

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **026341**(13) **B9**

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

- | | |
|--|---|
| <p>(15) Информация об исправлении
Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле: п.8</p> <p>(48) Дата публикации исправления
2021.12.27, Бюллетень №12'2021</p> <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.03.31</p> <p>(21) Номер заявки
201290993</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2011.03.31</p> | <p>(51) Int. Cl. C07H 19/06 (2006.01)
C07H 19/207 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07F 9/24 (2006.01)
C07F 9/655 (2006.01)
C07F 9/6558 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)
C07H 19/04 (2006.01)
C07H 19/044 (2006.01)
C07H 19/052 (2006.01)
C07H 19/10 (2006.01)
C07H 19/24 (2006.01)
A61K 31/664 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)</p> |
|--|---|

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА НУКЛЕОЗИДФОСФОРАМИДАТА

- | | |
|--|--|
| <p>(31) 61/319,548; 61/319,513; 12/783,680</p> <p>(32) 2010.03.31; 2010.03.31; 2010.05.20</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2013.04.30</p> <p>(86) PCT/US2011/030725</p> <p>(87) WO 2011/123645 2011.10.06</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГАЙЛИД ФАРМАССЕТ ЭлЭлСи (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Росс Брюс С., София Майкл Джозеф,
Памулапати Ганапати Редди,
Рачаконда Сугуна, Чжан Хай-Рен,
Чун Бионг-Квон, Ван Пэйюань (US)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) WO-A2-2008121634
US-A1-2007042988
WO-A1-2010135569
MICHAEL J. SOFIA ET AL.: "Discovery
of a beta-D-2'-Deoxy-2'-alpha-fluoro-2'-beta-C-
methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for
the Treatment of Hepatitis C Virus", JOURNAL
OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 53, no.
19, 16 September 2010 (2010-09-16), pages
7202-7218, XP55004442, ISSN: 0022-2623, DOI:
10.1021/jm100863x, page 7209; fig. 5, page 7214 -
column 2</p> |
|--|--|

-
- (57) Настоящее изобретение относится к новой кристаллической форме нуклеозидфосфоамидата и её применению в качестве агента для лечения вирусных заболеваний. Это соединение является ингибитором РНК-зависимой репликации вирусной РНК и подходит в качестве ингибитора полимеразы ВГС NS5В, ингибитора репликации ВГС и для лечения инфекции гепатита С у млекопитающих.

B9**026341****026341****B9**

Область техники

Настоящее изобретение относится к кристаллической форме нуклеозидфосфорамидата и её применению в качестве агента для лечения вирусных заболеваний. Это соединение является ингибитором РНК-зависимой репликации вирусной РНК и подходит в качестве ингибитора полимеразы ВГС NS5B, ингибитора репликации ВГС и для лечения инфекции гепатита С у млекопитающих.

Уровень техники

Инфекция вируса гепатита С (ВГС) представляет собой одну из крупнейших проблем здравоохранения, приводящую к хроническим заболеваниям печени, например, циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме, у значительного количества инфицированных, оцениваемого как 2-15% населения мира. Только в США, по оценкам Государственного центра санитарно-эпидемиологического надзора США, насчитывается 4,5 млн инфицированных. Согласно Всемирной организации здравоохранения, в мире насчитывается более 200 млн инфицированных, при этом каждый год инфицируются по меньшей мере от 3 до 4 млн человек. После инфицирования приблизительно 20% людей избавляются от вируса, однако остальные могут являться носителями ВГС всю оставшуюся жизнь. У десяти-двадцати процентов хронически инфицированных лиц в конечном итоге развивается цирроз или рак, разрушающий печень. Это вирусное заболевание передается парентерально через зараженную кровь и препараты крови, загрязненные иглы либо половым путем или вертикально от инфицированных матерей или матерей-носителей их плоду. Современная терапия инфекции ВГС, ограниченная иммунотерапией рекомбинантным интерфероном- α отдельно или в комбинации с аналогом нуклеозида рибавирином, дает ограниченное клиническое улучшение. Кроме того, в настоящее время не существует утвержденной вакцины ВГС. Следовательно, существует неотложная необходимость в разработке усовершенствованных терапевтических агентов, способных эффективно бороться с хронической инфекцией ВГС.

Вирион ВГС представляет собой оболочечный вирус, содержащий +-цепь РНК с одиночной олигонуклеотидной геномной последовательностью длиной около 9600 оснований, кодирующей полипротеин из приблизительно 3010 аминокислот. Белковые продукты гена ВГС состоят из структурных белков С, Е1 и Е2 и неструктурных белков NS2, NS3, NS4А и NS4В, а также NS5А и NS5В. Считается, что неструктурные (NS) белки обеспечивают каталитический механизм репликации вируса. Протеаза NS3 высвобождает из полипротеиновой цепи NS5В РНК-зависимую РНК-полимеразу. Полимераза NS5В ВГС необходима для синтеза двуцепочечной РНК из одноцепочечной вирусной РНК, которая служит матрицей в цикле репликации ВГС. Таким образом, полимеразы NS5В считается необходимым компонентом комплекса репликации ВГС (K. Ishi, et al, *Hepatology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118). Ингибирование полимеразы NS5В ВГС предотвращает образование двуцепочечной РНК ВГС и поэтому представляет собой перспективный подход к разработке ВГС-специфической противовирусной терапии.

ВГС принадлежит к более крупному семейству вирусов, обладающих многими общими свойствами.

Вирусы Flaviviridae

Семейство вирусов Flaviviridae включает, по меньшей мере, три различных рода: pestiviruses, вызывающие заболевания крупного рогатого скота и свиней; flaviviruses, являющиеся основной причиной таких заболеваний, как лихорадка денге и желтая лихорадка; и hepaciviruses, единственным членом которого является ВГС. Род flavivirus включает более 68 членов, разделенных на группы на основе серологического родства (Calisher et al., *J. Gen. Virol.*, 1993, 70, 37-43). Клинические симптомы различаются и включают лихорадку, энцефалит и геморрагическую лихорадку (Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). Флави-вирусы, имеющие мировое значение, ассоциированные с заболеваниями человека, включают вирусы геморрагической лихорадки денге (DHF), вирус желтой лихорадки, удара, 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 pestivirus включает вирус диареи крупного рогатого скота (BVDV), вирус классической чумы свиней (CSFV, также называемый вирусом холеры свиней) и вирус пограничной болезни овец (BDV) (Moennig V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Пестивирусные инфекции домашнего скота (крупного рогатого скота, свиней и овец) причиняют значительные убытки мировой экономике. BVDV вызывает вирусную диарею крупного рогатого скота и имеет существенное экономическое значение для промышленного животноводства (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). Пестивирусы человека описаны не столь хорошо, как пестивирусы животных. Однако серологические обследования указывают на значительные контакты человека с пестивирусами.

Пестивирусы и гепацивирусы являются близкородственными группами вирусов в пределах семейства Flaviviridae. Другие близкородственные вирусы этого семейства включают вирус GB А, вирус GB А-подобные агенты, вирус GB В и вирус GB С (также называемый вирусом гепатита G, HGV). Группа гепацивирусов (вирус гепатита С; ВГС) состоит из ряда близкородственных, но генетически различающихся вирусов, способных инфицировать человека. Существует по меньшей мере 6 генотипов ВГС и более 50 подтипов. Из-за сходства между пестивирусами и гепацивирусами, а также низкой способности

гепацевирозов эффективно расти в культуре клеток, в качестве суррогата для изучения вируса ВГС часто используют вирус диареи крупного рогатого скота (BVDV).

Генетическая организация пестивирусов и гепацевирозов очень сходна. Эти вирусы, содержащие цепь РНК, обладают единственной большой открытой рамкой считывания (ORF), кодирующей все вирусные белки, необходимые для репликации вируса. Эти белки экспрессируются в виде полипротеина, который подвергается процессингу во время и после трансляции как клеточными, так и вирусными протеиназами, что приводит к получению зрелых вирусных белков. Вирусные белки, ответственные за репликацию геномной РНК вируса, располагаются приблизительно в пределах С-конца. Две трети ORF называются неструктурными (NS) белками. Генетическая организация и процессинг полипротеина неструктурной белковой части ORF у пестивирусов и гепацевирозов очень сходны. Как у пестивирусов, так и у гепацевирозов зрелые неструктурные (NS) белки по порядку с N-конца кодирующей области неструктурных белков до С-конца ORF состоят из p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B.

NS-белки пестивирусов и гепацевирозов содержат домены последовательности, характерные для белков со специфическими функциями. Например, белки NS3 вирусов обеих групп обладают аминокислотными мотивами, характерными для сериновых протеиназ и хеликаз (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, белки NS5B пестивирусов и гепацевирозов содержат мотивы, характерные для РНК-зависимых РНК-полимераз (Koonin E.V. and Dolja V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Фактические роли и функции NS-белков пестивирусов и гепацевирозов в жизненном цикле вирусов прямо аналогичны. В обоих случаях сериновая протеиназа NS3 отвечает за все варианты протеолитического процессинга полипротеиновых предшественников ниже своего 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). Белок NS4A в обоих случаях действует как кофактор вместе с сериновой протеазой NS3 (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). Белок NS3 обоих вирусов также действует как хеликаза (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, белки NS5B пестивирусов и гепацевирозов обладают предсказанной активностью РНК-зависимых РНК-полимераз (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 существуют ограниченные возможности лечения лиц, инфицированных вирусом гепатита С. Современные утвержденные способы лечения представляют собой иммунотерапию рекомбинантным интерфероном- α отдельно или в комбинации с аналогом нуклеозида рибавирином. Клиническая эффективность этой терапии ограничена; лишь 50% пациентов, подвергаемых лечению, отвечают на терапию. Поэтому существует выраженная потребность в более эффективных новых способах лечения для удовлетворения медицинских нужд, вызванных ВГС-инфекцией.

В настоящее время идентифицирован ряд потенциальных молекулярных мишеней для разработки противовирусных лекарств прямого действия, способных функционировать как средства лечения ВГС, включая аутопротеазу NS2-NS3, протеазу NS3, хеликазу NS3 и полимеразу NS5B. РНК-зависимая РНК-полимераза абсолютно необходима для репликации одноцепочечного, положительно-смыслового РНК-генома и вызывает значительный интерес медицинских химиков.

Выполнен обзор ингибиторов NS5B ВГС как потенциальных терапевтических агентов для лечения инфекции ВГС: 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. Потенциальная возможность появления устойчивых штаммов ВГС и необходимость идентификации агентов с широким диапазоном генотипов поддерживает необходимость продолжения попыток идентификации новых, более эффективных нуклеозидов в качестве ингибиторов NS5B ВГС.

Нуклеозидные ингибиторы полимеразы NS5B могут действовать либо на субстрат неприродного происхождения, что приводит к терминации цепи, либо в качестве конкурентного ингибитора, конкурирующего с нуклеотидами, связывающимися с полимеразой. Для функционирования в качестве терминатора цепи аналог нуклеозида должен поглощаться клеткой и преобразовываться *in vivo* в трифосфат, конкурирующий с полимеразным сайтом связывания нуклеотидов. Это преобразование в трифосфат обычно опосредовано клеточными киназами, придающими потенциальному нуклеозидному ингибитору полимераз дополнительные структурные характеристики. К сожалению, это ограничивает прямую оценку нуклеозидов в качестве ингибиторов репликации ВГС клеточным анализом, способным обнаруживать фосфорилирование *in situ*.

