

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034890

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.02

(21) Номер заявки
201692312

(22) Дата подачи заявки
2015.06.25

(51) Int. Cl. C07H 19/10 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПРОДУКТЫ ГЕМЦИТАБИНА

(31) 1411253.6; 2050/MUM/2014

(32) 2014.06.25

(33) GB; IN

(43) 2017.04.28

(86) PCT/GB2015/051857

(87) WO 2015/198058 2015.12.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НУКАНА ПИЭЛСИ (GB)

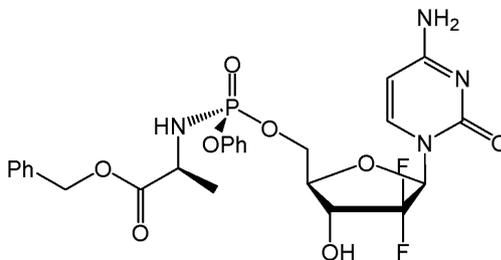
(72) Изобретатель:
Гриффит Хью, Макгиган Кристофер,
Слюсарчик Магдалена, Серпи
Микаэла, Феррари Валентина (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2014076490
WO-A2-2005012327

MAGDALENA SLUSARCZYK ET AL.:
"Application of ProTide Technology to Gemcitabine:
A Successful Approach to Overcome the Key
Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New
Agent (NUC-1031) in Clinical Development",
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol.
57, no. 4, 27 February 2014 (2014-02-27), pages
1531-1542, XP055205033, ISSN: 0022-2623, DOI:
10.1021/jm401853a Compound 6f and related data
WO-A2-2015081133

(57) Изобретение относится к фармацевтическому составу для лечения злокачественной опухоли, содержащему гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]-(S)-фосфат 3 или его фармацевтически приемлемую соль, обладающие диастереоизомерной чистотой 90% или выше, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель; где состав представляет собой водный состав, который содержит также полярный органический растворитель; где состав предназначен для внутривенного введения.



B1

034890

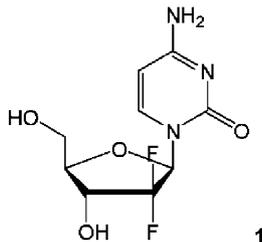
034890

B1

Изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему пролекарство монофосфата нуклеотида хорошо известного онкологического лекарственного средства гемцитабина. Конкретно изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему гемцитабин-[фенил-бензоксип-L-аланинил]-фосфат (химическое наименование: 2'-дезоксип-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил(бензоксип-L-аланинил)]фосфат), присутствующему в форме одного (S)-диастереоизомера фосфата, который обеспечивает заметное и неожиданное увеличение растворимости по сравнению с (R)-диастереоизомером. (S)-диастереоизомер фосфата также более предпочтительно поглощается растворами циклодекстрина, чем (R)-диастереоизомер.

Уровень техники

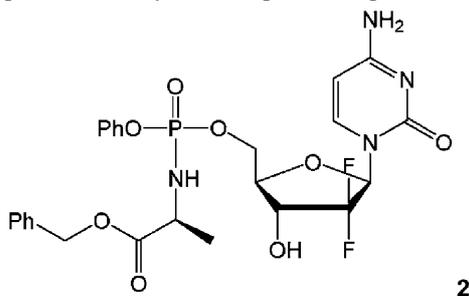
Гемцитабин (1; обозначенный как гемзар®) представляет собой эффективный аналог нуклеозида, который в настоящее время одобрен для лечения рака груди, немелкоклеточного рака легких, рака яичников и рака поджелудочной железы и широко используется для лечения множества других злокачественных опухолей, включая рак мочевого пузыря, желчных протоков, колоректальный рак и лимфому.



Клиническое применение гемцитабина является ограниченным из-за ряда механизмов врожденной и приобретенной устойчивости. На клеточном уровне устойчивость зависит от трех параметров: (i) понижающей регуляции дезоксицитидинкиназы, необходимой для активации до фосфорилированной группы; (ii) уменьшенной экспрессии транспортеров нуклеозидов, в частности hENT1, необходимого для поглощения клетками злокачественных опухолей; и (iii) повышающей регуляции каталитических ферментов, особенно цитидиндезаминазы, осуществляющих деградацию гемцитабина.

В WO2005/012327 описана серия нуклеотидных пролекарств для гемцитабина и родственных нуклеозидных молекул лекарственного средства. Среди них гемцитабин-[фенил-бензоксип-L-аланинил]-фосфат (NUC-1031; 2) идентифицирован как особенно эффективное соединение. Эти пролекарства, по-видимому, позволяют избежать многих из механизмов врожденной и приобретенной устойчивости, ограничивающих применение гемцитабина ('Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development'; Slusarczyk et al; J. Med. Chem.; 2014, 57, 1531-1542).

NUC-1031 2 получают в форме смеси двух диастереоизомеров, эпимерных по фосфатному центру.



К сожалению, NUC-1031 2 является весьма липофильным и, таким образом, плохо растворимым в воде (по расчетам <0,1 мг/мл), и поддающиеся ионизации группы, азот пиримидина и фенольный гидроксил, обладают рассчитанными pKa, лежащими вне диапазона pH, пригодного для парентерального введения. Он является, по существу, нерастворимым в воде, вне зависимости от содержания соли или pH, и это вызывает осложнения для разработки составов для доставки пролекарства в достаточно высоких дозах для эффективного лечения. Это также вызывает осложнения при разработке эффективных способов получения, которые могут обеспечивать экономически эффективное получение NUC-1031.

Целью конкретных вариантов осуществления этого изобретения является получение гемцитабин-[фенил-бензоксип-L-аланинил]-фосфата (NUC-1031; 2) в форме, которую можно вводить в состав эффективной фармацевтической композиции.

Целью конкретных вариантов осуществления этого изобретения является также получение формы гемцитабин-[фенил-бензоксип-L-аланинил]-фосфата (NUC-1031; 2), которую можно получать и хранить в течение длительного периода времени.

Целью конкретных вариантов осуществления этого изобретения является получение гемцитабин-[фенил-бензоксип-L-аланинил]-фосфата (NUC-1031; 2) в форме, которая обладает более высокой растворимостью, чем формы из предшествующего уровня техники.

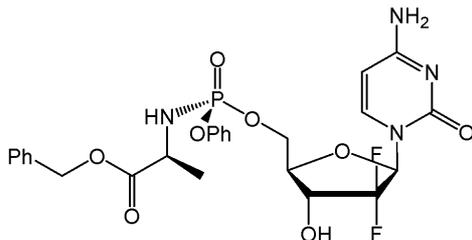
Целью конкретных вариантов осуществления этого изобретения является получение гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]-фосфата (NUC-1031; 2) в форме отдельного диастереоизомера по отношению к атому фосфора.

Конкретные варианты осуществления этого изобретения удовлетворяют некоторым или всем из вышеуказанных целей.

Гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]-фосфат по настоящему изобретению предпочтительно обладает, по существу, такой же активностью, как гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]-фосфат (NUC-1031; 2). Он может, однако, обладать немного меньшей активностью, но предоставлять другие преимущества, как описано в этом описании, если существует преимущество для получения или терапевтическое преимущество для применения этой формы.

Краткое изложение описания

В соответствии с настоящим изобретением представлен фармацевтический состав для лечения злокачественной опухоли, содержащий гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]-(*S*)-фосфат 3:



или его фармацевтически приемлемую соль, обладающие диастереоизомерной чистотой 90% или выше, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель; где состав представляет собой водный состав, который содержит также полярный органический растворитель; где состав предназначен для внутривенного введения.

