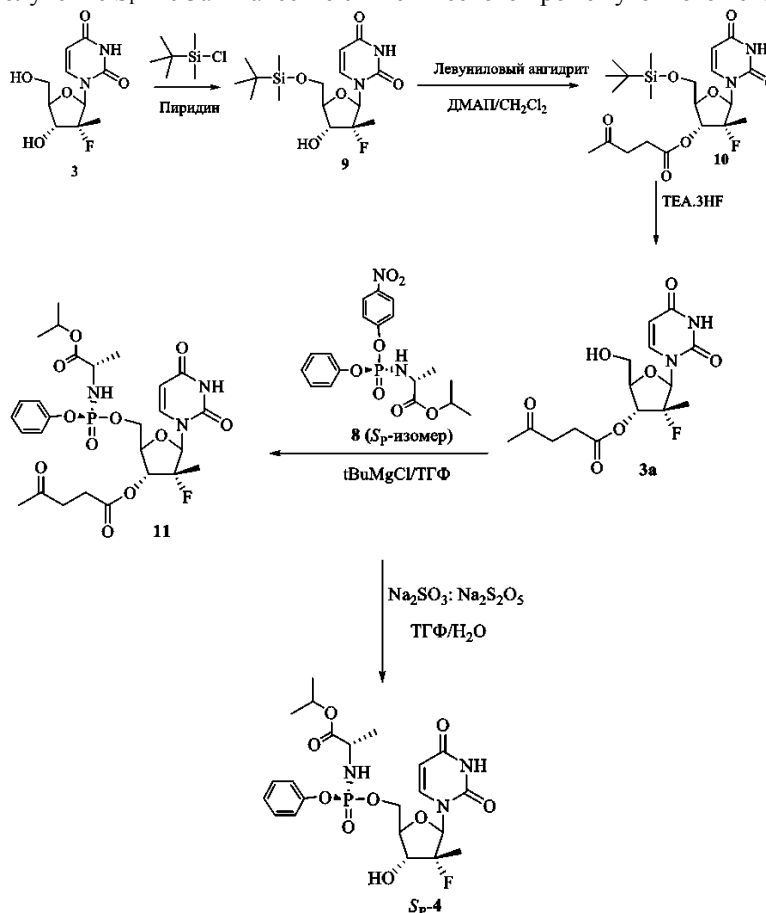
указывала на ~30% непрореагировавшего нуклеозидного исходного вещества. Затем в реакционную смесь добавляли дополнительные 0,5 экв. реагента (55 мг, 0,14 ммоль) в ТГФ (0,5 мл) и перемешивали еще 6 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением светло-коричневого остатка. Колоночная хроматография неочищенного продукта при помощи 0-5% метанол/дихлорметанового градиента привела к получению Sp-4 (22 мг, 15% выход), 3'-фосфорамидата (5, Sp-изомер, 11,5 мг, 16% выход) и бис-фосфорамидата (6, Sp, Sp-изомер, 12,6 мг).

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

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (260 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (6 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,23 мл, 2,1 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 5 мин. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)феноксифосориламино]пропионовой кислоты (8, Rp-изомер) в ТГФ (3 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 96 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH<sub>4</sub>Cl (10 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (50 мл) и водой (2 × 20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка (490 мг). Остаток хроматографировали при помощи 0-5% метанол/дихлорметанового градиента с получением продукта в виде белого твердого вещества (160 мг, 30% выход).

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

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



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

В перемешанный раствор 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина (3, 81,1 г, 312 ммоль) в сухом пиридине (750 мл) добавляли по каплям раствор трет-бутилдиметилсилил Cl (103,19 г, 685,6 ммоль) в сухом пиридине (500 мл) в течение периода, составляющего 45 мин, при температуре окружающей среды. Реакционной смеси позволяли перемешиваться при температуре окружающей среды в течение 24 ч. Метанол (85 мл) добавляли в реакционную смесь и ей позволяли перемешиваться в течение 10 мин и затем растворители отгоняли при сниженном давлении. Горячую воду (45°C) (1 л) добавляли в реакционную



массу и смесь экстрагировали этилацетатом ( $2 \times 500$  мл), промывали водой ( $1 \times 500$  мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия. Этилацетат отгоняли и полученный остаток совместно испаряли с толуолом ( $2 \times 500$  мл) с получением неочищенного 9 в виде белой пены. Выход = 116,9 г (количественный).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 300 МГц):  $\delta$  0,1 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 1,22 (d, 3H,  $J = 21$  Гц), 2,50 (s, 2H), 3,75-4,05 (m, 4H), 5,54 (d, 1H,  $J = 9$  Гц), 5,73 (s, 1H), 6,0 (d, 1H,  $J = 18$  Гц), 7,81 (d, 1H,  $J = 9$  Гц), 8,57 (br, s, 1H), 11,1 (s, 1H).