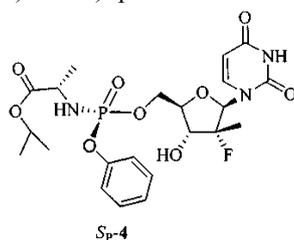
В некоторых случаях биологическая активность нуклеозида затруднена его плохими субстратными характеристиками по отношению к одной или более киназ, необходимых для его преобразования в активную форму трифосфата. Образование монофосфата нуклеозидкиназой обычно рассматривают в качестве скоростьограничивающего этапа трех событий фосфорилирования. Для обхода необходимости начального этапа фосфорилирования в метаболизме нуклеозида в аналог активного трифосфата сообщали об изготовлении стабильных фосфатных пролекарств. Показано, что нуклеозидфосфорамидатные пролекарства являются предшественниками активных нуклеозидтрифосфатов и ингибируют репликацию вируса при введении в целые клетки, инфицированные вирусом (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.

Кроме того, применимость нуклеозидов в качестве терапевтических агентов иногда ограничивается их плохими физико-химическими и фармакокинетическими свойствами. Эти свойства могут ограничивать всасывание агента в кишечнике и поглощение тканью или клеткой-мишенью. Для улучшения свойств можно использовать пролекарства нуклеозидов.

Продемонстрировано, что изготовление нуклеозидфосфорамидатов усиливает системное всасывание нуклеозида и, кроме того, фосфорамидатная группа этих "пронуклеотидов" маскируется нейтральными липофильными группами, что приводит к получению подходящего коэффициента распределения, оптимизации поглощения и транспорта в клетку, резко повышающим внутриклеточную концентрацию аналога нуклеозидмонофосфата по сравнению с введением исходного нуклеозида самого по себе. Ферментативный гидролиз фосфатной группы сложных эфиров приводит к получению нуклеозидмонофосфата, причем начальное скоростьлимитирующее фосфорилирование не является необходимым. В связи с этим в патентной заявке США 12/053015, соответствующей WO 2008/121634 и US 2010/0016251, описан ряд нуклеозидфосфорамидатных пролекарств, многие из которых демонстрируют активность при анализе ВГС. Несколько соединений, описанных в US 2010/0016251, тестировали в качестве потенциальных клинических кандидатов на аттестацию в Управлении по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к кристаллическому (S)-изопропиловому эфиру 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропионовой кислоты, представленному формулой S_p-4



имеющему следующие значения угла отражения $2\theta(\pm 0,2^\circ)$ на дифрактограмме XRPD: 6,1 и 12,7.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения вирусной инфекции гепатита С, содержащей терапевтически эффективное количество указанного выше кристаллического S_p-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

В ещё одном другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения вирусной инфекции гепатита С у нуждающегося в этом пациента, который включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы указанного выше кристаллического S_p-4.

Краткое описание чертежей

- Фиг. 1 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения соединения 4.
- Фиг. 2 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения R_p-4.
- Фиг. 3 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 (формы 1).
- Фиг. 4 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 (формы 1).
- Фиг. 5 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 CH₂Cl₂ (формы 2).
- Фиг. 6 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 CHCl₃ (формы 3).
- Фиг. 7 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 (формы 4).
- Фиг. 8 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 (формы 5).
- Фиг. 9 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 (аморфного).
- Фиг. 10 - рентгеновская кристаллическая структура S_p-4 (формы 1).
- Фиг. 11 - рентгеновская кристаллическая структура (изотропная) SP-4 CH₂Cl₂ (формы 2).
- Фиг. 12 - рентгеновская кристаллическая структура (анизотропная) S_p-4 CH₂Cl₂ (формы 2).
- Фиг. 13 - рентгеновская кристаллическая структура S_p-4 CHCl₃ (формы 3).
- Фиг. 14 - ИК-спектр с преобразованием Фурье соединения 4.

Фиг. 15 - ИК-спектр с преобразованием Фурье R_p-4 .

Фиг. 16 - ИК-спектр с преобразованием Фурье S_p-4 .

Фиг. 17 - термогравиметрический и дифференциальный сканирующий калориметрический анализ соединения 4.

Фиг. 18 - термогравиметрический и дифференциальный сканирующий калориметрический анализ R_p-4 .

Фиг. 19 - термогравиметрический и дифференциальный сканирующий калориметрический анализ S_p-4 .

Фиг. 20А - рентгеновская кристаллическая структура соединения 8 (S_p -изомера) (молекула № 1 асимметричной единицы).

Фиг. 20В - рентгеновская кристаллическая структура соединения 8 (S_p -изомера) (молекула № 2 асимметричной единицы).

Фиг. 21 - рентгеновская дифрактограмма высокого разрешения S_p-4 (формы 6).

Фиг. 22А - рентгеновская кристаллическая структура (S)-изопропил 2-(((S)-(перфторфенокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноата (молекула № 1 асимметричной единицы).

Фиг. 22В - рентгеновская кристаллическая структура (S)-изопропил 2-(((S)-(перфторфенокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноата (молекула № 2 асимметричной единицы).

Подробное описание изобретения

Определения

Термины "необязательный" или "необязательно" здесь означают, что описанное событие или обстоятельство может происходить, но не обязательно происходит, и что описание включает варианты, в которых событие или обстоятельство происходит, и варианты, в которых оно не происходит. Например, "необязательная связь" означает, что связь может присутствовать или не присутствовать, и что описание включает одинарные, двойные или тройные связи.

Термин "R*" означает, что атом фосфора является хиральным и имеет соответствующее обозначение "R" или "S" согласно правилу Кана-Ингольда-Прелонга, причем смысл этих обозначений соответствует общепринятому.

Термин "очищенный" здесь относится к чистоте данного соединения. Например, соединение является "очищенным", если данное соединение представляет собой основной компонент композиции, т.е. является чистым по меньшей мере на 50% (мас./мас.). Таким образом, термин "очищенный" охватывает по меньшей мере 50% (мас./мас.) чистоту, по меньшей мере 60% (мас./мас.) чистоту, по меньшей мере 70% чистоту, по меньшей мере 80% чистоту, по меньшей мере 85% чистоту, по меньшей мере 90% чистоту, по меньшей мере 92% чистоту, по меньшей мере 94% чистоту, по меньшей мере 96% чистоту, по меньшей мере 97% чистоту, по меньшей мере 98% чистоту, по меньшей мере 99% чистоту, по меньшей мере 99,5% чистоту и по меньшей мере 99,9% чистоту, причем термин "практически чистый" охватывает по меньшей мере 97% чистоту, по меньшей мере 98% чистоту, по меньшей мере 99% чистоту, по меньшей мере 99,5% чистоту и по меньшей мере 99,9% чистоту.

Термин "метаболизированный" здесь относится к соединению, продуцируемому *in vivo* после введения субьекту, нуждающемуся в этом.

Термин "приблизительно" (также представленный знаком ~) означает, что указанное численное значение является частью диапазона, колеблющегося в пределах стандартной ошибки эксперимента.

Выражение "практически, как показано на..." указанной порошковой дифрактограмме (XRPD) означает, что положения пиков, показанных на дифрактограмме, практически совпадают при визуальной оценке или обращении к перечню выбранных пиков ($\pm 0,2^\circ 2\theta$). Для специалиста понятно, что интенсивности могут варьировать в зависимости от образца.

Термин "практически безводный" означает, что соединение содержит не более 10 мас.% воды, предпочтительно не более 1 мас.% воды, более предпочтительно не более 0,5 мас.% воды и наиболее предпочтительно не более 0,1 мас.% воды.

Растворитель или антирастворитель (при использовании в реакциях, при кристаллизации и т.д. или структурные и/или адсорбированные растворители) включает по меньшей мере одно соединение из C_1-C_8 спирта, C_2-C_8 простого эфира, C_3-C_7 кетона, C_3-C_7 сложного эфира, C_1-C_2 хлоруглерода, C_2-C_7 нитрила, прочие растворители, C_5-C_{12} насыщенного углеводорода и C_6-C_{12} ароматического углеводорода.

C_1-C_8 спирт относится к линейному/разветвленному и/или циклическому/ациклическому спирту, содержащему такое количество атомов углерода. C_1-C_8 спирт включает метанол, этанол, n-пропанол, изопропанол, изобутанол, гексанол и циклогексанол, но не ограничивается ими.

C_2-C_8 простой эфир относится к линейному/разветвленному и/или циклическому/ациклическому эфиру, содержащему такое количество атомов углерода. C_2-C_8 простой эфир включает диметиловый эфир, диэтиловый эфир, диизопропиловый эфир, ди-n-бутиловый эфир, метил-t-бутиловый эфир (МТБЭ), тетрагидрофуран и диоксан, но не ограничивается ими.

C_3-C_7 кетон относится к линейному/разветвленному и/или циклическому/ациклическому кетону, содержащему такое количество атомов углерода. C_3-C_7 кетон включает ацетон, метилэтилкетон, пропа-

нон, бутанон, метилизобутилкетон, метилбутилкетон и циклогексанон, но не ограничивается ими.

C₃-C₇ сложный эфир относится к линейному/разветвленному и/или циклическому/ациклическому сложному эфиру, содержащему такое количество атомов углерода. C₃-C₇ сложный эфир включает этилацетат, пропилацетат, n-бутилацетат и т.д., но не ограничивается ими.

C₁-C₂ хлоруглерод относится к хлоруглероду, содержащему такое количество атомов углерода. C₁-C₂ хлоруглерод включает хлороформ, метиленхлорид (ДХМ), тетрахлорид углерода, 1,2-дихлорэтан и тетрахлорэтан, но не ограничивается ими.

C₂-C₇ нитрил относится к нитрилу, содержащему такое количество атомов углерода. C₂-C₇ нитрил включает ацетонитрил, пропионитрил и т.д., но не ограничивается ими.

Термин "прочие растворители" относится к растворителям, широко используемым в органической химии, которые включают диэтиленгликоль, простой диметиловый эфир диэтиленгликоля, 1,2-диметоксизтан, диметилформамид, диметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин, гексаметилфосфорамид, гексаметилфосфортриамид, N-метил-2-пирролидон, нитрометан, пиридин, триэтиламин и уксусную кислоту, но не ограничиваются ими.

Термин "C₅-C₁₂ насыщенный углеводород" относится к линейному/разветвленному и/или циклическому/ациклическому углеводороду. C₅-C₁₂ насыщенный углеводород включает n-пентан, петролейный эфир (лигроин), n-гексан, n-гептан, циклогексан и циклопентан, но не ограничивается ими.

Термин "C₆-C₁₂ ароматический углеводород" относится к замещенным или незамещенным углеводородам, каркас которых содержит фенильную группу. Предпочтительные углеводороды включают бензол, ксилол, толуол, хлорбензол, o-ксилол, m-ксилол, p-ксилол, ксилолы, причем более предпочтительным является толуол.

Термин "гало" или "галоген" здесь включает хлор-, бром-, йод- и фтор-.