Авторы изобретения обнаружили неожиданные и заметные различия в растворимости двух диастереоизомеров. (*S*)-эпимер 3 обладает достаточной растворимостью в смесях ряда полярных органических растворителей с водой, чтобы обеспечить его пригодность для составления и введения в качестве лекарственного средства. (*R*)-эпимер 4 является, по существу, нерастворимым в большинстве изученных смесей растворителей. Эти заметные различия в растворимости ранее не были идентифицированы, и потенциальные преимущества этого свойства (*S*)-эпимера не были известны. В ряде тестированных смесей растворителей различие в растворимости между (*S*)-эпимером и (*R*)-эпимером составляет более 100 раз.

Неожиданно (*S*)-эпимер также предпочтительно поглощается раствором циклодекстрина по сравнению с (*R*)-эпимером. Этого не наблюдали с другими производными фосфата гемцитабина.

Состав может также содержать циклодекстрин.

Злокачественная опухоль может представлять собой злокачественную опухоль, выбранную из рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака легкого, рака предстательной железы, холангиокарциномы, злокачественной опухоли почки, рака шейки матки, злокачественной опухоли тимуса, злокачественной опухоли неизвестного первичного происхождения. Злокачественная опухоль может также представлять собой лимфому или лейкоз.

Показано, что *R*-эпимер обладает временем полураспада при инкубации с выделенными гепатоцитами человека, в четыре раза превышающим время полураспада *S*-эпимера (см. пример 4). Более длительное время полураспада, ассоциированное с *R*-изомером, указывает на более низкое свойственное ему выведение и должно приводить к фармакокинетическому и фармакодинамическому профилю, отличному от *S*-изомера. Этот профиль может означать более высокую и более длительно сохраняющуюся концентрацию *R*-изомера в системном кровотоке и, таким образом, более сильное воздействие *R*-эпимера, чем можно достигать с использованием *S*-эпимера. АУС для *R*-изомера, таким образом, может быть выше, приводя к более сильному и более длительному воздействию этого вещества, например для перорального способа введения, где эффекты первого прохождения более выражены. Это более длительное воздействие *R*-эпимера может обеспечивать значительно более длительное воздействие *R*-эпимера на опухоль и может приводить к большей эффективности, где уменьшенный пресистемный метаболизм в печени может приводить к более высокой концентрации лекарственного средства. Это отличающееся свойство может также обеспечивать нацеливание на специфические опухоли, где более длительный профиль РК может приводить к большей эффективности в труднодоступных участках опухолей, где сосудистая система является слабой. Более длительное воздействие *R*-эпимера может обеспечивать адекватную концентрацию лекарственного средства для активного метаболита на протяжении большего количества фаз клеточного цикла, включая деление клеток.

Краткое описание чертежей

Варианты осуществления изобретения далее описаны в настоящем документе ниже по отношению к прилагаемым чертежам.

На фиг. 1 показана хроматограмма разделения соединений 3 и 4 посредством ВЭЖХ с использова-

нием колонки Chiralpak AD и градиентной системы растворителей н-гептан/IPA.

На фиг. 2 показана структура соединения 4, как определено посредством рентгенодифракции.

На фиг. 3 показана структура соединения 3, как определено посредством рентгенодифракции.

На фиг. 4 показан спектр ^{31}P -ЯМР (202 МГц, D_2O) изомерной смеси NUC-1031 (3,12 мМ) после добавления HP- β -CD в молярном соотношении 1:2,3.

На фиг. 5 показаны кривые для ВЭЖХ NUC-1031 (3,12 мМ) в MeOH (A) в H_2O после добавления HP- β -CD в молярном соотношении 1:2,3 (B).

Подробное описание

Во всем описании термин S-эпимер или S-диастереоизомер относится к гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]-(S)-фосфату. Подобным образом во всем описании термин R-эпимер или R-диастереоизомер относится к гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]-(R)-фосфату.

Соединения по настоящему изобретению можно использовать для лечения организма человека. Их можно использовать для лечения организма животного. В частности, соединения по настоящему изобретению можно использовать для лечения представляющих коммерческую ценность животных, таких как скот. Альтернативно соединения по настоящему изобретению можно использовать для лечения животных-компаньонов, таких как кошки, собаки и т.д.

Соединения по изобретению можно получать, хранить и/или вводить в форме фармацевтически приемлемой соли. Пригодные фармацевтически приемлемые соли включают, но без ограничения, соли фармацевтически приемлемых неорганических кислот, таких как соляная, серная, фосфорная, азотная кислоты, угольная, борная, сульфаминовая и бромистоводородная кислоты, или соли фармацевтически приемлемых органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, масляная, виннокаменная, малеиновая, гидроксималеиновая, фумаровая, яблочная, лимонная, молочная, муциновая, глюконовая, бензойная, янтарная, щавелевая, фенилуксусная, метансульфоновая, толуолсульфоновая, бензолсульфоновая, салициловая, сульфаниловая, аспарагиновая, глутаминовая, эдетовая, стеариновая, пальмитиновая, олеиновая, лауриновая, пантотеновая, дубильная, аскорбиновая и валериановая кислоты. Пригодные основные соли сформированы из оснований, которые формируют нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглумина, оламина, калия, натрия, трометамин и цинка. Можно формировать также полусоли кислот и оснований, например соли гемисульфата, гемиоксалата и гемикальция. В конкретных вариантах осуществления, в частности в тех, где применяют s-эпимер, соединение находится в форме соли HCl или соли гемиоксалата.

Соединения по изобретению могут существовать в отдельной кристаллической форме, или в смеси кристаллических форм, или они могут являться аморфными. Таким образом, соединения по изобретению, предназначенные для фармацевтического применения, можно вводить в форме кристаллических или аморфных продуктов. Их можно получать, например, в форме твердых прессованных масс, порошков или пленок посредством способов, таких как преципитация, кристаллизация, лиофилизация, или сушка распылением, или сушка выпариванием. Для этой цели можно использовать индукционную сушку или радиочастотную сушку.

Для вышеупомянутых соединений по изобретению введенная доза, естественно, меняется в зависимости от применяемого соединения, способа введения, желательного лечения и проявленного нарушения. Например, если соединение по изобретению вводят парентерально, доза соединения по изобретению может находиться в диапазоне от 0,1 до 5 г/м², например от 0,5 до 2 г/м². Размер дозы соединений по изобретению для терапевтических целей можно естественным образом менять в зависимости от характера и тяжести состояний, возраста и пола животного или пациента и способа введения в соответствии с хорошо известными принципами медицины.

Ожидают, что уровни дозирования, частота дозирования и продолжительность лечения соединениями по изобретению могут отличаться в зависимости от состава и клинических показаний, возраста и сопутствующих медицинских состояний пациента.

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль можно использовать отдельно, но, как правило, их вводят в форме фармацевтической композиции, в которой соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемая соль присутствуют в сочетании с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем. Общепринятые способы выбора и получения пригодных фармацевтических составов описаны, например, в "Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs", M.E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988.

В зависимости от способа введения соединений по изобретению, фармацевтическая композиция, которую используют для введения соединений по изобретению, может предпочтительно содержать от 0,05 до 99 мас.%. (процентов по массе) соединения по изобретению, более предпочтительно от 0,05 до 80 мас.% соединения по изобретению, еще более предпочтительно от 0,10 до 70 мас.% соединения по изобретению и даже более предпочтительно от 0,10 до 50 мас.% соединения по изобретению, все проценты по массе на основании общей композиции.

Для внутривенного введения соединения по изобретению можно вводить в форме стерильного вод-

ного или масляного раствора. Соединения по изобретению являются очень липофильными. Водные составы, как правило, таким образом, могут также содержать фармацевтически приемлемый полярный органический растворитель.