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

В перемешанный раствор нуклеозида 9 (116,9 г, 312,1 ммоль) в ДХМ (1 л) добавляли ДМАП (30,5 г, 249,7 ммоль) и позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 20 мин. Раствор левулинилового ангидрида (133,6 г, 642,3 ммоль) в ДХМ (200 мл) добавляли к смеси и позволяли перемешиваться в течение 24 ч. ТСХ смеси указывало на завершение реакции. Добавляли холодную воду (500 мл) и смесь перемешивали в течение 20 мин. Слои разделяли и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия ( $2 \times 250$  мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и затем растворитель отгоняли при сниженном давлении с получением желтого масла. Выход неочищенного продукта: 197,6 г (135%). Вещество использовали для следующей стадии без дальнейшей очистки.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 300 МГц)  $\delta$  0,11 (s, 6H), 0,94 (s, 9H), 1,34 (d, 3H,  $J = 21$  Гц), 2,22 (s, 3H), 2,6-2,89 (m, 4H), 3,72 (m, 1H), 4,01 (d, 1H,  $J = 12$  Гц), 4,23 (d, 1H,  $J = 9$  Гц), 5,33 (dd, 1H,  $J = 15$  Гц), 5,73 (d, 1H,  $J = 6$  Гц), 6,26 (d, 1H,  $J = 15$  Гц), 8,12 (d, 1H,  $J = 12$  Гц), 8,72 (br, s, 1H).

Пример 15-3. Синтез 3'-О-левулинил-2'-дезоксид-2'-фтор 2'-С-метилуридина (3а).

Неочищенный 10 (197,6 г, ~312,1 ммоль) растворяли в ДХМ (1 л), в который добавляли ТЭА.3НФ (50,3 г, 312,1 ммоль) и позволяли перемешиваться всю ночь при температуре окружающей среды. ТСХ смеси указывало на приблизительно 50% завершение реакции. Добавляли еще один эквивалент ТЭА.3НФ (50,3 г, 312,1 ммоль) и реакционной смеси позволяли перемешиваться в течение 6 ч. ТСХ в данный момент указывала приблизительно на 10% непрореагировавшего исходного материала. Добавляли еще один эквивалент 0,25 ТЭА.3НФ (12,5 г, 78,0 ммоль) и реакционной смеси позволяли перемешиваться всю ночь. Реакционную смесь концентрировали до сухого остатка с получением желтого масла. Неочищенный продукт из всех партий очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (0-2% MeOH в ДХМ) с получением 124,1 г 3'-левулината в виде белого пенного твердого вещества (90% выход очищенного продукта в течение трех стадий из 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина).  $^1\text{H}$  ЯМР: ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц)  $\delta$  1,55 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 20$  Гц), 2,36 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,8-3,03 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,91-3,96 (dd, 1H,  $\text{CH}''$ ), 4,2-4,25 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4,34 (dd, 1H,  $\text{CH}$ ,  $J = 8$  Гц), 5,25 (dd, 1H,  $J = 16$  Гц), 5,93 (d, 1H,  $J = 8$  Гц), 8,20 (d, 1H,  $J = 8$  Гц), 9,18 (s, 1H).

Пример 15-4. Стереоселективный синтез (S)-изопропилового эфира (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-(4-охопентаноил)-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]феноксифосфориламинопропионовой кислоты (11).

В раствор нуклеозида (3а, 1,00 ммоль, 358 мг) в 5 мл безводного ТГФ, который охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , добавляли  $\text{tBuMgCl}$  (1,7 М в ТГФ, 2 экв.) и позволяли нагреваться до температуры окружающей среды, перемешивали в течение 0,5 ч. В данную смесь добавляли реагент (прибл. 97% хиральной чистоты) изопропиловый эфир (S)-2-[(S)-(4-нитрофеноксифосфориламино)пропионовой кислоты (8,  $S_p$ -изомер) (408 мг, 1,00 ммоль, 1,00 экв.) одной партией и позволяли перемешиваться при комнатной температуре. Через 16 ч оставалось ~30% исходного материала. Реакционную смесь гасили насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 мл и водную фазу экстрагировали этилацетатом ( $3 \times 25$  мл). Соединенный органический слой промывали соевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия и испаряли до сухого остатка с получением бледно-желтой пены (500 мг). Ее очищали при помощи хроматографии на силикагеле с использованием 2-5% метанола в метилхлориде с получением продукта в виде белой пены (275 мг) при приблизительно 97% Р хиральной чистоты и непрореагировавшего исходного материала (162 мг). Исходя из израсходованного исходного материала выход составлял 76%.