Термин "блокирующая группа" относится к химической группе, проявляющей следующие характеристики. "Группа" является производной от "защитного соединения". Группы, селективные по отношению к первичным гидроксилам по сравнению со вторичными гидроксильными, которые можно присоединить при условиях, согласующихся со стабильностью фосфорамидата (pH 2-8) и которые придают итоговому продукту значительно отличающиеся физические свойства, дающие возможность облегченного отделения продукта "3'-фосфорамидат-5'-новая группа" от непрореагировавшего желательного соединения. Группа должна селективно вступать в реакцию с хорошим выходом, приводящую к получению защищенного субстрата, стабильного в ходе планируемых реакций (см. Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed. T. W. Greene and P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1999). Примеры групп включают бензоил, ацетил, фенил-замещенный бензоил, тетрагидрофуранил, тритил, DMT (4,4'-диметокситритил), MMT (4-монометокситритил), триметокситритил, пиксильную (9-фенилксантен-9-ильную) группу, тиопиксил (9-фенилтиоксантен-9-ил) или 9-(p-метоксифенил)ксантин-9-ил (МОХ) и т.д.; C(O)-алкил, C(O)Ph, C(O)арил, CH₂O-алкил, CH₂O-арил, SO₂-алкил, SO₂-арил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил. Ацетали, например, MOM или THP и т.п. рассматриваются в качестве возможных групп. Кроме того, в этом качестве рассматриваются фторированные соединения, поскольку их можно присоединять к соединению и селективно удалять путем пропускания через фтористую среду для твердофазной экстракции (FluoroFlash®). Конкретный пример включает фторированный аналог тритила, аналог тритила 1-[4-(1H,1H,2H,2H-перфтордецил)фенил]-1,1-дифенилметанол. Кроме того, рассматриваются другие фторированные аналоги тритила - BOC, Fmoc, CBz и т.д. Сульфонилалиды, подобные p-толуолсульфонилхлориду, можно селективно присоединять по 5'-положению. Можно селективно образовывать сложные эфиры, например, ацетаты и бензоаты. Ангидриды дикарбоновых кислот, например янтарный ангидрид и его производные, можно использовать для получения сложноэфирной связи со свободной карбоновой кислотой; такие примеры включают оксалил, малонил, сукцинил, глутарил, адипил, пимелил, суберил, азелаоил, себацил, фталил, изофталил, терефталил и т.д., но не ограничиваются ими. Свободная карбоновая кислота резко увеличивает полярность; ее также можно использовать в качестве основы для экстракции продукта реакции в умеренно щелочную водную фазу, например, растворы бикарбоната натрия. Фосфорамидатная группа относительно стабильна в кислых средах, поэтому также можно использовать группы, для которых необходимы кислые условия реакции, например тетрагидропиранил.

Термин "защитная группа", являющийся производным от "защитного соединения", имеет прямое и общепринятое значение, т.е. означает по меньшей мере одну защитную или блокирующую группу, связанную по меньшей мере с одной функциональной группой (например, -OH, -NH₂ и т.д.), что дает возможность химической модификации по меньшей мере одной другой функциональной группы. Примеры защитных групп включают бензоил, ацетил, фенил-замещенный бензоил, тетрагидропиранил, тритил, DMT (4,4'-диметокситритил), MMT (4-монометокситритил), триметокситритил, пиксильную (9-фенилксантен-9-ильную) группу, тиопиксил (9-фенилтиоксантен-9-ил) или 9-(p-метоксифенил)ксантин-9-ил (МОХ) и т.д.; C(O)-алкил, C(O)Ph, C(O)арил, C(O)O(низший алкил), C(O)O(низший алкилен)арил (например, -C(O)OCH₂Ph), C(O)O-арил, CH₂O-алкил, CH₂O-арил, SO₂-алкил, SO₂-арил, защитную группу, включающую по меньшей мере один атом кремния, например, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, Si(низший алкил)₂OSi(низший алкил)₂OH (например, -Si(^tPr)₂OSi(^tPr)₂OH), но не

ограничиваются ими.

Термин "защитное соединение", если не указано иное, относится здесь к соединению, содержащему "защитную группу" и способному вступать в реакцию с соединением, содержащим функциональные группы, которые могут быть защищены.

Термин "уходящая группа" здесь имеет то же значение для специалиста (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure-Fourth Edition by Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992 pages 351-357) и представляет группу, являющуюся частью молекулы субстрата и присоединенную к ней; в ходе реакции, в которой молекула субстрата подвергается замещению (например, нуклеофилом), уходящая группа замещается. Примеры уходящих групп включают но не ограничиваются ими, галоген (F, Cl, Br и I), предпочтительно Cl, Br или I; тозилат, мезилат, трифлат, ацетат, камфорсульфонат, арилоксид и арилоксид, замещенный по меньшей мере одной электроноакцепторной группой (например, р-нитрофеноксидом, 2-хлорфеноксидом, 4-хлорфеноксидом, 2,4-динитрофеноксидом, пентафторфеноксидом и т.д.) и т.д. Термин "электроноакцепторная группа" употребляется здесь в прямом значении. Примеры электроноакцепторных групп включают галоген, $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{низший алкил})$, $-\text{C}(\text{O})(\text{арил})$, $\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{низший алкил})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{арил})$ и т.д., но не ограничиваются ими.

Термин "основной реагент" здесь относится к соединению, способному депротонировать гидроксильную группу. Примеры основных реагентов включают, но не ограничиваются ими (низший алк)оксид ((низший алкил)OM) в комбинации со спиртовым растворителем, причем (низшие алк)оксиды включают MeO^- , EtO^- , ${}^n\text{PrO}^-$, ${}^i\text{PrO}^-$, ${}^t\text{BuO}^-$, ${}^i\text{AmO}^-$ (изоамилоксид) и т.д., но не ограничиваются ими, а M представляет собой катион щелочного металла, например, Li^+ , Na^+ , K^+ , и т.д.. Спиртовые растворители включают (низший алкил)ОН, например, MeOH, EtOH, ${}^n\text{PrOH}$, ${}^i\text{PrOH}$, ${}^t\text{BuOH}$, ${}^2\text{AmOH}$ и т.д. Кроме того, можно использовать основания, не содержащие алкоксигрупп, например гидрид натрия, гексаметилдисилазан натрия, гексаметилдисилазан лития, диизопропиламид лития, гидрид кальция, карбонат натрия, карбонат калия, карбонат цезия, DBU, DBN, реактивы Гриньяра, например, (низший алкил)Mg(галоген), которые включают MeMgCl , MeMgBr , ${}^t\text{BuMgCl}$, ${}^t\text{BuMgBr}$ и т.д., но не ограничиваются ими.

Термин "основание" охватывает термин "основной реагент" и означает соединение, способное депротонировать протонсодержащее соединение, т.е. основание Брэнстеда. В дополнение к вышеперечисленным примерам, примеры оснований включают пиридин, коллидин, 2,6-(низший алкил)пиридин, диметиланилин, имидазол, N-метилимидазол, пиразол, N-метилпиразол, триэтиламин, диизопропилэтиламин и т.д., но не ограничиваются ими.

Термин "ненуклеофильное основание" относится к соединению, способному действовать как основание Брэнстеда, но обладающему низкой нуклеофильностью. Примеры ненуклеофильных оснований включают карбонат калия, карбонат цезия, диизопропиламид, диизопропилэтиламин, триэтиламин, хинукледин, нафталин-1,8-диамин, 2,2,6,6-тетраметилпиперидин, 1,8-диазабициклоундец-7-ен, 4-диметиламинопиридин, пиридин, 2,6-ди-С1-6-алкилпиридин, 2,4,6-три-С1-6-алкилпиридин, 1,5-диазабицикло[4.3.0]нон-5-ен и 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан, но не ограничиваются ими.

Термин "электроноакцепторная группа" соответствует своему прямому значению. Примеры электроноакцепторных групп включают галоген (F, Cl, Br или I), $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{низший алкил})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{арил})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{низший алкил})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{арил})$ и т.д., но не ограничиваются ими.

Термин "сокристаллаты" включает сокристаллаты 4, R_p-4 или S_p-4 в комбинации с солями, и охватывает фармацевтически приемлемые соли.

Термин "соли" здесь относится к соединению, включающему катион и анион, которое можно получить путем протонирования протоноакцепторной группы и/или депротонирования протонодонорной группы. Следует отметить, что протонирование протоноакцепторной группы приводит к образованию катионной разновидности, в которой заряд уравновешен присутствием физиологического аниона, в то время как депротонирование протонодонорной группы приводит к образованию анионной разновидности, в которой заряд уравновешен присутствием физиологического катиона.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, являющуюся фармацевтически приемлемой. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, не ограничиваясь ими: (1) соли добавления кислот, образованные неорганическими кислотами, например, соляной кислотой, бромоводородной кислотой, серной кислотой, азотной кислотой, фосфорной кислотой и т.п.; или образованные органическими кислотами, например, гликолевой кислотой, пировиноградной кислотой, молочной кислотой, малоновой кислотой, яблочной кислотой, малеиновой кислотой, фумаровой кислотой, винной кислотой, лимонной кислотой, 3-(4-гидроксибензоил)бензойной кислотой, коричной кислотой, миндальной кислотой, метансульфоновой кислотой, этансульфоновой кислотой, 1,2-этандисульфоновой кислотой, 2-гидроксиэтансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, 4-хлорбензолсульфоновой кислотой, 2-нафталинсульфоновой кислотой, 4-толуолсульфоновой кислотой, камфорсульфоновой кислотой, лаурилсульфоновой кислотой, глюконовой кислотой, глутаминовой кислотой, салициловой кислотой, муконовой кислотой и т.п., либо (2) соли добавления оснований, образованные основаниями, сопряженными с любой из вышеперечисленных неорганических кислот, причем сопряженные основания включают катионный компонент, выбранный из Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , R^{4-g+} , где R^g представляет собой C₁₋₃ алкил, а g представляет собой число, выбранное из 0, 1, 2, 3 или 4. Следует понимать, что все ссылки на фармацев-

тически приемлемые соли включают формы добавления растворителей (сольваты) или кристаллические формы (вещества, кристаллизующиеся в различных формах) согласно определению, приведенному здесь, или аналогичную соль добавления кислоты.

Термин "алкил" относится к неразветвленному или разветвленному насыщенному одновалентному остатку углеводорода, содержащему от 1 до 30 атомов углерода. Термин " C_{1-M} алкил" относится к алкилу, включающему от 1 до M атомов углерода, где M представляет собой целое число, принимающее следующие значения: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30. Термин " C_{1-4} алкил" относится к алкилу, включающему от 1 до 4 атомов углерода. Термин "низший алкил" обозначает линейный или разветвленный остаток углеводорода, включающий от 1 до 6 атомов углерода. " C_{1-20} алкил" здесь относится к алкилу, включающему от 1 до 20 атомов углерода. " C_{1-10} алкил" здесь относится к алкилу, включающему от 1 до 10 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы низших эфиров, включающие метил, этил, пропил, *i*-пропил, *n*-бутил, *i*-бутил, *t*-бутил или пентил, изопентил, неопентил, гексил, гептил и октил, но не ограничиваются ими. Термин (ар)алкил или (гетероарил)алкил означают алкильную группу, необязательно замещенную арильной или гетероарильной группой соответственно.

Термин "алкенил" относится к незамещенному углеводородному радикалу, содержащему от 2 до 10 атомов углерода и одну или две олефиновых двойных связи, предпочтительно одну этиленовую двойную связь. Термин " C_{2-N} алкенил" относится к алкенилу, включающему от 2 до N атомов углерода, где N представляет собой целое число, принимающее следующие значения: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Термин " C_{2-10} алкенил" относится к алкенилу, включающему от 2 до 10 атомов углерода. Термин " C_{2-4} алкенил" относится к алкенилу, включающему от 2 до 4 атомов углерода. Примеры включают винил, 1-пропенил, 2-пропенил (аллил) или 2-бутенил (кротил), но не ограничиваются ими.