Показано, что циклодекстрины находят широкое применение для доставки лекарственных средств (Rasheed et al, Sci. Pharm., 2008, 16, 567-598). Циклодекстрины представляют собой семейство циклических олигосахаридов. Они действуют как "молекулярная клетка", которая инкапсулирует молекулы лекарственного средства и изменяет свойства таких молекул лекарственного средства, такие как растворимость. Циклодекстрины содержат (α -1,4)-связанные звенья α -D-глюкопиранозы. Циклодекстрины могут содержать 6, 7 или 8 звеньев глюкопиранозы (обозначены как α -, β - и γ -циклодекстрины соответственно). Циклодекстрины, применяемые в фармацевтических составах, часто представляют собой β -циклодекстрины. Боковые гидроксильные группы можно алкилировать с использованием C_1 - C_6 замещенной или незамещенной алкильной группы. Примерами циклодекстринов являются α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, γ -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин (HP- β -CD), сульфобутиловый эфир натриевой соли β -циклодекстрина, частично метилированный β -циклодекстрин.

Размер дозы соединений по изобретению для терапевтических целей может естественным образом меняться в зависимости от характера и тяжести состояний, возраста и пола животного или пациента и способа введения в соответствии с хорошо известными принципами медицины.

Ожидают, что уровни дозирования, частота дозирования, и продолжительность лечения соединениями по изобретению могут отличаться в зависимости от состава и клинических показаний, возраста и сопутствующих медицинских состояний пациента.

Настоящее изобретение включает также все фармацевтически приемлемые меченные изотопами формы соединений 3 или 4, где один или несколько атомов заменены атомами, обладающими таким же атомным номером, но атомной массой или массовым числом, отличающимися от атомной массы или массового числа преобладающего изотопа, обычно обнаруживаемого в природе.

Примеры изотопов, пригодных для включения в соединения по изобретению, включают изотопы водорода, такие как 2H и 3H , углерода, такие как ^{11}C , ^{13}C и ^{14}C , хлора, такие как ^{36}Cl , фтора, такие как ^{18}F , иода, такие как ^{123}I и ^{125}I , азота, такие как ^{13}N и ^{15}N , кислорода, такие как ^{15}O , ^{17}O и ^{18}O , фосфора, такие как ^{32}P , и серы, такие как ^{35}S .

Конкретные меченные изотопами соединения, например включающие радиоактивный изотоп, можно использовать в исследованиях распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Радиоактивные изотопы тритий, т.е. 3H , и углерод-14, т.е. ^{14}C , являются особенно пригодными для этой цели, принимая во внимание простоту их включения и доступные способы детекции.

Замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, т.е. 2H , может обеспечивать конкретные терапевтические преимущества, возникающие в результате большей метаболической стабильности, например увеличение времени полураспада *in vivo* или меньшие необходимые дозы, и, таким образом, может являться предпочтительной в некоторых условиях.

Замену на позитронно-активные изотопы, такие как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , можно использовать в исследованиях позитронно-эмиссионной томографии (PET) для изучения степени занятости рецептора субстратом.

Меченые изотопами соединения можно в основном получать общепринятыми способами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными описанным, с применением подходящего меченого изотопом реагента вместо применявшегося ранее немеченого реагента.

На протяжении описания и формулы изобретения из этого описания, слова "включать" и "содержать" и их варианты означают "включая, но без ограничения", и они не предназначены для исключения (и не исключают) других групп, добавок, компонентов, целых чисел или стадий. На протяжении описания и формулы изобретения из этого описания, формы единственного числа включают множественное число, если контекст не требует иного. В частности, когда используют неопределенный артикль, описание следует понимать как включающее множественное число, так же как единственное число, если контекст не требует иного.

Признаки, целые числа, характеристики, соединения, химические вещества или группы, описанные в отношении конкретного аспекта, варианта осуществления или примера по изобретению, следует понимать, как применимые для любого другого аспекта, варианта осуществления или примера, описанного в настоящем документе, если они не являются несовместимыми с ними. Все признаки, описанные в этом описании (включая все прилагаемые пункты формулы изобретения, реферат и чертежи), и/или все стадии любого способа или процесса, описанного таким образом, можно комбинировать в любой комбинации, за исключением комбинаций, где, по меньшей мере, некоторые из таких признаков и/или стадий являются взаимоисключающими. Изобретение не является ограниченным деталями любого из предшествующих вариантов осуществления. Изобретение распространяется на любой новый признак или любую новую комбинацию признаков, описанных в этом описании (включая все прилагаемые пункты формулы изобретения, реферат и чертежи), или на любой новую стадию, или любую новую комбинацию стадий любого способа или процесса, описанного таким образом.

Следует обратить внимание на все статьи и документы, которые поданы одновременно с этим описанием или ранее этого описания в связи с этим описанием и которые опубликованы для публичного ознакомления вместе с этим описанием, и содержание всех таких статей и документов приведено в настоящем документе в качестве ссылок.

В описании используют следующие сокращения:

DMF - <i>N,N</i> -диметилформамид	DMSO - диметилсульфоксид
IPA - изопропиловый спирт	NMP - <i>N</i> -метилпирролидинон
PEG - полиэтиленгликоль	TBDMS - <i>трет</i> -бутилдиметилсилил
TFA - трифторуксусная кислота	

Пример 1.

(R) и (S) изомеры разделяли посредством ВЭЖХ в следующих условиях.

Оборудование: Agilent серии 1200™ с детектором DAD.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Колонка: Chiralpak AD™; 250×4,6 мм ID (нормальная фаза).

Температура: комнатная.

Размер частиц: 20 мкм.

Сырье: растворенное в MeOH; 10 г/л.

Растворитель: н-гептан/IPA 10 → 50% IPA.

Хроматограмма показана на фиг. 1. (S)-эпимер элюировали через 8,6 мин и (R)-эпимер элюировали через 10,3 мин.

Методы и материалы для характеристики: спектры ЯМР для протонов (¹H), углерода (¹³C), фосфора (³¹P) и фтора (¹⁹F) регистрировали на спектрометре Bruker Avance 500 при 25°C. Спектры подвергали автокалибровке по пику дейтерированного растворителя, и во всех ¹³C ЯМР и ³¹P ЯМР применяли подавление спин-спинового взаимодействия с протонами. Чистоту конечного соединения верифицировали как >95% посредством анализа ВЭЖХ с использованием Varian Polaris C18-A (10 мкм) в качестве аналитической колонки с градиентной элюцией H₂O/MeOH от 100/0 до 0/100 за 35 мин. Анализ ВЭЖХ проводили посредством Varian Prostar (LC Workstation-Varian с детектором prostar 335 LC).

2'-Дезокси-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил(бензилокси-L-аланинил)]-(S)- фосфат 3
(ES+) m/z, обнаружено: (M+Na⁺) 603,14. C₂₅H₂₇F₂N₄O₈NaP задано: (M⁺) 580,47.

³¹P ЯМР (202 МГц, MeOD) : δ_p 3, 66

¹H ЯМР (500 МГц, MeOD) : δ_H 7,58 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-6), 7,38-7,32 (м, 7H, ArH), 7,26-7,20 (м, 3H, ArH), 6,24 (т, J=7,5 Гц, 1H, H-1'), 5,84 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-5), 5,20 (система АВ, J_{AB}=12,0 Гц, 2H, OCH₂Ph), 4,46-4,43 (м, 1H, H-5'), 4,36-4,31 (м, 1H, H-5'), 4,25-4,19 (м, 1H, H-3'), 4,07-4,00 (м, 2H, H-4', CHCH₃), 1,38 (д, J=7,2 Гц, 3H, CHCH₃).

¹⁹F ЯМР (470 МГц, MeOD): δ_F - 118,0 (д, J=241 Гц, F), -120,24 (широкий д, J=241 Гц, F).