$^{31}\text{P}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 162 МГц): 3,7 ppm;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц):  $\delta$  1,22 (dd, 6H,  $J = 6,4$  Гц), 1,37 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,63-2,9 (m, 4H), 4,0 (d, 1H,  $J = 8$  Гц), 4,2-4,33 (m, 1H), 4,57 (d, 1H,  $J = 8$  Гц), 4,96-5,00 (sept, 1H), 5,2 (dd, 1H,  $J = 9$  Гц), 5,42 (d, 1H,  $J = 8$  Гц), 6,19 (d, 1H,  $J = 18$  Гц), 7,15-7,35 (m, 5H), 7,5 (d, 1H,  $J = 5,6$  Гц), 8,2 (br, s, 1H).

Пример 15-5. Синтез (S)-изопропилового эфира ( $S_p$ -4) (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]феноксифосфорил-аминопропионовой кислоты.

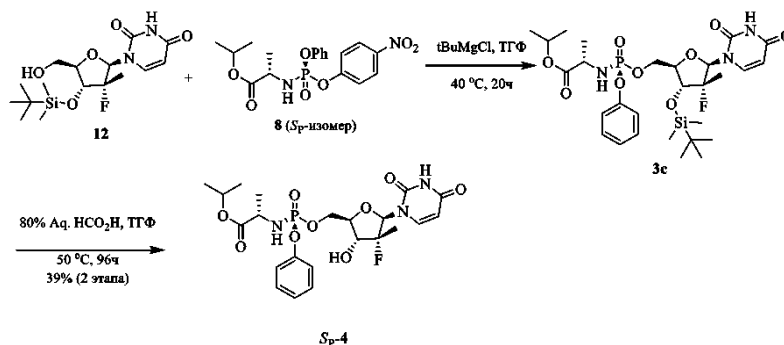
Раствор сульфита натрия получали путем добавления  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (1,51 г) и  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (0,57 г) в воде (25 мл). В раствор левулината (11, 250 мг, 0,40 ммоль) в безводном ТГФ (2,5 мл) добавляли 1,0 мл раствора сульфита натрия. Раствору позволяли перемешиваться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

непрореагировавшего нуклеозида.

Пример 16. Альтернативная процедура получения  $S_P$ -4 из 3а.

В перемешанный раствор эфира 4-оксопентановой кислоты (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пириимидин-1-ил)-4-фтор-2-гидроксиметил-4-метилтетрагидрофуран-3-ила (3а, 210 мг, 0,59 ммоль) в сухом ТГФ (1,5 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,07 мл, 1,82 ммоль) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 2 мин. Изначально наблюдали белый осадок, и через 10 мин реакционная смесь превращалась в темно-желтый раствор. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфиламино]пропионовой кислоты (8,  $S_P$ -изомер), 382 мг, 0,94 ммоль) в ТГФ (1,5 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смесь нагревали при 40°C в течение 5 ч, в это время ТСХ и  $^1\text{H}$  ЯМР указывали на наличие менее чем 2% непрореагировавшего исходного материала. Реакцию гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический слой промывали 10% водным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3×10 мл), а затем водой. Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка (410 мг). Неоочищенный продукт растворяли в тетрагидрофуране (1,0 мл) и затем добавляли водный раствор смеси сульфита натрия (37 мг, 0,295 ммоль) и натрия метабисульфита (224 мг, 1,18 ммоль) в 1 мл воды. Смесь нагревали при 45°C в течение 20 ч, на данной стадии происходило только приблизительно 10% превращения согласно ТСХ, затем добавляли дополнительный сульфит натрия (74 мг) и метабисульфит натрия (448 мг) и нагревание продолжали в течение еще 52 ч. В это время приблизительно 40% превращения наблюдали при помощи ТСХ. Реакционную смесь разделяли на фракции между водой и этилацетатом. Соединенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка (210 мг). Колоночная хроматография остатка при помощи 0-5%  $\text{Me-OH/ДХМ}$  градиента приводила к получению непрореагировавшего исходного материала (89 мг) и  $S_P$ -4 (57 мг, 18% выход, 24% исходя из восстановленного исходного материала).