Термин "арил", если не указано иное, относится здесь к замещенному или незамещенному фенилу (Ph), бифенилу или нафтилу, в предпочтительном случае термин "арил" относится к замещенному или незамещенному фенилу. Арильная группа может быть замещена одной или более группами, выбранными из гидроксила, F, Cl, Br, I, amino, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циан, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфоновой кислоты, фосфата и фосфоната, незащищенных или, при необходимости защищенных, как известно специалистам, например, согласно T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

Термин "арилоксид", если не указано иное, относится здесь к замещенному или незамещенному феноксиду (PhO-), *p*-фенилфеноксиду (*p*-Ph-PhO-) или нафтоксиду, в предпочтительном случае термин "арилоксид" относится к замещенному или незамещенному феноксиду. Арилоксидная группа может быть замещена одной или более группами, выбранными из гидроксила, F, Cl, Br, I, -C(O)(низшего алкила), -C(O)O(низшего алкила), amino, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфоновой кислоты, фосфата и фосфоната, незащищенных или, при необходимости защищенных, как известно специалистам, например, согласно T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

Термин "препарат" или "дозированное лекарственное средство" включает как твердые, так и жидкие составы активного соединения, причем специалист должен учитывать, что активный ингредиент может существовать в виде различных препаратов в зависимости от желательной дозы и фармакокинетических параметров.

Термин "вспомогательное вещество" здесь относится к соединению, используемому для изготовления фармацевтической композиции, являющемуся в целом безопасным, нетоксическим и не являющемуся ни биологически, ни в ином смысле нежелательным, и включает вспомогательные вещества, приемлемые как для ветеринарного использования, так и для фармацевтического использования в препаратах, предназначенных для лечения людей.

Термин "кристаллический" относится к ситуации, когда твердый образец S_p-4 или R_p-4 обладает кристаллическими характеристиками, определяемыми путем рентгеновской порошковой дифракции или монокристаллической рентгеновской методики.

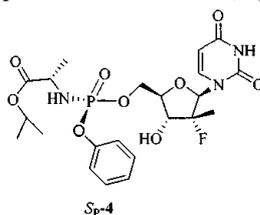
Термин "кристаллоподобный" относится к ситуации, когда твердый образец S_p-4 или R_p-4 обладает кристаллическими характеристиками, определяемыми одним из способов, например, визуально или с помощью оптической или поляризационной микроскопии, но не обладает кристаллическими характеристиками при использовании других средств, например, рентгеновской порошковой дифракции. Способы визуального определения степени кристаллизации твердого образца визуально или с помощью оптической или поляризационной микроскопии описаны в патентах США <695> и <776>, оба из которых включены посредством ссылки. Твердый образец S_p-4 или R_p-4 , являющийся "кристаллоподобным" может являться кристаллическим при определенных условиях, но становится некристаллическим при других условиях.

Термин "аморфный" относится к ситуации, когда твердый образец S_p-4 или R_p-4 не является ни кристаллическим, ни кристаллоподобным.

Варианты воплощения

Первый вариант воплощения направлен на кристаллический (S)-изопропиловый эфир 2-(((S)-

((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси(фенокси)фосфорил)аминопропионовой кислоты, представленный формулой S_p-4



имеющий следующие значения угла отражения $2\theta(\pm 0,2^\circ)$ на дифрактограмме XRPD: 6,1 и 12,7.

В предпочтительном варианте указанный выше кристаллический SP-4 имеет значения угла отражения $2\theta(^\circ)$ на дифрактограмме XRPD приблизительно: 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8 и 23,3.

В ещё одном предпочтительном варианте указанный выше кристаллический SP-4 имеет по существу такую же дифрактограмму порошкового рентгеноструктурного анализа (XRPD), как показанная на фиг. 21.

Дозировка, введение и применение

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения вирусной инфекции гепатита С, содержащей терапевтически эффективное количество указанного выше кристаллического S_p-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

В предпочтительном варианте указанная фармацевтическая композиция может дополнительно включать другой противовирусный агент.

В предпочтительных вариантах другой противовирусный агент представляет собой ингибитор протеазы NS3 ВГС или ингибитор протеазы NS5A ВГС.

Соединение S_p-4 можно составлять в виде разнообразных препаратов для перорального введения и носителей. Пероральное введение может быть в форме таблеток, таблеток с оболочкой, твердых и мягких желатиновых капсул, растворов, эмульсий, сиропов или суспензий. Соединение S_p-4 эффективно при введении в виде суппозиторий, среди прочих путей введения. Наиболее удобным путем введения в общем случае является пероральный при использовании подходящей схемы ежедневного приема, которую можно корректировать согласно степени тяжести заболевания и реакции пациента на противовирусные медикаменты.

Соединение S_p-4 вместе с одним или более подходящих вспомогательных веществ, носителей или разбавителей можно составлять в виде фармацевтических композиций и лекарственных форм. Фармацевтические композиции и дозированные лекарственные формы могут состоять из стандартных ингредиентов в стандартных пропорциях, включать или не включать дополнительные активные соединения; дозированные лекарственные формы могут содержать любое подходящее эффективное количество активного ингредиента, соизмеримое с предполагаемым используемым диапазоном ежедневной дозы. Фармацевтические композиции можно использовать в виде твердых веществ, например, таблеток или капсул, полужидких препаратов, порошков, составов с замедленным высвобождением или жидкостей, например, суспензий, эмульсий или капсул для перорального применения; либо в форме суппозиторий для ректального или вагинального введения. Типичный препарат содержит от приблизительно 5% до приблизительно 95% активного соединения или соединений (мас./мас.).

Соединение S_p-4 можно вводить в чистом виде, однако в общем случае их следует вводить в смеси с одним или более подходящих фармацевтических вспомогательных веществ, разбавителей или носителей, выбранных в соответствии с предполагаемым путем введения и стандартной фармацевтической практикой.

Твердые формы препаратов включают, например, порошки, таблетки, пилюли, капсулы, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или несколько веществ, которые также могут действовать как разбавители, вкусовые агенты, солюбилизаторы, смазывающие вещества, суспендирующие вещества, связующие вещества, консерванты, разрыхлители для таблеток или капсулирующий материал. В порошках носитель обычно представляет собой тонко измельченное твердое вещество, находящееся в смеси с тонко измельченным активным компонентом. В таблетках активный компонент обычно смешивают с носителем, обладающим необходимой связующей емкостью в подходящих пропорциях, и прессуют в таблетки желательной формы и размера. Подходящие носители включают карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактозу, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, легкоплавкий воск, масло какао и т.п., но не ограничиваются ими. Твердые формы препаратов могут содержать, в дополнение к активному компоненту, красители, вкусоароматические добавки, стабилизаторы, буферы, искусственные и натуральные подсластители, разрыхлители, загустители, солюбилизаторы и т.п. Примеры твердых составов приведены в EP 0524579; US 2002/0142050; US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360;

US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; US 6267985; US 6294192; US 6383471; US 6395300; US 6 569463; US 6635278; US 6645528; US 6923988; US 6932983; US 7060294 и US 7462608, каждый из которых включен посредством ссылки.

Жидкие составы, включая эмульсии, сиропы, эликсиры и водные суспензии, также подходят для перорального введения. Они включают твердые формы препаратов, которые предназначены для преобразования в жидкие формы препаратов незадолго до применения. Примеры жидких составов приведены в патентах США № 3994974; 5695784 и 6977257. Эмульсии могут быть приготовлены в растворах, например, водных растворах пропиленгликоля, или могут содержать эмульгаторы, например лецитин, сорбитанмоноолеат или гуммиарабик. Водные суспензии можно получить путем диспергирования тонкоизмельченного активного компонента в воде с вязким материалом, например, натуральными или синтетическими камедями, смолами, метилцеллюлозой, натрий-карбоксиметилцеллюлозой и другими широко известными суспендирующими агентами.

Соединение S_p-4 можно составлять для введения в виде суппозиториев. Вначале плавят легкоплавкий воск, например смесь глицеридов жирных кислот или масло какао, и гомогенно диспергируют в нем активный компонент, например, путем перемешивания. Затем расплавленную гомогенную смесь разливают в формы подходящего размера, позволяют ей остыть и затвердеть.

Соединение S_p-4 можно составлять для вагинального введения. Вагинальные суппозитории, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или спреи, содержащие в дополнение к активному ингредиенту носители, известные в данной области техники в качестве подходящих. Некоторые из этих составов также можно использовать в сочетании с презервативом со спермицидным агентом или без него.

Подходящие составы наряду с фармацевтическими носителями, разбавителями и вспомогательными веществами описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pennsylvania, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Специалист в области составов может модифицировать составы в пределах идеи спецификации для обеспечения ряда составов для конкретного пути введения без расчета композиций, содержащих соединения, рассматриваемые здесь как нестабильные или способные потерять терапевтическую активность.

Кроме того, очищенное соединение S_p-4 можно независимо друг от друга составлять в сочетании с липосомами или мицеллами. В отношении липосом имеется в виду, что очищенные соединения можно составлять согласно описанию в патентах США №№ 4797285; 5013556; 5077056; 5077057; 5154930; 5192549; 5213804; 5225212; 5277914; 5316771; 5376380; 5549910; 5567434; 5736155; 5827533; 5882679; 5891468; 6060080; 6132763; 6143321; 6180134; 6200598; 6214375; 6224903; 6296870; 6653455; 6680068; 6726925; 7060689 и 7070801, каждый из которых включен посредством ссылки. В отношении мицелл имеется в виду, что очищенные соединения можно составлять согласно описанию в патентах США №№ 5145684 и 5091188, которые включены посредством ссылки.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения вирусной инфекции гепатита С у нуждающегося в этом пациента, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы указанного выше кристаллического S_p-4.

Предпочтительно пациентом является человек.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения вирусной инфекции гепатита С у нуждающегося в этом пациента, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы указанного выше кристаллического S_p-4 в сочетании с другим противовирусным агентом.

В предпочтительных вариантах другой противовирусный агент представляет собой ингибитор протеазы NS3 вирусной инфекции гепатита С (ВГС) или ингибитор протеазы NS5A ВГС.

Термин "субъект" означает млекопитающее, включающее крупный рогатый скот, свиней, овец, цыплят, индюшку, буйвола, ламу, страуса, собак, кошек и человека, но не ограничивающееся ими, причем в предпочтительном случае субъект является человеком. Имеется в виду, что способ лечения субъекта согласно девятому варианту воплощения может включать использование любого из соединений, рассматриваемых здесь, по отдельности или в комбинации с еще одним соединением, описанным здесь.

Термин "терапевтически эффективное количество" здесь означает количество, необходимое для снижения симптомов заболевания у индивида. Дозу следует корректировать согласно индивидуальным требованиям в каждом конкретном случае. Дозировка может меняться в широких пределах в зависимости от различных факторов, например, тяжести заболевания, подлежащего лечению, возраста и общего состояния здоровья пациента, других медикаментов, с помощью которых осуществляют лечение пациента, путь и форму введения, а также предпочтения и опыт лечащего врача. Для перорального введения ежедневная дозировка между приблизительно 0,001 и приблизительно 10 г, включая все значения, находящиеся между этими величинами, например, 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,050, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,175, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9 и 9,5, в сутки должна соответствовать монотерапии и/или комбинированной терапии.

Конкретная ежедневная дозировка находится между приблизительно 0,01 и приблизительно 1 г в сутки, включая все значения приращения на 0,01 г (т.е. 10 мг) между ними, причем предпочтительная

ежедневная дозировка находится между приблизительно 0,01 и приблизительно 0,8 г в сутки, более предпочтительно между приблизительно 0,01 и приблизительно 0,6 г в сутки и наиболее предпочтительно между приблизительно 0,01 и приблизительно 0,25 г в сутки, каждая из которых включает все значения приращения на 0,01 г между ними. В общем случае лечение начинают крупной начальной "ударной дозой" для быстрого снижения или устранения вируса, с последующим снижением дозы до уровня, достаточного для предотвращения рецидива заболевания. Специалист по лечению заболеваний, описанных здесь, способен без лишних экспериментов, полагаясь на свои знания, опыт и описание в настоящей заявке, установить терапевтически эффективное количество соединения, описанного здесь, для заданного заболевания и пациента.