¹³C ЯМР (125 МГц, MeOD): δ_C 174,61 (д, ³J_{C-P}=5,0 Гц, C=O, сложный эфир), 167,63 (C-NH₂), 157,74 (основание C=O), 152,10 (д, ²J_{C-P}=7,0 Гц, C-Ar), 142,40 (CH-основание), 137,22 (C-Ar), 130,90, 129,63, 129,39, 129,32, 126,32 (CH-Ar), 124,51 (д, ¹J_{C-F}=257 Гц, CF₂), 121,47, 121,43 (CH-Ar), 96,67 (CH-основание), 85,92 (широкий сигнал, C-1'), 80,31 (C-4'), 71,27 (кажущийся т, ²J_{C-F}=23,7 Гц, C-3'), 68,03 (OCH₂Ph), 65,73 (д, ²J_{C-P}=5,30 Гц, C-5'), 51,66 (CHCH₃), 20,42 (д, ³J_{C-P}=6,25 Гц, CHCH₃).

Обращенно-фазовая ВЭЖХ с элюцией H₂O/MeOH от 100/0 до 0/100 за 35 мин показала один пик диастереоизомера с t_R=22,53 мин.

2'-дезокси-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил(бензилокси-L-аланинил)]-(R)-фосфат 4
(ES+) m/z, обнаружено: (M+Na⁺) 603,14. C₂₅H₂₇F₂N₄O₈NaP задано: (M⁺) 580,47.

³¹P ЯМР (202 МГц, MeOD) : δ_p 3,83

¹H ЯМР (500 МГц, MeOD): δ_H 7,56 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-6), 7,38-7,31 (м, 7H, ArH), 7,23-7,19 (м, 3H, ArH), 6,26 (т, J=7,5 Гц, 1H, H-1'), 5,88 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-5), 5,20 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,49-4,46 (м, 1H, H-5'), 4,38-4,34 (м, 1H, H-5'), 4,23-4,17 (м, 1H, H-3'), 4,07-4,01 (м, 2H, H-4', CHCH₃), 1,38 (д, J=7,2 Гц, 3H, CHCH₃).

¹⁹F ЯМР (470 МГц, MeOD): δ_F - 118,3 (д, J=241 Гц, F), - 120,38 (широкий д, J=241 Гц, F).

¹³C ЯМР (125 МГц, MeOD): δ_C 174,65 (д, ³J_{C-P}=5, 0 Гц, C=O, сложный эфир), 167,65 (C-NH₂), 157,75 (основание C=O), 152,10 (д, ²J_{C-P}=7,0 Гц, C-Ar), 142,28 (CH-основание), 137,50 (C-Ar), 130,86, 129,63, 129,40, 129,32, 126,31 (CH-Ar), 124,50 (д, ¹J_{C-F}=257 Гц, CF₂), 121,44, 121,40 (CH-Ar), 96,67 (CH-основание), 85,90 (широкий сигнал, C-1'), 80,27 (C-4'), 71,30 (кажущийся т, ²J_{C-F}=23,7 Гц, C-3'), 68,02 (OCH₂Ph), 65,50 (C-5'), 51,83 (CHCH₃), 20,22 (д, ³J_{C-P}=7,5 Гц, CHCH₃).

Обращенно-фазовая ВЭЖХ с элюцией H₂O/MeOH от 100/0 до 0/100 за 35 мин показала один пик диастереоизомера с t_R=21,87 мин

Для двух изомеров получены также данные рентгенодифракции, и полученные изображения показаны на фиг. 2 и 3. Соответствующие данные и способы дифракции представлены в табл. 1-4 ниже.

Таблица 1. Данные кристаллизации и уточнение структуры для (R)-эпимера 4

Идентификационный код	shelx	
Эмпирическая формула	$C_{25}H_{27}F_2N_4O_8F$	
Молекулярная масса по формуле	580,47	
Температура	296(2) К (23(2) °С)	
Длина волны	1,54184 Å	
Кристаллическая система	моноклинная	
Пространственная группа	C 2	
Размеры элементарной ячейки	a=19,2280(3) Å	$\alpha=90^\circ$
	b=10,22330(10) Å	$\beta=97,966(2)^\circ$.
	c=13,6911(2) Å	$\gamma=90^\circ$.
Объем	2665,34(6) Å ³	
Z	4	
Плотность (расчетная)	1,447 мг/м ³	
Коэффициент поглощения	1,541 мм ⁻¹	
F(000)	1208	
Размер кристалла	0,584×0,095×0,051 мм ³	
Диапазон θ для сбора данных	3,259–73,477°.	
Диапазон коэффициентов	-23<=h<=23, -12<=k<=12, -17<=l<=13	
Собранные отражения	9684	
Независимые отражения	5150 [R(int)=0,0239]	
Завершенность до $\theta=67,684^\circ$	99,9%	
Коррекция поглощения	Полуэмпирическая на основании эквивалентов	
Макс. и мин. трансмиссия	1,00000 и 0,61719	
Способ уточнения	Способ наименьших квадратов в полноматричном приближении по F ²	
Данные/ограничители/параметры	5150/549/437	
Точность приближения по F ²	1,065	
Конечные коэффициенты R [I>2 сигма (I)]	R1=0,0646, wR2=0,1759	
Коэффициенты R (все данные)	R1=0,0681, wR2=0,1793	
Абсолютный структурный параметр	0,039(10)	
Коэффициент экстинкции	n/a	
Наибольший дифф. пик и провал	0,477 и -0,917 е.Å ⁻³	

Таблица 2. Атомные координаты ($\times 10^4$) и параметры эквивалентного изотропного замещения ($\text{Å}^2 \times 10^3$) для (R)-эпимера 4
U(eq) определяют как одну треть от кривой ортогонализированного тензора U^{ij}

	x	y	z	U(eq)
N(1)	746(2)	9565(4)	4120(3)	35(1)
C(1)	1373(2)	10267(5)	4426(4)	40(1)
C(2)	779(3)	12200(5)	4030(4)	40(1)
C(3)	131(3)	11526(5)	3717(4)	45(1)
C(4)	141(3)	10216(5)	3785(4)	39(1)
C(5)	723(2)	8163(4)	4257(4)	33(1)
C(6)	1301(2)	6686(5)	5412(3)	34(1)