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



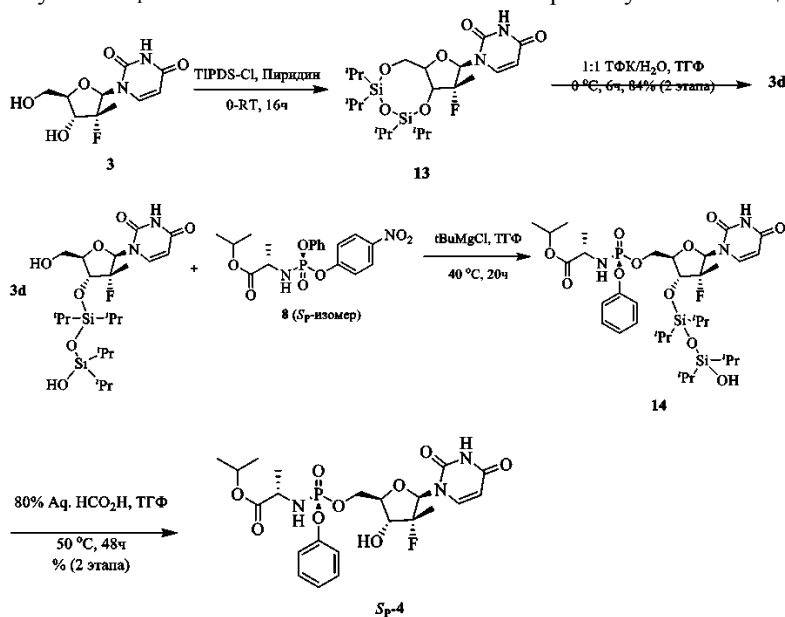
Пример 17-1. Получение 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1Н-пириимидин-2,4-диона, 12.

В раствор 3 (10,0 г, 38,43 ммоль) в пиридине (50 мл) добавляли дихлорметан (50 мл). Раствор охлаждали до 0°C. В раствор добавляли 4,4'-диметокситритилхлорид (14,32 г, 42,27 ммоль) и перемешивали при 0°C в течение 5 ч. Метанол (5 мл) добавляли для погашения реакции. Раствор концентрировали до сухого остатка при сниженном давлении и остаток разделяли на фракции между этилацетатом (500 мл) и водой (50 мл). Органический раствор промывали солевым раствором (50 мл) и сушили (сульфат натрия 4 г). Растворитель удаляли при сниженном давлении и остаток растворяли в дихлорметане (100 мл). В раствор добавляли имидазол (7,83 г, 115 ммоль) и трет-бутилдиметилсиланилхлорид (8,68 г, 57,6 ммоль). Раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. Метанол добавляли для того, чтобы погасить реакцию (5 мл), растворитель удаляли при сниженном давлении и остаток разделяли на фракции между этилацетатом (500 мл) и водой (50 мл). Органический раствор высушивали (сульфат натрия, 4 г) и испаряли при сниженном давлении. Остаток очищали при помощи колоночной хроматографии (10-40%  $\text{EtOAc}$  в гексане) с получением 5'-О-ДМТ-3'-О-т-БДМС продукта промежуточного вещества. Его, в свою очередь, обрабатывали 1% трифторуксусной кислотой в дихлорметане (200 мл). Раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Добавляли воду (20 мл) и раствор перемешивали в условиях окружающей среды еще 1 ч. Медленно добавляли метанол (5 мл) и раствор перемешивали в условиях окружающей среды еще 1 ч. Добавляли гидроксид аммония для регулирования pH раствор до 7. Органический раствор отделяли, высушивали (сульфат натрия, 4 г) и испаряли до сухого остатка при сниженном давлении. Остаток очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (1-5% метанол в дихлорметане) с получением 12 в виде белого твердого вещества 7,5 г с 50% выходом в течение трех стадий.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 11,48 (br s, 1H, NH), 7,94 (d, 1H, H-6), 6,00 (d, 1H, H-1'), 5,69 (d, 1H, H-5), 4,06 (dd, 1H, 3'-H), 3,85 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3,58 (br d, 1H, H-5'b), 1,27 (d, 3 H, 2- $\text{CH}_3$ ), 0,89 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0,12 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ).