Терапевтическую эффективность можно установить на основе тестов функции печени, включая уровни белка, например, белков сыворотки (например, альбумина, факторов свертывания, щелочной фосфатазы, аминотрансфераз (например, аланинтрансминазы, аспартаттрансминазы), 5'-нуклеозидазы, γ " глутаминилтранспептидазы и т.д.), синтеза билирубина, синтеза холестерина и синтеза желчных кислот, но не ограничиваясь ими; функции метаболизма печени, включая метаболизм углеводов, аминокислот и аммиака, но не ограничиваясь ими. В качестве альтернативы терапевтическую эффективность можно отслеживать, измеряя РНК ВГС. Результаты этих тестов дадут возможность оптимизации дозы.

Следует понимать, что время между альтернативным введением противовирусных агентов может колебаться в пределах 1-24 ч, включая любой поддиапазон, находящийся между этими значениями, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23 ч.

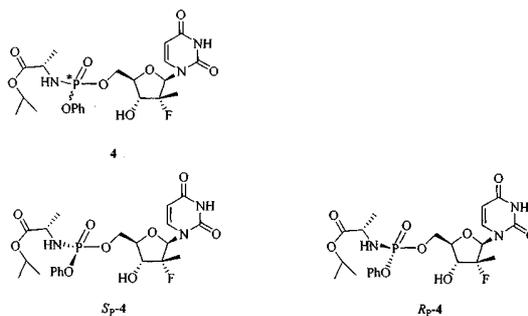
Примеры "еще одного противовирусного агента" включают ингибиторы протеазы NS3 ВГС (см. EP 1881001, US 2003187018, US 2005267018, WO 2003006490, WO 200364456, WO 2004094452, WO 2005028502, WO 2005037214, WO 2005095403, WO 2007014920, WO 2007014921, WO 2007014922, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007015824, WO 2008010921 и WO 2008010921); ингибиторы NS5B ВГС (см. US 2004229840, US 2005154056, US 2005-98125, US 20060194749, US 20060241064, US 20060293306, US 2006040890, US 2006040927, US 2006166964, US 2007275947, US 6784166, US20072759300, WO 2002057287, WO 2002057425, WO 2003010141, WO 2003037895, WO 2003105770, WO 2004000858, WO 2004002940, WO 2004002944, WO 2004002977, WO 2004003138, WO 2004041201, WO 2004065367, WO 2004096210, WO 2005021568, WO 2005103045, WO 2005123087, WO 2006012078, WO 2006020082, WO 2006065335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO 2007039142, WO 2007039145, WO 2007076034, WO 2007088148, WO 2007092000 и WO2007095269); ингибиторы NS4 ВГС (см. WO 2005067900 и WO 2007070556); ингибиторы NS5a ВГС (см. US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251 и WO 2006120252); агонисты Toll-подобного рецептора (см. WO 2007093901) и другие ингибиторы (см. WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852 и WO 2004035571); и соединения, описанные в патентной заявке США № 12/053015, поданной 21 марта 2008 г. (US 2010/0016251) (содержание которой включено посредством ссылки), интерферон- α , интерферон- β , ПЭГилированный интерферон- α , рибавирин, левовирин, вирамидин, другой нуклеозидный ингибитор полимеразы ВГС, нуклеозидный ингибитор полимеразы ВГС, ингибитор протеазы ВГС, ингибитор геликазы ВГС или ингибитор слияния ВГС, но не ограничиваются ими.

Если соединение Sp-4 вводят в комбинации с еще одним противовирусным агентом, активность может быть увеличена по сравнению с исходным соединением. Если лечение представляет собой комбинированную терапию, такое введение может быть одновременным или последовательным по отношению к введению производных нуклеозида. "Одновременное введение" здесь, таким образом, включает введение агентов в одно и то же время или в разное время. Введение двух или более агентов в одно и то же время может достигаться за счет единственного состава, содержащего два или более активных ингредиентов или за счет практически одновременного введения двух или более лекарственных форм с одиночным активным агентом.

Следует понимать, что ссылки, приведенные здесь на лечение, распространяются как на профилактику, так и на лечение существующих состояний. Кроме того, термин "лечение" инфекции ВГС здесь также включает лечение или профилактику заболевания или состояния, ассоциированных с или опосредованных инфекцией ВГС, или их клинических симптомов.

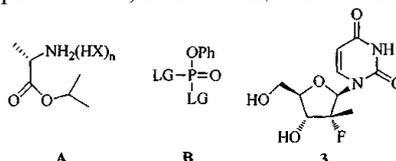
Получение

Далее описан способ изготовления любого из соединений 4, Rp-4 или Sp-4



который включает:

а) реакцию изопропилаланата, А, ди-LG-фенилфосфата, В, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина, 3, и основания, с целью получения первой смеси, включающей по меньшей мере один из Sp-4 и Rp-4



где Х представляет собой основание, сопряженное с кислотой, n составляет 0 или 1, а LG представляет собой уходящую группу;

б) реакцию первой смеси с защитным соединением, позволяющую получить вторую смесь, включающую по меньшей мере один из защищенного Sp-4 и защищенного Rp-4; и

с) необязательное воздействие на вторую смесь путем кристаллизации, хроматографии или экстракции с целью получения 4, Sp-4 или Rp-4.

Предпочтительно изопропилаланат присутствует в виде соли соляной кислоты, предпочтительно практически безводной.

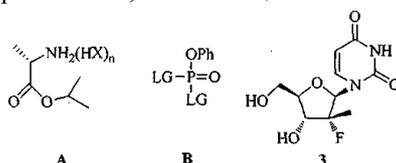
Предпочтительно основание представляет собой N-метилимидазол.

Предпочтительно молярное соотношение А:В:3 составляет приблизительно 1,6:1,3:1.

Предпочтительно защитное соединение представляет собой t-бутилдиметилсилилхлорид.

Далее описан ещё один способ получения Sp-4 или Rp-4, включающий:

а) реакцию изопропилаланата, А, ди-LG-фенилфосфата, В, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина, 3, и основания, с целью получения первой смеси, включающей по меньшей мере один из Sp-4 и Rp-4



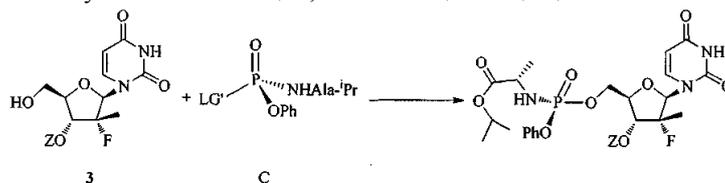
где Х представляет собой основание, сопряженное с кислотой, n составляет 0 или 1, а LG представляет собой уходящую группу; и б) необязательное воздействие на вторую смесь путем кристаллизации, хроматографии или экстракции с целью получения очищенных Sp-4 или Rp-4.

Предпочтительно способ включает очистку второй смеси или очищенного Rp-4 путем растворения или суспендирования второй смеси или смеси очищенного Rp-4 в растворителе; с последующей необязательной затравкой кристаллическим Rp-4; и внесение соответствующего антирастворителя для получения кристаллического Rp-4.

Предпочтительно способ включает очистку второй смеси или очищенного Sp-4 путем d) растворения или суспендирования второй смеси или очищенного Sp-4 в растворителе с последующей затравкой кристаллическим Sp-4 при приблизительно комнатной температуре; сбор первого твердого вещества, большую часть которого составляет Sp-4; растворение первого твердого вещества в растворителе при температуре его перегонки; и охлаждение или внесение антирастворителя для получения второго твердого вещества.

Предпочтительно способ включает дальнейшую очистку Sp-4 путем d) растворения или суспендирования второй смеси или смеси очищенного Sp-4 в первом растворителе с последующим внесением антирастворителя для получения первой композиции, в которой остаточный растворитель/антирастворитель удаляют декантацией, получая остаток; обработку остатка раствором, содержащим первый растворитель и антирастворитель для получения второй композиции, что позволяет при понижении давления получить первое твердое вещество; растворение или суспендирование первого твердого вещества с помощью второго растворителя с целью получения третьей композиции; внесение затравочных кристаллов Sp-4 в третью композицию; сбор второго твердого вещества; растворение или суспендирование второго твердого вещества в третьем растворителе, необязательно нагретом до температуры перегонки третьего растворителя, для получения четвертой композиции и, при необходимости, охла-

ным реагентом с целью получения композиции, включающей защищенный или незащищенный Sp-4



где Z представляет собой защитную группу или атом водорода;

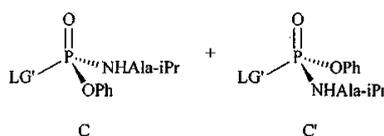
LG' представляет собой уходящую группу; и

б) необязательного воздействия на полученный защищенный или незащищенный Sp-4 путем хроматографии, экстракции или кристаллизации с целью получения очищенного защищенного или незащищенного Sp-4. В подварианте воплощения LG' представляет собой тозилат, камфорсульфонат или арил-оксид, замещенный по меньшей мере одной электроноакцепторной группой; более предпочтительно LG' выбирают из 2,4-динитрофеноксида, 4-нитрофеноксида, 2-нитрофеноксида, 2-хлор-4-нитрофеноксида, 2,4-дихлорфеноксида или пентафторфеноксида. В другом подварианте воплощения, если Sp-4 является защищенным, т.е. Z не является атомом водорода, способ согласно девятому варианту воплощения направлен, кроме того, на удаление защитной группы с защищенного Sp-4. В другом подварианте воплощения реакцию осуществляют в полярном апротонном растворителе, например, тетрагидрофуране или другом эфирном растворителе, по отдельности или в комбинации друг с другом или с C₂-C₇ нитрилом, например ацетонитрилом.

Предпочтительно способ, кроме того, включает:

1) реакцию (LG')P(O)(LG)₂, где LG, независимо от LG', представляет собой уходящую группу, с (i) изопропилаланатом и первым основанием с целью получения (LG')P(O)(LG)(NHAlaⁱPr), с последующей реакцией (LG')P(O)(LG)(NHAlaⁱPr) с фенолом и вторым основанием с целью получения смеси, включающей C и C', (ii) фенолом и первым основанием с целью получения (LG')P(O)(LG)(OPh), с последующей реакцией (LG')P(O)(LG)(OPh) с изопропилаланатом и вторым основанием с целью получения смеси, включающей C и C', либо (iii) объединенными изопропилаланатом, фенолом и, по меньшей мере, одним основанием с целью получения смеси, включающей C и C'; либо

2) реакцию (PhO)P(O)₂, (LG)₂, где LG представляет собой уходящую группу, с (i) изопропилаланатом и первым основанием с целью получения (PhO)P(O)(LG)(NHAlaⁱPr), с последующей реакцией (PhO)P(O)(LG)(NHAlaⁱPr) с предшественником уходящей группы (LG'H) и вторым основанием с целью получения смеси, включающей C и C'



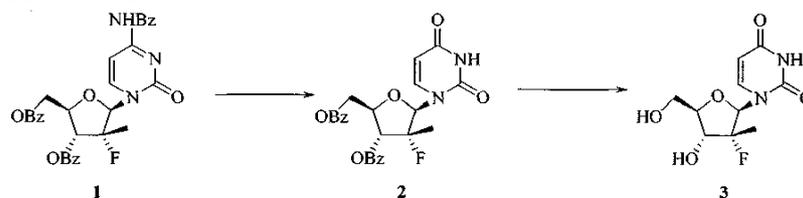
и воздействия на смесь путем хроматографии или кристаллизации смеси с целью получения C. В аспекте девятого варианта воплощения изопропилаланат присутствует в виде соли соляной кислоты, предпочтительно, практически безводной.