034890

C (7)	1730 (2)	6675 (4)	4553 (3)	33 (1)
C (8)	1228 (3)	7319 (5)	3735 (4)	37 (1)
C (9)	1755 (3)	6761 (6)	6387 (4)	43 (1)
C (10)	1727 (3)	3180 (6)	7861 (5)	50 (1)
C (11)	1763 (4)	2447 (7)	7027 (5)	61 (2)
C (12)	1751 (4)	1097 (8)	7088 (7)	75 (2)
C (13)	1724 (5)	533 (8)	7970 (9)	94 (3)
C (14)	1685 (6)	1247 (9)	8799 (8)	97 (3)
C (15)	1693 (5)	2625 (8)	8758 (6)	78 (2)
P (1)	1047 (1)	5375 (1)	7561 (1)	43 (1)
F (1)	1535 (2)	7981 (3)	3064 (2)	54 (1)
F (2)	828 (2)	6372 (3)	3227 (2)	54 (1)
N (2)	792 (3)	13496 (4)	3968 (4)	53 (1)
N (3)	1370 (2)	11570 (4)	4362 (4)	44 (1)
O (1)	1897 (2)	9608 (4)	4734 (4)	54 (1)
O (2)	868 (2)	7849 (4)	5276 (3)	42 (1)
O (3)	1921 (2)	5414 (4)	4294 (3)	42 (1)
O (4)	1354 (2)	6700 (4)	7211 (3)	48 (1)
O (5)	1755 (2)	4556 (4)	7796 (3)	51 (1)
O (6)	514 (2)	4743 (5)	6869 (4)	63 (1)
N (4)	789 (3)	5715 (6)	8600 (5)	69 (1)
O (7)	595 (5)	5712 (9)	10681 (7)	76 (1)
O (8)	1614 (5)	4778 (9)	10851 (7)	73 (1)
C (16)	1339 (8)	6191 (13)	9486 (10)	72 (1)
C (17)	1345 (8)	7650 (14)	9611 (10)	75 (1)
C (18)	1162 (8)	5543 (19)	10418 (11)	73 (1)
C (19)	1420 (3)	4227 (5)	11796 (4)	74 (1)
C (20)	1213 (3)	2833 (5)	11556 (4)	74 (1)
C (21)	1737 (3)	1889 (5)	11701 (4)	74 (1)
C (22)	1562 (3)	570 (5)	11626 (4)	74 (1)
C (23)	863 (3)	195 (5)	11406 (4)	73 (1)
C (24)	339 (3)	1139 (5)	11261 (4)	74 (1)
C (25)	514 (3)	2458 (5)	11336 (4)	74 (1)
N (4A)	789 (3)	5715 (6)	8600 (5)	69 (1)
O (7A)	643 (8)	6651 (15)	10878 (10)	71 (1)
O (8A)	1156 (10)	4892 (18)	10491 (12)	73 (1)
C (16A)	1034 (13)	6570 (20)	9296 (16)	72 (1)
C (17A)	797 (12)	7900 (20)	9187 (16)	74 (2)
C (18A)	945 (13)	6100 (20)	10317 (17)	72 (1)
C (19A)	974 (5)	4324 (9)	11444 (7)	74 (1)
C (20A)	986 (5)	2873 (9)	11442 (7)	74 (1)
C (21A)	1654 (5)	2345 (9)	11684 (7)	74 (1)
C (22A)	1747 (5)	996 (9)	11687 (7)	74 (1)
C (23A)	1172 (5)	176 (9)	11448 (7)	74 (1)
C (24A)	504 (5)	704 (9)	11206 (7)	74 (1)
C (25A)	411 (5)	2052 (9)	11203 (7)	74 (1)

Таблица 3. Данные кристаллизации и уточнение структуры для (S)-эпимера 3

Идентификационный код	shelx	
Эмпирическая формула	$C_{25,29}H_{26,44}F_2N_{4,14}O_8P$	
Молекулярная масса по формуле	585,44	
Температура	293(2) К (20(2) °C)	
Длина волны	1,54184 Å	
Кристаллическая система	моноклинная	
Пространственная группа	P 2 ₁	
Размеры элементарной ячейки	a=11,3844(3) Å	α=90°.
	b=34,8283(7) Å	β=111,282(4)°.
	c=15,1260(6) Å	γ=90°.
Объем	5588,5(3) Å ³	
Z	8	
Плотность (расчетная)	1,392 мг/м ³	
Коэффициент поглощения	1,541 мм ⁻¹	
F(000)	2434	
Размер кристалла	0,249×0,072×0,042 мм ³	
Диапазон тэта для сбора данных	3,135–73,481°.	
Диапазон коэффициентов	-13<=h<=12, -42<=k<=42, -17<=l<=18	
Собранные отражения	43816	
Независимые отражения	21792 [R(int)=0,0582]	
Завершенность до тэта=67,684°	100,0%	
Коррекция поглощения	Полуэмпирическая на основании эквивалентов	
Макс. и мин. трансмиссия	1,00000 и 0,62509	
Способ уточнения	Способ наименьших квадратов в полноматричном приближении по F ²	
Данные/ограничители/параметры	21792/2/1478	
Точность приближения по F ²	1,022	
Конечные коэффициенты R [I>2 сигма (I)]	R1=0,0628, wR2=0,1597	
Коэффициенты R (все данные)	R1=0,0921, wR2=0,1794	
Абсолютный структурный параметр	0,031(13)	
Коэффициент экстинкции	n/a	
Наибольший дифф. пик и провал	0,513 и -0,413 е.Å ⁻³	

Таблица 4. Атомные координаты ($\times 10^4$) и параметры эквивалентного изотропного замещения ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) для (S)-эпимера 3
 $U(\text{eq})$ определяют как одну треть от кривой ортогонализированного тензора U^{ij}

	x	y	z	$U(\text{eq})$
C(1)	-2481(7)	1599(2)	6585(6)	35(2)
C(2)	-4079(6)	1825(2)	7037(5)	36(2)
C(3)	-3292(7)	2138(2)	7558(6)	40(2)
C(4)	-2138(7)	2159(2)	7573(6)	40(2)
C(5)	-417(6)	1916(2)	7113(6)	37(2)
C(6)	1520(6)	2176(2)	7885(6)	37(2)
C(7)	1182(7)	2311(2)	6853(6)	41(2)
C(8)	-198(7)	2183(2)	6399(6)	42(2)
C(9)	2187(7)	2464(2)	8638(6)	40(2)
C(10)	-428(7)	3331(2)	8699(6)	42(2)
C(11)	-661(8)	3061(2)	9279(7)	52(2)
C(12)	-1894(8)	2980(2)	9149(8)	53(2)
C(13)	-2880(8)	3159(3)	8495(7)	59(2)
C(14)	-2631(9)	3426(4)	7913(9)	71(3)
C(15)	-1403(9)	3517(3)	8012(7)	61(2)
C(16)	3026(7)	3528(2)	8008(6)	44(2)
C(17)	4074(8)	3825(2)	8156(7)	52(2)
C(18)	3226(7)	3213(2)	7405(6)	46(2)
C(19)	2875(10)	3054(3)	5787(8)	65(3)
C(20)	4128(8)	3142(2)	5690(6)	46(2)
C(21)	4412(9)	3504(2)	5462(6)	48(2)
C(22)	5504(9)	3580(3)	5340(7)	59(2)
C(23)	6360(9)	3281(3)	5425(8)	67(3)
C(24)	6068(10)	2917(3)	5643(9)	73(3)
C(25)	4979(10)	2851(3)	5777(7)	62(2)
N(1)	-1680(6)	1893(2)	7097(5)	36(1)
N(2)	-3652(6)	1572(2)	6561(5)	38(1)
N(3)	-5247(6)	1787(2)	7003(6)	50(2)
N(4)	3092(6)	3390(2)	8954(5)	44(2)
O(1)	-2035(5)	1369(2)	6152(5)	49(1)
O(2)	360(5)	2074(1)	7991(4)	39(1)
O(3)	1997(5)	2165(2)	6434(5)	50(2)

034890

O(4)	1475(5)	2819(1)	8445(4)	39(1)
O(5)	805(5)	3441(1)	8776(4)	41(1)
O(6)	2374(5)	3056(2)	10168(4)	43(1)
O(7)	3851(6)	2925(2)	7682(5)	51(1)
O(8)	2644(6)	3304(2)	6471(5)	57(2)
P(1)	1979(2)	3167(1)	9166(1)	38(1)
F(1)	-960(4)	2496(2)	6274(4)	56(1)
F(2)	-474(5)	2023(2)	5530(4)	62(1)
C(26)	-2061(6)	6176(2)	4177(5)	33(1)
C(27)	-3538(6)	5940(2)	4770(6)	35(2)
C(28)	-2710(7)	5634(2)	5256(6)	38(2)
C(29)	-1565(7)	5637(2)	5238(6)	38(2)
C(30)	84(6)	5918(2)	4754(5)	32(1)
C(31)	1757(6)	5545(2)	4799(6)	34(2)
C(32)	2320(6)	5811(2)	5667(5)	34(2)
C(33)	1125(7)	6014(2)	5697(6)	38(2)
C(34)	2224(7)	5144(2)	4906(6)	35(2)
C(35)	882(8)	4453(2)	6664(7)	50(2)
C(36)	404(11)	4719(4)	7049(10)	78(3)
C(37)	-867(11)	4722(4)	6911(10)	88(4)
C(38)	-1658(11)	4449(4)	6353(11)	91(4)
C(39)	-1148(11)	4166(4)	5937(10)	84(4)
C(40)	101(10)	4166(3)	6074(9)	69(3)
C(41)	4806(7)	4794(2)	7341(6)	43(2)
C(42)	6103(8)	4628(3)	7868(8)	59(2)
C(43)	4987(7)	5214(3)	7111(7)	48(2)
C(44)	5647(11)	5817(3)	7891(9)	71(3)
C(45)	7060(10)	5779(2)	8217(8)	60(2)
C(46)	7713(12)	5808(4)	7623(9)	79(3)
C(47)	8991(14)	5754(5)	7926(10)	98(4)
C(48)	9642(12)	5675(4)	8866(10)	82(3)
C(49)	9007(11)	5644(3)	9451(9)	74(3)
C(50)	7752(11)	5689(3)	9171(8)	67(3)
N(5)	-1179(5)	5908(2)	4744(5)	34(1)
N(6)	-3210(5)	6187(2)	4213(5)	35(1)
N(7)	-4662(6)	5986(2)	4836(5)	43(2)
N(8)	4159(6)	4572(2)	6488(5)	41(1)
O(9)	-1723(5)	6398(1)	3670(4)	40(1)
O(10)	423(4)	5538(1)	4567(4)	36(1)
O(11)	3246(5)	6065(2)	5588(4)	41(1)
O(12)	2070(5)	4969(1)	5727(4)	37(1)