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

В перемешанный раствор 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (12, 374 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,8 мл, 3,1 ммоль) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 2 мин. Изначально наблюдали белый осадок и через 10 мин реакционную смесь превращали в темно-желтый раствор. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосориламино]пропионовой кислоты (8,  $S_P$ -изомер, 653 мг, 1,6 ммоль) в ТГФ (2,5 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смесь нагревали при 40°C в течение 20 ч, в это время ТСХ и  $^1H$  ЯМР указывали на менее чем 5% непрореагировавшего исходного материала. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Органический слой промывали 10% водным раствором  $Na_2CO_3$  (3  $\times$  10 мл), а затем водой (20 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка, содержащего 3с (850 мг). Неочищенный продукт растворяли в тетрагидрофуране (2 мл) и добавляли 0,8 мл 80% водной муравьиной кислоты при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 50°C в течение 96 ч. Приблизительно 70% превращение наблюдали при помощи ТСХ. Реакционную смесь выливали в холодный насыщенный водный раствор бикарбоната натрия и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка (220 мг). Колоночная хроматография остатка при помощи 0-5% MeOH/ДХМ градиента привела к получению непрореагировавшего исходного материала (21 мг) и  $S_P$ -4 (77 мг, 35% выход, 39% выход, исходя из восстановленного исходного материала).

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



Пример 18-1. Получение 3d.

В перемешанный раствор 3 в пиридине (20 мл) при 0°C добавляли TIPDS-Cl по каплям в течение периода, составляющего 15 мин. Смеси медленно позволяли нагреваться до комнатной температуры, при такой температуре ее перемешивали в течение 16 ч. Пиридин испаряли и остаток совместно испаряли с толуолом (50 мл). Остаток затем растирали в порошок с гексаном и белый осадок отфильтровывали, используя целитную подложку. Филтрат концентрировали при сниженном давлении с получением пенного твердого вещества (12,97 г). Неочищенный продукт (13) повторно растворяли в тетрагидрофуране (75 мл) и добавляли водный раствор ТФК (75 мл, 1:1 ТФК/вода) при 0°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 6 ч. ТСХ указывала на ~5% исходного вещества. Реакционную смесь гасили насыщенным водным  $NaHCO_3$  до достижения значения pH 8 и затем экстрагировали этилацетатом. Соединенный органический экстракт промывали водой, высушивали и концентрировали с получением белого кристаллического твердого вещества. Дополнительное растирание в порошок твердого вещества с гексаном (30 мл) приводило к получению твердого белого вещества, которое фильтровали и сушили в высоком вакууме с получением 3d (10,1 г, 84% выход в течение 2 стадий).  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8,83 (bs, 1H), 7,94 (bd,  $J=6,0$  Гц, 1H), 6,10 (bd,  $J=18,4$  Гц, 1H), 5,71 (d,  $J=8,2$  Гц, 1H), 4,43 (bs, 1H), 4,36 (dd,  $J=22,6$ , 9,0 Гц, 1H), 4,27 (bs, 1H), 4,10 (d,  $J=13,2$  Гц, 1H), 4,03 (d,  $J=9,2$  Гц, 1H), 3,92 (d,  $J=13,2$  Гц, 1H), 1,39 (d,  $J=22,0$  Гц, 3H), 1,11-0,92 (m, 28H).

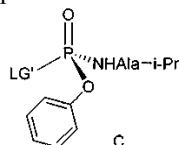
Пример 18-2. Получение S<sub>p</sub>-4.

В перемешанный раствор 3d (520 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (5 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,8 мл, 3,1 ммоль, 3,1 экв.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 15 мин. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфиламино]пропионовой кислоты (8, S<sub>p</sub>-изомер, 653 мг, 1,6 ммоль) в ТГФ (1 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 60 ч. <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P ЯМР неочищенной пробы указывали на смесь диастереомеров в соотношении приблизительно 1:0,76. Реакционную смесь гасили насыщенным водным NH<sub>4</sub>Cl (20 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (150 мл) и последовательно 10% водным Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 × 20 мл) и водой (20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка (14, 878 мг).

Указанное выше соединение 14 повторно растворяли в тетрагидрофуран (3 мл) и затем добавляли 80% водную муравьиную кислоту. Смесь нагревали при 55°C в течение 20 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и затем гасили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (pH 7,0). Реакционную смесь затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением 560 мг остатка. Остаток хроматографировали при помощи 0-5% метанол/дихлорметанового градиента с получением непрореагировавшего исходного материала (14, 242 мг) и S<sub>p</sub>-4 (80 мг, 15% выход) в виде белого твердого вещества.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

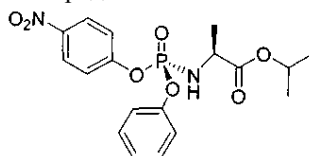
## 1. Соединение, представленное структурой С



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

2. Соединение по п.1, где LG' представляет собой п-нитрофеноксид, 2,4-динитрофеноксид или пентафторфеноксид.

3. Соединение по п.2, где соединение представляет собой



4. Соединение по п.2, где соединение представляет собой