Примеры

Следующие примеры служат не для ограничения, а для лучшего понимания настоящего описания.

Аспекты синтеза.

Для получения уридинового нуклеозида можно было использовать трибензоилцитидин в качестве улучшенного интермедиата при синтезе некоторых 3',5'-диацилированных аналогов соединения 3 (см. ниже), полученный ранее в масштабах опытно-промышленного производства (см. WO 2006/031725 или US 2006/0122146, полностью включенные посредством ссылки). Обнаружено, что следующий способ являлся масштабируемым и рентабельным.



3',5'-O-добензоил-2'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метил-N⁴-бензоилцитидин (1) получали согласно способу, описанному в WO 2006/031725 и WO 2008/045419, полностью включенных посредством ссылки. Соединение 1 обрабатывали 70% водной уксусной кислотой с целью образования 3',5'-O-добензоил-2'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина (2). Бензойные эфиры можно было гидролизовать различными способами с равным успехом, например алкоксидами в спиртовых растворителях, например метоксидом натрия в метаноле, карбонатом калия в метаноле или аналогах этанола, алкиламинами, например, метиламином в метаноле, бутиламином и т.д. Для работ в промышленном масштабе выбрали метанольный аммиак. Ури-

графического разделения целевого продукта от побочных продуктов и сниженного уровня бис-диастереомеров.

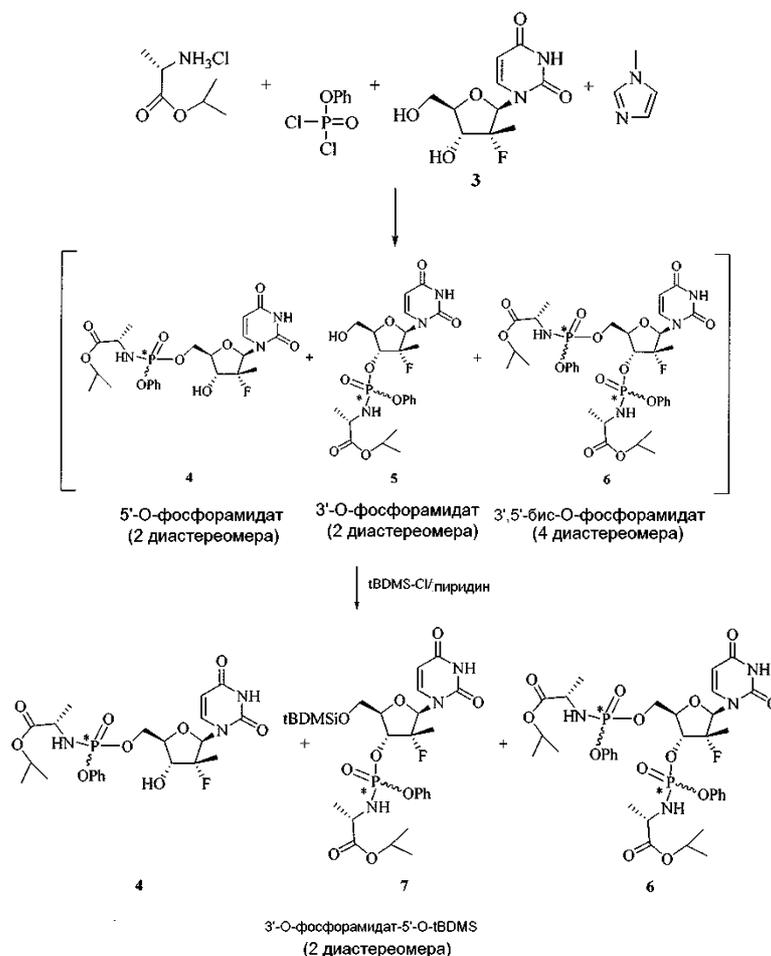
В одной из альтернативных процедур в два этапа получили 3'-гидроксипроизолированное производное соединения 3, используя *t*-бутилдиметилсилильную блокирующую группу. Указанное производное преобразовали в его 5'-фосфорамидатное производное. Желательная цель состояла в возможности удаления силильной группы впоследствии и в отсутствии 3'-изомеров (5) или 3',5'-бис-фосфорамидатов (6). Аналогичный подход продемонстрирован Borch and Fries (патент США 5233031) при низком общем выходе алкилфосфорамидата.

Еще один альтернативный подход состоял в использовании прямого синтеза, а затем - химических методик, помогающих дифференцировать примеси 3'-диастереомера 5 от целевых 5'-диастереомеров 4 и облегчающих разделение. Желательной являлась группа, способная селективно реагировать со свободным первичным гидроксидом 3'-О-фосфорамидатной примеси 5 по сравнению со свободным вторичным гидроксидом целевого 5'-О-фосфорамидата 4. Также было желательно, чтобы блокирующая группа значительно изменяла полярность полученного 5'-О-блокированного 3'-О-фосфорамидатного продукта по сравнению с целевым 5'-О-фосфорамидатом 4. Дополнительного этапа для удаления блокирующей группы не требовалось, поскольку целевые 5'-диастереомеры 4 не изменялись. Затем химически модифицированные 3'-диастереомеры должны давать возможность облегченного хроматографического разделения или разделения с помощью специальных очищающих носителей или путем экстракции.

В частности, этим требованиям отвечает блокирующая группа трет-бутилдиметилсилил (*t*BDMS); она была первой группой, использованной для демонстрации и дальнейшего применения в многокилограммовом масштабе. При определенных условиях, например, при использовании пиридина в качестве растворителя и основания, *t*BDMS-группа реагировала по положению первичного гидроксила с высокой селективностью по сравнению с положением 3'-вторичного гидроксила. Фосфорамидатная реакция использовала в качестве основания *N*-метилимидазол (NMI). В присутствии NMI силилирование было менее селективным. В предпочтительном случае количество NMI следовало уменьшить. Это можно было легко осуществить после фосфорамидатной реакции путем промывки реакционного раствора 1 *n.* соляной кислотой. NMI и остаточный исходный нуклеозид удаляли, оставляя необработанную смесь моно- и бис-замещенных продуктов и побочных продуктов реакции. Указанную смесь затем растворяли в пиридине и обрабатывали трет-бутилдиметилсилилхлоридом. 3'-монозамещенный продукт 5 в течение нескольких часов или меньшего времени превращали в 5'-О-*t*BDMS-3'-О-фосфорамидат 7. Ход реакции отслеживали с помощью ВЭЖХ. Полярность этого силилированного продукта 7 была меньше, чем полярность бис-фосфорамидата 6, и он легко удалялся с помощью хроматографии. Этот способ позволял снизить уровень 3'-монофосфорамидата 5 до величины менее 0,1% от уровня 5'-продукта 4 по сравнению с 1-3% без силилирования. Аналогичным образом, такое же влияние оказывала обработка диметокситрифенилметилхлоридом (DMT-Cl) при тех же условиях. Кроме того, этот способ обеспечивал упрощенную идентификацию продукта DMT-реакции с помощью ТСХ, поскольку DMT-содержащие молекулы при нагревании или воздействии кислоты приобретали светло-оранжевую окраску. Кроме того, можно предполагать возможность использования многих других блокирующих групп, как отмечено выше.

Как управление условиями реакции, так и очистка 3'-примесей являются общепринятыми способами и их можно использовать для большинства нуклеозидфосфорамидатов со свободным 3'-гидроксидом. Фосфорамидатная группа может представлять собой любую комбинацию эфира аминокислоты и ароматического спирта. Нуклеозидная группа может представлять собой любой нуклеозид, в котором 5'-фосфорамидат будет приводить к образованию 5'-монофосфата и впоследствии может быть метаболизирован в форму 5'-трифосфата.

Следующая схема представляет собой схему основной реакции, иллюстрирующую получение изо-пропил-*L*-аланатфенилфосфорамидата 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина с основным продуктом целевым 5'-О-фосфорамидатом (4, два диастереомера) и побочными продуктами - 3'-О-фосфорамидатом (5, два диастереомера) и 3',5'-бис-О-фосфорамидатом (6, четыре диастереомера). Реагенты вносили в стехиометрических соотношениях, как описано в способе в разделе получения. Реакцию проводили, пока количество исходного материала не снижалось до приблизительно 5%, согласно УФ-визуализации при тонкослойной хроматографии (ТСХ). Кроме того, СЭЖХ/МС определяла, что количество образованного 3',5'-бис-фосфорамидата 6 составляло приблизительно 10% по сравнению с целевым 5'-продуктом. После остановки реакции и обработки кислой водной средой неочищенный остаток из органического слоя подготавливали для силилирования. При желательных условиях реакции силильная группа, предпочтительно, реагировала со свободным 5'-гидроксидом 3'-О-фосфорамидата, образуя соединение 7. Реакцию продолжали, пока 3'-О-фосфорамидат не переставал обнаруживаться с помощью СЭЖХ/МС.



После проведения реакции силилирования целевой продукт подвергали хроматографии на силикагеле и элюировали градиентом метанола в дихлорметане (1-4%). Целевой 5'-монофосфорамидат 4 элюировался последним.

Способ получения

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

В 10-л колбу вносили 3',5'-О-добензоил-2'-дезоксидезокси-2'-фтор-2'-С-метил-N⁴-бензоилцитидин (500 г, 0,874 моль) и 70% водную уксусную кислоту (7,5 л). Раствор нагревали с обратным холодильником (110°C) в течение 20 ч. Полноту реакции отслеживали с помощью ТСХ (Rf 0,6 в 5% метаноле в дихлорметане (ДХМ)). Смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой (2 л). После перемешивания в течение 2 ч полученный осадок собирали фильтрованием, твердое вещество промывали водой (5 л) и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 12 ч, получая 360 г (88%). Этот интермедиат дибензоилуридина полностью использовали непосредственно на следующем этапе путем его внесения в свежеприготовленный метанольный аммиак (5,4 л, приблизительно 25%) при 0°C. Эту температуру поддерживали в течение 3 ч и затем позволяли нагреться до 15°C в течение 24 ч. Полноту реакции отслеживали с помощью ТСХ (Rf 0,4 в 10% метаноле в ДХМ). Реакционную смесь фильтровали через фильтрующую подушку из целита и концентрировали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт (216 г). Неочищенный продукт перемешивали с этилацетатом (325 мл) в течение 3 ч при комнатной температуре. Полученное твердое вещество собирали фильтрованием и промывали этилацетатом (216 мл). Твердое вещество высушивали в вакууме при комнатной температуре в течение 4 ч, получая 160 г (78%) целевого продукта с 98,7% чистотой согласно ВЭЖХ.

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) δ 11,44 (шс, 1H, NH), 7,95 (д, 1H, C-6H), 5,97 (д, 1H, C-1'H), 5,64 (д, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (м, 3H, C-5'-Ha, C-3'H, C-4'H), 3,63-3,60 (м, 1H, C5'-Hb), 1,23 (д, 3H, C-2'-CH₃). ES-MS M-1 259.

Пример 2. Получение изопропилового эфира (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-Диоксо-3,4-дигидро-2H-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]феноксифосфориламинопропионовой кислоты (4)

Синоним: Смесь диастереомеров 5'-О-(изопропил-L-аланатфенилфосфорамидил)-2'-дезоксидезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина.