034890

O(13)	2175(5)	4448(2)	6814(4)	43(1)
O(14)	2253(5)	4294(1)	5142(4)	41(1)
O(15)	5126(5)	5327(2)	6402(4)	47(1)
O(16)	5079(6)	5439(2)	7854(5)	59(2)
P(2)	2638(2)	4552(1)	5976(1)	36(1)
F(3)	848(4)	5870(2)	6437(3)	53(1)
F(4)	1260(4)	6399(1)	5827(4)	52(1)
C(51)	1164(6)	6520(2)	10539(5)	33(2)
C(52)	-905(6)	6744(2)	9936(6)	35(2)
C(53)	-566(7)	7031(2)	9380(6)	40(2)
C(54)	599(7)	7038(2)	9410(6)	36(2)
C(55)	2751(6)	6779(2)	9946(5)	32(1)
C(56)	4386(6)	7140(2)	9914(5)	32(1)
C(57)	4124(6)	6867(2)	9056(5)	34(2)
C(58)	2905(7)	6665(2)	9004(5)	34(2)
C(59)	4765(6)	7544(2)	9783(6)	35(2)
C(60)	1742(7)	8055(2)	7650(7)	47(2)
C(61)	1252(10)	7835(3)	6826(8)	68(3)
C(62)	84(11)	7676(4)	6616(10)	82(3)
C(63)	-591(8)	7726(3)	7205(9)	64(3)
C(64)	-89(8)	7946(2)	7989(8)	54(2)
C(65)	1092(8)	8113(2)	8209(7)	52(2)
C(66)	5145(7)	7905(2)	7409(6)	41(2)
C(67)	6043(9)	8071(3)	6954(7)	53(2)
C(68)	5468(8)	7483(2)	7619(6)	42(2)
C(69)	5155(10)	6864(3)	6889(8)	60(2)
C(70)	6264(9)	6846(2)	6585(7)	53(2)
C(71)	6155(10)	6982(3)	5686(8)	59(2)
C(72)	7172(12)	6977(3)	5408(9)	71(3)
C(73)	8315(12)	6830(3)	5991(10)	75(3)
C(74)	8438(12)	6699(4)	6868(10)	81(3)
C(75)	7418(11)	6703(3)	7169(8)	67(3)
N(9)	1491(5)	6777(2)	9943(5)	34(1)
N(10)	-10(5)	6508(2)	10508(5)	35(1)
N(11)	-2054(6)	6705(2)	9902(5)	41(2)
N(12)	5259(6)	8126(2)	8254(5)	41(1)
O(17)	2023(4)	6309(1)	11077(4)	39(1)
O(18)	3243(4)	7154(1)	10110(4)	35(1)
O(19)	5136(5)	6622(1)	9151(4)	39(1)
O(20)	3850(4)	7708(1)	8941(4)	37(1)
O(21)	2929(5)	8222(2)	7826(4)	46(1)

034890

O(22)	4481(5)	8389(1)	9527(4)	41(1)
O(23)	6271(6)	7362(2)	8322(4)	49(1)
O(24)	4745(6)	7264(2)	6883(5)	53(2)
P(3)	4158(2)	8129(1)	8706(1)	36(1)
F(5)	1915(4)	6800(2)	8253(3)	50(1)
F(6)	2937(5)	6285(1)	8908(4)	53(1)
C(76)	3540(7)	11117(2)	8649(6)	35(2)
C(77)	1484(7)	10884(2)	8173(6)	39(2)
C(78)	1778(7)	10570(2)	7671(6)	40(2)
C(79)	2942(7)	10551(2)	7677(5)	35(2)
C(80)	5100(7)	10796(2)	8131(5)	35(2)
C(81)	6303(6)	10530(2)	7384(6)	35(2)
C(82)	6961(7)	10396(2)	8421(6)	40(2)
C(83)	6006(7)	10527(2)	8865(6)	41(2)
C(84)	6246(7)	10233(2)	6633(6)	39(2)
C(85)	3528(7)	9348(2)	6559(6)	38(2)
C(86)	2822(8)	9666(2)	6114(7)	48(2)
C(87)	1628(8)	9720(2)	6144(7)	48(2)
C(88)	1173(9)	9470(3)	6643(9)	67(3)
C(89)	1910(11)	9160(4)	7098(11)	94(5)
C(90)	3074(10)	9099(3)	7046(9)	71(3)
C(91)	7615(8)	9178(2)	7289(7)	49(2)
C(92)	8505(9)	8866(2)	7193(9)	64(3)
C(93)	8450(7)	9499(3)	7889(6)	47(2)
C(94)	9666(9)	9667(3)	9478(7)	62(3)
C(95)	10946(8)	9549(3)	9561(6)	50(2)
C(96)	11759(10)	9775(3)	9326(8)	61(2)
C(97)	12923(11)	9654(4)	9378(10)	84(4)
C(98)	13298(11)	9271(4)	9690(10)	84(4)
C(99)	12498(11)	9039(3)	9906(8)	70(3)
C(100)	11361(10)	9177(3)	9876(8)	63(3)
N(13)	3848(5)	10818(2)	8143(5)	34(1)
N(14)	2369(6)	11140(2)	8647(5)	38(1)
N(15)	343(6)	10931(2)	8180(5)	48(2)
N(16)	6823(6)	9309(2)	6359(5)	44(2)
O(25)	4392(5)	11344(2)	9089(4)	46(1)
O(26)	5042(5)	10633(1)	7266(4)	39(1)
O(27)	8180(5)	10544(2)	8843(5)	51(2)
O(28)	5706(5)	9886(1)	6841(4)	39(1)
O(29)	4702(5)	9262(1)	6535(4)	39(1)
O(30)	4937(5)	9639(1)	5117(4)	41(1)

O (31)	8836 (5)	9768 (2)	7578 (5)	50 (1)
O (32)	8700 (6)	9428 (2)	8821 (5)	62 (2)
P (4)	5510 (2)	9535 (1)	6125 (1)	36 (1)
F (7)	5347 (5)	10213 (1)	8974 (4)	55 (1)
F (8)	6542 (5)	10684 (2)	9723 (4)	61 (1)
C (101)	6810 (20)	9411 (8)	10080 (20)	93 (8)
C (102)	6300 (20)	9155 (6)	9290 (15)	83 (7)
N (17)	7140 (30)	9630 (9)	10710 (20)	148 (12)

Пример 2.

Растворимость NUC-1031 и его диастереоизомеров определяли в ряде фармацевтически приемлемых систем растворителей. Принятый способ являлся следующим.

Получали небольшой объем, 1-2 мл, каждой системы растворителей и добавляли навеску рассматриваемого соединения. Растворы перемешивали в течение приблизительно 4 ч и затем фильтровали через мембрану 0,45 мкм. Концентрацию рассматриваемого соединения в фильтрате затем определяли посредством анализа ВЭЖХ.

На основании протокола дозирования гемцитабина, используемого для лечения рака поджелудочной железы, доза NUC-1031 с поправкой на молекулярную массу может составлять приблизительно 3200 мг, вводимые в форме инфузии раз в неделю. В качестве показателя необходимого уровня растворимости, принимая за гипотетическую цель объем инфузии 500 мл, необходимая растворимость NUC-1031 составляет >6 мг/мл в жидкости для инфузии. Однако этот уровень растворимости является только указанием, и приведенные ниже значения растворимости все еще могут обеспечивать эффективную терапию.

В табл. 5 показана растворимость смеси 2 эпимеров гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]-фосфата в ряде растворителей, пригодных для внутривенного введения.

Растворитель	Внешний вид	Анализ (мг/мл)
Этанол	Быстрое растворение, через 30 минут осадение в форме белой пасты	
Глицерин	Выраженное API	
Пропиленгликоль	Выраженное осадение через 30 минут	371
PEG 400	Выраженное осадение через 120 минут	385
NMP	Прозрачный раствор	>207
DMSO	Прозрачный раствор	>217

В табл. 6 показана растворимость двух эпимеров 3 и 4 гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]-фосфата в ряде смесей растворитель/вода.

Растворитель (процент по объему)	Растворимость (R) - эпимера 4 (мг/мл)	Растворимость (S) - эпимера 3 (мг/мл)
ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЬ (10%)	0	0,23
ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЬ (50%)	0,11	11,29
PEG400 (10%)	0	0,46
PEG400 (50%)	0,27	32,13
ЭТАНОЛ (10%)	0	0,27
ЭТАНОЛ (50%)	0,69	34,79

Как можно видеть из табл. 6, (R)-эпимер 4 является, по существу, нерастворимым в 10% смесях полярных органических растворителей с водой. Для (S)-эпимера 3, с другой стороны, показана значительно улучшенная растворимость. В 50% смесях полярных органических растворителей с водой (S)-эпимер 3 может являться более чем в 100 раз более растворимым, чем (R)-эпимер 4. (S)-эпимер может, таким образом, потенциально обеспечивать очень удобную и эффективную терапию.

Пример 3.

Для оценки дифференциального поглощения (R)- и (S)-эпимеров циклодекстрином регистрировали спектры ³¹P ЯМР смеси изомеров NUC-1031 после обработки HP-β-CD в D₂O.

Исследования ЯМР.

¹H ЯМР (500 МГц) и ³¹P ЯМР (202 МГц) регистрировали на спектрометре Bruker Avance 500 МГц при 25°C. Химические сдвиги (δ) приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внешнего для D₂O (δ 4,9 ¹H ЯМР) или внутреннего для 85% H₃PO₄ (δ 0,00 ³¹P ЯМР). Исследования как ВЭЖХ, так и ЯМР

проводили при комнатной температуре

Исследования ВЭЖХ.

Анализ высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили с использованием системы ThermoScientific. Анализы обращеннофазовой ВЭЖХ проводили на SCIENTIFIC Hypersil Gold C18, 5 μ , 150 \times 4,6 мм, с элюцией H₂O/CH₃CN от 90/10 до 0/100 в течение 30 мин при скорости потока 1 мл/мин и при длине волны для детекции 280 нм. Время удержания эписмеров NUC-1031 (растворенных в MeOH) наблюдали соответственно через 13,58 мин для (S)-эписмера 3 и через 13,44 мин для (R)-эписмера 4 в этих условиях (фиг. 5А).

2,36 мг смеси NUC-1031 (1:1,1 (S):(R)) взвешивали и переносили в пробирку для ЯМР. Затем 13,3 мг HP- β -CD растворяли в 1,3 мл оксида дейтерия, и этот раствор добавляли в пробирку для ЯМР (молярное соотношение 1:2,3 NUC1031: HP- β -CD).

(Примечание: не все твердые вещества растворялись в растворе.)

Спектр ³¹P ЯМР показывает, что HP- β -CD является способным увеличивать растворимость (S)-эписмера 3 NUC-1031 (4,14 Гц) по сравнению с (R)-эписмером (4,00 Гц), с наблюдаемым соотношением (S)- и (R)-эписмеров в растворе, составляющим 6,6:1 с преобладанием (S)-эписмера (фиг. 4).

0,5 мл раствора D₂O из исследования ЯМР разводили до 1 мл посредством добавления 0,5 мл воды (1,15 мг/мл). 20 мкл этого раствора инъецировали в ВЭЖХ.

Анализ ВЭЖХ разведенного образца для ЯМР подтвердил, что (S)-эписмер 3 поглощается раствором лучше, чем (R)-эписмер 4, с наблюдаемым соотношением (S)- и (R)-эписмеров в растворе, составляющим 5:1 с преобладанием (S)-эписмера, что в общих чертах соответствует данным ЯМР (фиг. 5B).

Подобные исследования, проведенные с другим производным фосфата гемцитабина, не показали различий между поглощением (S)- и (R)-эписмеров этого производного раствором циклодекстрина.

Пример 4.

На выведение и биодоступность большинства лекарственных средств сильно влияет их пресистемный метаболизм в печени. Можно определить относительную "устойчивость к метаболизму" в печени *in vitro* посредством инкубации соединений с криоконсервированными гепатоцитами и определения начального количества по сравнению с конечным количеством тестируемого соединения в инкубационных смесях. Следующий способ представляет собой анализ ВЭЖХ-MS/MS с использованием суспензии пулированных криоконсервированных гепатоцитов человека.

Схема анализа.

Гепатоциты человека: смешанный пол и пул из 10.

Конечная плотность клеток: 1 млн (10⁶) жизнеспособных клеток/мл.

Экспериментальный способ

Пулированные криоконсервированные гепатоциты размораживают, промывают и ресуспендируют в буфере Кребса-Хенселейта (pH 7,3). Реакцию инициируют посредством добавления тестируемого соединения (конечная концентрация 1 мкМ) к суспензии клеток и инкубируют в конечном объеме 100 мкл в плоскодонном 96-луночном планшете в течение 0 мин и 120 мин соответственно при 37°C/5% CO₂. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл ацетонитрила в инкубационную смесь. Затем образцы осторожно и кратко перемешивают на встряхивателе для планшетов, полностью переносят в 0,8 мл 96-луночный планшет с V-образным дном и центрифугируют при 2550 \times g в течение 15 мин при комнатной температуре. Каждый супернатант (150 мкл) переносят в чистую кассетную пробирку с последующим анализом ВЭЖХ-MS/MS в тройной-кврупольной системе Thermo Electron.

Этот анализ модифицировали для определения времени полураспада. В этом случае временные точки для отбора образцов представляют собой 0, 30, 60, 90 и 120 мин.

Эталонные соединения

Четыре эталонных соединения (1 мкМ) тестировали одновременно с тестируемыми соединениями. Пропранолол является относительно стабильным в присутствии гепатоцитов человека, в то время как флуразепам, налоксон и терфенадин являются относительно нестабильными в присутствии гепатоцитов человека.

Аналитические способы

Образцы анализировали посредством (RP)ВЭЖХ-MS/MS с использованием избирательного мониторинга реакций (SRM). Условия ВЭЖХ представляют собой насос для двухкомпонентных смесей HP1100 с автодозатором, с комбинированным режимом работы C-12, колонку 2 \times 20 мм и градиент.