5-л 3-горлую колбу оборудовали механической мешалкой, ледяной баней с концентрированным соевым раствором, внутренним термометром и атмосферой азота. В колбу загружали гидрохлорид сложного изопропилового эфира L-аланина (82,0 г, 0,490 моль) и безводный дихлорметан (0,80 л). В процессе

перемешивания этой смеси однократно вносили фенилдихлорфосфат (85,0 г, 0,40 моль) и перемешивали. Поддерживая температуру внутри колбы в диапазоне от -5 до 5°C, в течение получаса вносили раствор N-метилимидазола (NMI, 250 г, 3,07 моль) в дихлорметане (250 мл). Раствор оставляли перемешиваться в течение 1 ч при этом диапазоне температур. В один прием вносили 2'-дезоксидефтор-2'-С-метилуридин (3, 80,0 г, 0,307 моль) при 0°C и затем позволяли реакционной колбе медленно нагреться на бане с концентрированным солевым раствором. Спустя 1 ч температура внутри колбы возрастала до -2°C. ТСХ (5% Метанол в ДХМ) в момент времени 1 ч показала, что было израсходовано более 50% нуклеозида. Баню удаляли, реакционная колба нагревалась до комнатной температуры в течение следующего 1 ч. Спустя 3 и 5 ч ТСХ показала, что было израсходовано 95% исходного нуклеозида. Реакцию останавливали внесением метанола (100 мл) и перемешиванием реакционной смеси в течение 5 мин.

Реакционную смесь промывали 1 н. HCl (2×500 мл), а затем насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×500 мл). Отделенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия (50 г) и фильтровали. Раствор выпаривали при пониженном давлении, а затем при глубоком вакууме досуха, получая неочищенный продукт в виде вязкого масла (170 г). Выполняли ЯМР неочищенного продукта (³¹P и ¹H). ³¹P-ЯМР показал, что приблизительно 1% общего связанного фосфора был обусловлен присутствием 3'-изомера 5.

К неочищенному продукту добавляли безводный пиридин (1700 мл). Раствор выпаривали при пониженном давлении, а затем при глубоком вакууме с целью снижения содержания воды в неочищенной смеси путем совместного выпаривания. Полученное масло повторно растворяли в безводном пиридине (500 мл), а затем вносили избыток t-бутилдиметилсилилхлорида (9,0 г, 60 мМ). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Ход реакции отслеживали с помощью СЭЖХ/МС. Спустя 3 ч 3'-примесь 5 более не обнаруживалась, и реакцию останавливали внесением метанола (50 мл).

Реакционную смесь выпаривали при пониженном давлении до состояния масла. Остаток растворяли в этилацетате (1,5 л) и промывали 1 н. HCl (2×500 мл), а затем насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×500 мл). Органический слой высушивали безводным сульфатом натрия (50 г), фильтровали и выпаривали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт в виде бледно-желтого масла.

Неочищенное масло разбавляли равным объемом дихлорметана и помещали на 2,5 Kg картридж с силикагелем в модуле центробежного компрессора при давлении воздуха 100 фунтов на квадратный дюйм (psi). Используя градиентный насос при 60 psi и скорость потока 400 мл/мин, картридж промывали метиленхлоридом (4 л), а затем градиентом 1-4% метанола в метиленхлориде (48 л). Большую часть основных примесей (ди-(изопропилаланил)фенилфосфата, 3',5'-бис-фосфорамидата (6), аддукта 3'-фосфорамидат-5'-TBDMS (7)) элюировали -3% градиентом. Целевой продукт элюировался между 3 и 4% метанола. Фракции, содержавшие продукт, сортировали на две партии. Первая содержала небольшое количество верхних примесей, а последняя представляла собой чистый продукт. Первый набор фракций содержал небольшое количество менее полярных примесей (верхних примесей), например 3',5'-бис-фосфорамидата и диаланилфенилфосфата, и главным образом - диастереомер R_p, и требовал очистки на второй колонке. (Относительная терминология "верхний - нижний" относится к элюированию при нормально-фазовой хроматографии на силикагеле, причем "верхний изомер" означает первый элюирующийся изомер). Второй набор фракций не содержал значительного количества примесей - только оставшийся диастереомер R_p, и главным образом - диастереомер S_p. Затем его рекомбинировали с фракциями после двойной колоночной очистки. Растворитель выпаривали при пониженном давлении, полученную белую пену высушивали (0,20 мм рт.ст.) в течение 1 ч, получая 42 г загрязненной партии (соотношение верхнего и нижнего изомера 4:1 согласно ³¹P-ЯМР) и 38 г чистой партии (соотношение верхнего и нижнего изомера 1:3). Загрязненную партию повторно пропускали через колонку аналогичным образом, получая 3,8 г верхнего изомера, чистого на 97% (отдельная фракция) и 36 г чистого продукта в соотношении 4:1. Две основные партии растворяли в ДХМ, объединяли, выпаривали при пониженном давлении и высушивали (50°C, 0,2 мм рт.ст., 24 ч), получая 74 г (45,7%) чистого продукта 4 с соотношением диастереомеров 48:51 в виде белой пены с температурой плавления приблизительно 75-85°C.

Для получения аморфного твердого вещества смеси диастереомеров 74 г белой пены перемешивали с t-бутилметиловым эфиром (750 мл), что приводило к частичному растворению и образованию клейкого твердого остатка. При перемешивании медленно вносили гептан (750 мл) и механически перемешивали суспензию в течение 1 ч до превращения клейкой массы в белое твердое вещество. Твердое вещество соскребали шпателем и фильтровали полученную суспензию. Твердое вещество промывали гептаном (4×50 мл) и высушивали в вакууме (50°C, 0,2 мм рт.ст., 24 ч), получая белый аморфный порошок (64 г) с широким диапазоном плавления, приблизительно равным 70-80°C. ¹H и ³¹P ЯМР соответствовали структуре; ВЭЖХ определяла степень чистоты 99,8% при соотношении диастереомеров 46:54 (также подтвержденным ³¹P ЯМР).

Альтернативный способ получения твердой смеси 4. После хроматографии остаток дважды совместно выпаривали с дихлорметаном (5 мл/г) и высушивали в течение 24 ч при 35-40°C и 35-45 мторр. Остаток пены просеивали через сетку с размером ячейки 250 мкм, а затем высушивали при тех же условиях, пока содержание остаточного дихлорметана не снижалось до величины менее 400 м.д., согласно ГХ в

паровой фазе. Полученный аморфный порошок с цветом от грязно-белого до белого характеризовался температурным интервалом стеклования от 53,7 до 63,5°C.

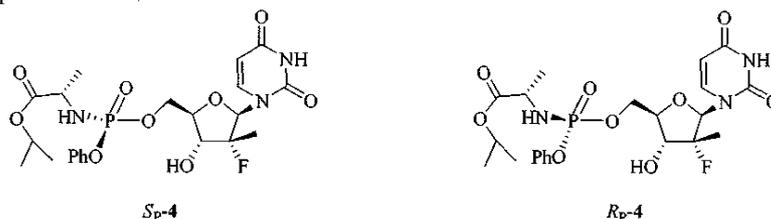
Оценка характеристик смеси изомеров (4) : ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 10,05 (шс, 1H, NH, S_P), 10,00 (шс, 1H, NH, R_P), 7,49 (д, 1H, C6-H, S_P), 7,36 (м, 5H, C6-H, R_P , ароматический), 7,23-7,14 (м, 6H, R_P/SP , ароматический), 6,18 (шд, 2H, C1'-H, R_P/SP), 5,63 (д, 1H, C5-H, S_P), 5,58 (д, 1H, C5-H, R_P), 5,01 (м, 2H, CH-(CH₃)₂, R_P/SP), 4,46-4,33 (м, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, R_P/SP), 4,12 (м, 2H, ala-CH-CH₃, R_P/SP), 4,01-3,85 (м, 4H, C3'-H, C4'-H, R_P/SP), 1,39-1,22 (м, 12H, все CH₃, R_P/SP).

^{31}P -ЯМР (CDCl_3) δ 3,60 (R_P), 3,20 S_P относительно трифенилфосфата при -17,80 м.д. ES-MS M+1530,2. Элементный анализ: Рассчитанный % (включая 0,29% воды согласно анализу Карла Фишера) С, 49,75; Н, 5,54; N, 7,90, F, 3,58, P, 5,84. Обнаруженный %: С, 49,50; Н, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Обсуждение разделения изомеров

Соединение 4 вследствие хиральности фосфора включало два диастереомера, обозначенные как S_P -4 и R_P -4. Оценку стереохимических свойств выполняли на основе монокристалльного рентгеноструктурного анализа S_P -4. Как R_P -4, так и S_P -4 давали кристаллический продукт.

Процедуры кристаллизации описаны ниже.



Пример 3. Кристаллизация изомера R_P -4.

Хроматографическую фракцию, содержащую элюирующийся первый менее полярный изомер R_P -4 (3,8 г, 97% чистоты) растворяли в изопропанол (36 г) и разбавляли гептаном до непрозрачности (72 г). В раствор вносили затравку и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Полученное твердое вещество собирали вакуумной фильтрацией, промывали гептаном (2×20 мл) и высушивали (50°C, 0,2 мм, 24 ч), получая 2,3 г очень мелких белых игловидных кристаллов с температурой плавления 136,2-137,8°C. Чистота полученного материала согласно ВЭЖХ составляла 99,02%.

R_P -4: ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 9,10 (шс, 1H, NH), 7,36 (м, 2H, о-ароматический), 7,26-7,16 (м, 4H, C6-H, м,р-ароматический), 6,16 (шд, 1H, C1'-H), 5,58 (д, 1H, C5-H), 5,01 (септ, 1H, CH-(CH₃)₂), 4,52-4,47 (м, 2H, C-5'-H₂), 4,10 (д, 1H, C3'-H), 4,02-3,76 (м, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 1,37-1,20 (м, 12H, все CH₃).

Пример 4. Получение и кристаллизация S_P -4.

Способ 1: Прямое осаждение из неочищенного соединения 4:

В перемешиваемый раствор гидрохлорида изопропилового эфира L-аланина (10,5 г, 61,5 ммоль, двукратно азеотропно высушенного с 50 мл толуола каждый раз) в дихлорметане (100 мл) вносили фенилдихлорфосфат (7,5 мл, 50 ммоль) при комнатной температуре. Смесь охлаждали до -10°C и затем вносили раствор NMI (30,5 мл, 384,3 ммоль) в 30 мл дихлорметана в течение 30 мин. После завершения внесения смесь перемешивали при температуре между -10 и -15°C в течение 1 ч. В вышеупомянутую смесь в один прием вносили 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метилуридин (3) (10 г, 38,4 ммоль), перемешивали смесь при температуре ниже -10°C в течение 3 ч и позволяли медленно нагреться до 20°C (6 ч). Смесь перемешивали при этой температуре в течение ночи (15 ч) и затем останавливали реакцию 10 мл метанола. Растворитель выпаривали, а остаток повторно растворяли в EtOAc (200 мл). Слой EtOAc промывали водой (100 мл), 1 н. HCl (3×75 мл), 2% водным раствором NaHCO₃ (50 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток высушивали в глубоком вакууме в течение 2 ч, получая белую пену (22 г).