Анализ данных

Площади пиков, соответствующих тестируемому соединению, регистрируют посредством ВЭЖХ-MS/MS. Устойчивость к метаболизму, выраженную как процент оставшегося тестируемого соединения, рассчитывают посредством сравнения площадей пиков тестируемого соединения через 2 ч и в нулевое время. В случае определения времени полураспада, время полураспада определяют по наклону начального линейного диапазона логарифмической кривой оставшегося тестируемого соединения (%) в зависимости от времени, принимая кинетику первого порядка.

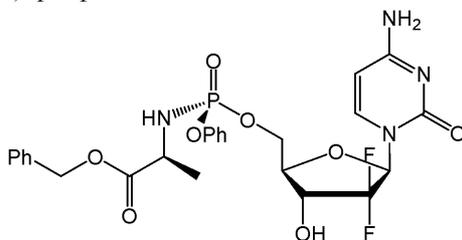
Результаты показаны в табл. 7.

В табл. 7 показано собственное выведение S-эпимера, R-эпимера и смеси двух эпимеров.

	Тестируемая концентрация (M)	Время инкубации (минут)	% оставшегося соединения				Время полураспада (минут)				Clint
			1-й	2-й	3-й	Средний	1-е	2-е	3-е	Среднее	
Смесь R/S	1,0E-06	0	100,0	100,0	100,0	100,0	72,9	72,5	82,2	76	13,10
	1,0E-06	30	64,3	68,7	74,3	69,1					13,10
	1,0E-06	60	56,5	56,3	60,3	57,7					13,10
	1,0E-06	90	59,6	55,9	45,2	53,6					13,10
	1,0E-06	120	36,9	56,8	53,9	49,2					13,10
S	1,0E-06	0	100,0	100,0	100,0	100,0	40,5	36,5	35,0	37	26,60
	1,0E-06	30	47,2	57,6	52,9	52,6					26,60
	1,0E-06	60	35,8	32,0	30,4	32,7					26,60
	1,0E-06	90	25,0	26,0	30,2	27,0					26,60
	1,0E-06	120	31,0	30,6	35,6	32,4					26,60
R	1,0E-06	0	100,0	100,0	100,0	100,0	471,6	>120	>120	>120	<8,2
	1,0E-06	30	80,2	86,9	94,3	87,1					<8,2
	1,0E-06	60	97,4	{2,1}	{1,3}	97,4					<8,2
	1,0E-06	90	73,6	91,6	88,0	84,4					<8,2
	1,0E-06	120	83,8	108,5	111,4	101,2					<8,2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический состав для лечения злокачественной опухоли, содержащий гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил)]-(S)-фосфат 3:



или его фармацевтически приемлемую соль, обладающие диастереоизомерной чистотой 90% или выше, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель; где состав представляет собой водный состав, который содержит также полярный органический растворитель; где состав предназначен для внутривенного введения.

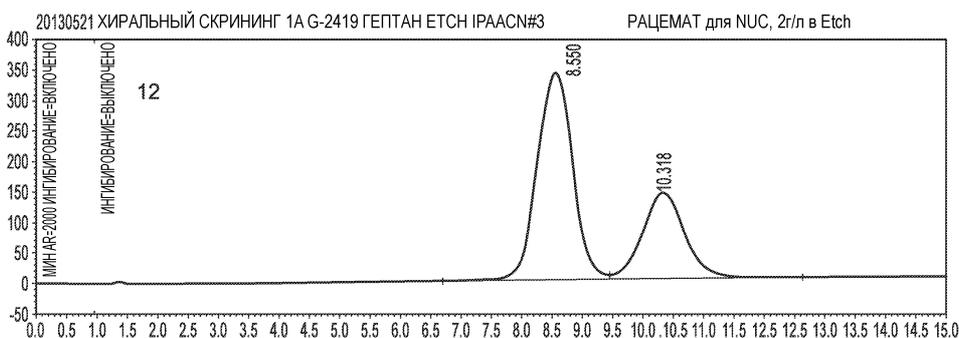
2. Фармацевтический состав по п.1, где гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил)]-(S)-фосфат 3 находится в форме свободного основания.

3. Фармацевтический состав по пп.1 или 2, где гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил)]-(S)-фосфат 3 обладает диастереоизомерной чистотой 95% или выше.

4. Фармацевтический состав по п.3, где гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил)]-(S)-фосфат 3 обладает диастереоизомерной чистотой 98% или выше.

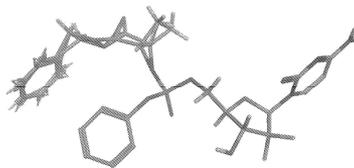
5. Фармацевтический состав по п.4, где гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил)]-(S)-фосфат 3 обладает диастереоизомерной чистотой более чем приблизительно 99,5%.

6. Фармацевтический состав по любому из предшествующих пунктов, где злокачественная опухоль выбрана из рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака легкого, рака предстательной железы, холангиокарциномы, злокачественной опухоли почки, рака шейки матки, злокачественной опухоли тимуса, злокачественной опухоли неизвестного первичного происхождения, лимфомы или лейкоза.

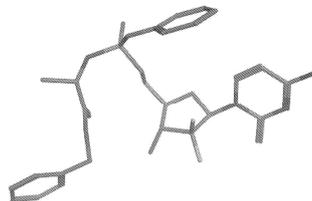


Фиг. 1

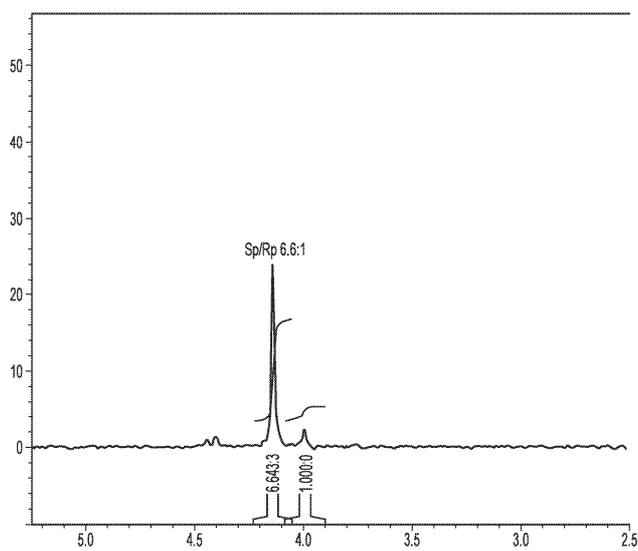
034890



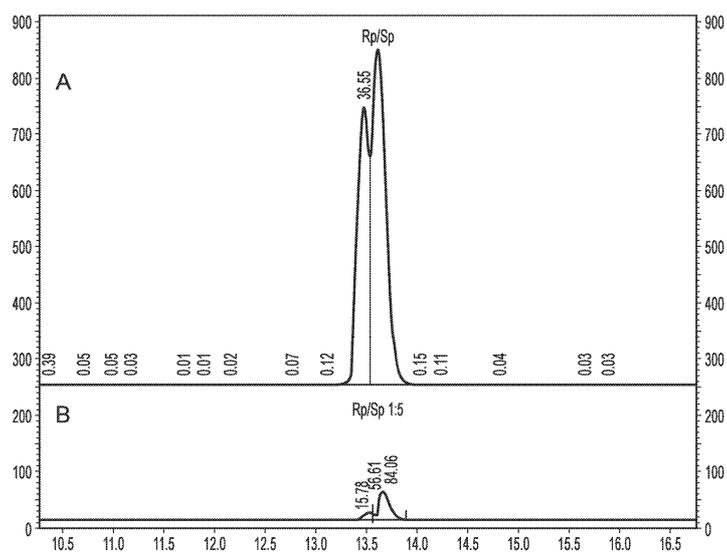
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2