Вышеупомянутую пену растворяли в 33 мл ДХМ, а затем вносили 65 мл ИРЕ (изопропилового эфира), получая насыщенный раствор. Раствор фильтровали через небольшую фильтрующую подушку из целита, фильтрат перемешивали с затравкой S_P -4 в течение 72 ч при комнатной температуре (приблизительно 22°C - отметим, что охлаждение суспензии до 0°C приводило к превращению неочищенного продукта в масло). Белое твердое вещество фильтровали, промывали ИРЕ (20 мл) и высушивали, получая 4,58 г (~85:15 смесь S_P -4: R_P -4, соответственно, согласно ^{31}P ЯМР) белого порошка. Вышеупомянутое твердое вещество суспендировали в 23 мл ДХМ и затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Раствор охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 ч. Белое твердое вещество фильтровали, промывали 4,5 мл холодного ДХМ и высушивали в глубоком вакууме при 45°C, получая чистый S_P -4 с температурой плавления 93,9-104,7°C, 99,74% чистоты согласно ВЭЖХ (3,11 г, 15,2% от количества уридинового нуклеозида).

S_P -4 ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 8,63 (шс, 1H, NH), 7,47 (д, 1H, C6-H), 7,30 (м, 2H, о-ароматический), 7,26-7,18 (м, 3H, м,р-ароматический), 6,18 (шд, 1H, C1'-H), 5,70 (д, 1H, C5-H), 5,02 (септ, CH-(CH₃)₂), 4,53 (м, 2H, C-5'-H₂), 4,11 (д, 1H, C3'-H), 3,97 (м, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 3,77 (шс, 1H, ala-NH), 1,39 (д,

3H, C2'-CH₃), 1,37 (д, 3H, ala-CH₃), 1,24 (д, 6H, CH-(CH₃)₂).

Способ 2: Получение масла из неочищенного соединения 4

В перемешиваемый раствор гидрохлорида изопропилового эфира L-аланина (20,6 г, 123 ммоль, двукратно азеотропно высушенного с 75 мл толуола каждый раз) в дихлорметане (200 мл) вносили фенилдихлорфосфат (14,9 мл, 100 ммоль) при комнатной температуре. Смесь охлаждали до -10°C и затем вносили раствор NMI (61,3 мл, 769 ммоль) в 60 мл дихлорметана в течение 30 мин. После завершения внесения смесь перемешивали при температуре между -10 и -15°C в течение 1 ч. В вышеупомянутую смесь в один прием вносили 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метилуридин (3) (20 г, 76,9 ммоль), перемешивали смесь при температуре ниже -10°C в течение 3 ч и позволяли медленно нагреться до 20°C (6 ч). Смесь перемешивали при этой температуре в течение ночи (15 ч) и затем останавливали реакцию 10 мл метанола. Растворитель выпаривали, а остаток повторно растворяли в EtOAc (400 мл). Слой EtOAc промывали водой (200 мл), 1 н. HCl (3×100 мл), 2% водным раствором NaHCO₃ (100 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток высушивали в глубоком вакууме в течение 2 ч, получая белую пену (43 г). Вышеупомянутую пену растворяли в 86 мл EtOAc в двугорлой круглодонной колбе, оборудованной механической мешалкой. При перемешивании медленно вносили 100 мл гептана и перемешивали суспензию в течение 1 ч. Верхний слой декантировали и остаток повторно перемешивали с 50 мл растворов EtOAc/гептан в соотношении 2:3 в течение 10 мин, а затем декантировали. Остаток высушивали в глубоком вакууме, получая белую пену (31 г).

Вышеупомянутую пену растворяли в 46 мл ДХМ, а затем вносили 95 мл IPE, получая насыщенный раствор. Раствор фильтровали через небольшую фильтрующую подушку из целита, фильтрат перемешивали с затравкой S_p-4 в течение 72 ч при комнатной температуре. Белое твердое вещество фильтровали, промывали IPE (30 мл) и высушивали, получая 7,33 г (~85:15 смесь S_p-4:R_p-4, соответственно, согласно ³¹P ЯМР) белого порошка. Вышеупомянутое твердое вещество суспендировали в 36 мл ДХМ и затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Раствор охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 ч. Белое твердое вещество фильтровали, промывали 7,5 мл холодного ДХМ и высушивали в глубоком вакууме при 45°C, получая >99% чистый S_p-4 (4,78 г, 11,6% от количества уридинового нуклеозида).

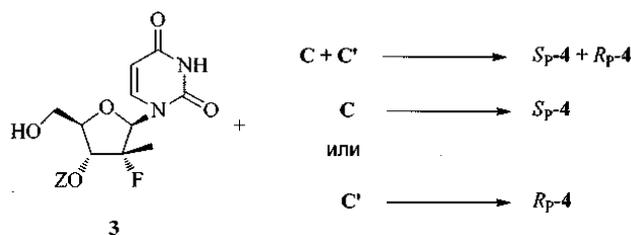
Способ 3: Загрузка неочищенного соединения 4 силикагелем

5,0 г неочищенного соединения 4 получали аналогично смеси диастереомеров до начала этапа колоночной хроматографии с использованием приблизительно 2,5 г 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина (3). Неочищенное соединение растворяли в 10 мл ДХМ и в раствор вносили 10 г силикагеля. Растворитель выпаривали, получая сухую пасту. Пасту перемешивали с 40 мл 50% EtOAc/гексан в течение 15 мин, а затем фильтровали. Силикагель промывали дополнительными 10 мл 50% EtOAc/гексан. Затем силикагель промывали 15% MeOH/ДХМ (100 мл) и собирали отдельно. Растворитель выпаривали и высушивали в глубоком вакууме, получая 4,0 г остатка (пены). Остаток растворяли в ДХМ (6 мл), а затем вносили ~9 мл IPE, получая насыщенный раствор. Затем смесь аккуратно перемешивали в течение ночи с затравкой S_p-4 при комнатной температуре. Белое твердое вещество отфильтровывали и промывали IPE (5 мл), получая 1,28 г продукта. ³¹P ЯМР выявил, что вышеупомянутый продукт содержал 77:23 смесь S_p-4:R_p-4 соответственно. Продукт перекристаллизовывали из 20 мл ДХМ, получая 0,75 г >99% чистого S_p-4 (приблизительно 12% от количества уридинового нуклеозида). Получение S_p-4 не требовало этапа силилирования, как для смеси, поэтому выше показана полная реакционная процедура. Аспекты одиночной кристаллической и полиморфной форм S_p-4 представлены ниже.

Способ 4:

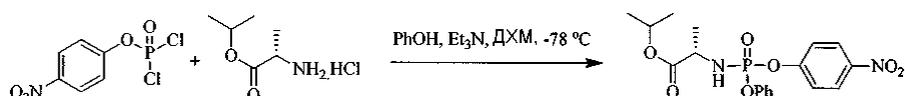
40,0 г 1:1 смеси 4 растворяли в 90 мл дихлорметана. В вышеупомянутый раствор вносили диизопропиловый эфир (70 мл), получая насыщенный раствор. (Количество диизопропилового эфира может меняться в зависимости от чистоты продукта). В раствор вносили затравку чистого S_p-4 (>99%), смесь аккуратно перемешивали магнитной мешалкой при комнатной температуре в течение 20 ч (образование твердого вещества наблюдали после 2 ч). Твердое вещество фильтровали, промывали 40 мл смеси диизопропилового эфира/дихлорметана (1:1) и высушивали, получая белое твердое вещество (16,6 г, 89,35% чистый S_p-4 согласно ЯМР). Это твердое вещество суспендировали в 83 мл ДХМ и кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Суспензию охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Твердое вещество отфильтровывали и промывали 10 мл холодного ДХМ. Твердое вещество высушивали в вакууме, получая S_p-4 (13,1 г, 99,48% чистоты согласно ВЭЖХ). 11 г этого твердого вещества повторно растворяли в 330 мл ДХМ в условиях нагревания. Раствор охлаждали до комнатной температуры и оставляли при этой температуре в течение ночи. Кристаллический продукт отфильтровывали и высушивали, получая 10,5 г S_p-4 (99,74% чистоты согласно ВЭЖХ).

Соединения S_p-4 и R_p-4 можно получить альтернативным путем согласно девятому и десятому вариантам воплощения путем реакции нуклеозида (защищенного или незащищенного) 3 с изопропилаланилфосфорамидатом (смесью C и C', C или C'), как показано в следующем уравнении.



В P.D. Howes et al. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2003, vol. 22, Nos. 5-8, pp. 687-689 ("Howes") описаны 2'- и 5'-фосфорамидаты, полученные реакцией с *t*-бутилмагнийхлоридом. В этом источнике Howes описал, что при реакции 3'-дезокситидинового нуклеозида с метиловым эфиром (S)-2-[хлорфеноксифосфориламино]пропионой кислоты в присутствии 1,2 эквивалентов *t*-бутилмагнийхлорида происходило селективное фосфорилирование по 2'-положению, однако в присутствии дополнительного эквивалента *t*-бутилмагнийхлорида происходило селективное фосфорилирование по 5'-положению. Это описание следует сопоставить с данными, описанными в Схеме 1 Howes.

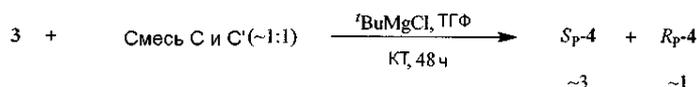
Пример 5-1. Получение изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионой кислоты



В перемешиваемый раствор 4-нитрофенилфосфордихлорида (12,8 г, 50 ммоль) в дихлорметане (100 мл) вносили раствор фенола и триэтиламина (7,7 мл, 55 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при -78°C в течение 20 мин. Смесь перемешивали при этой температуре в течение 30 мин, а затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид изопропилового эфира L-аланина (8,38 г, 50 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при 0°C . В смесь вносили вторую порцию триэтиламина (14,6 мл, 105 ммоль) в течение 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, а затем выпаривали растворитель. Остаток гомогенизировали с этилацетатом (150 мл) и отфильтровывали белое твердое вещество. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтое масло. Неочищенное соединение хроматографировали, используя 0-20% градиент этилацетата/гексана, получая продукт (17 г, 83% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1.

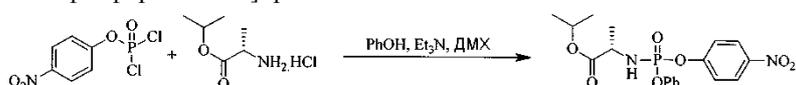
^{31}P ЯМР (162 МГц, DMCO-d_6): δ -0,31, -0,47; ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6): δ 8,31-8,27 (м, 2H), 7,51-7,37 (м, 4H), 7,27-7,19 (м, 3H), 6,70-6,63 (м, 1H), 4,85-4,78 (м, 1H), 3,97-3,86 (м, 1H), 1,21-1,19 (м, 3H), 1,11-1,09 (м, 6H); MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$; ^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -2,05, -2,10; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,22 (д, $J=9,2$ Гц, 2H), 7,41-7,33 (м, 4H), 7,26-7,18 (м, 3H), 5,05-4,96 (м, 1H), 4,14-4,05 (м, 1H), 3,93-3,88 (м, 1H), 1,38 (д, $J=6,8$ Гц, 3H), 1,22 (дд, $J=6,2$ и 3,0 Гц, 6H); MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$.

Пример 5-2. Получение S_p -4/ R_p -4.



В перемешиваемый раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (130 мг, 0,5 ммоль) в безводном ТГФ (1,5 мл) вносили 1,0 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (1,05 мл, 1,05 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение 5 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионой кислоты (смесь изомеров 1:1, 408 мг, 1 ммоль) в ТГФ (1,5 мл) в течение 5 мин. Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 48 ч и останавливали реакцию насыщенным водным NH_4Cl (20 мл). Смесь фракционировали между этилацетатом (50 мл) и водой (20 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтый остаток. Колоночная хроматография остатка с помощью 0-2% градиента MeOH /дихлорметана позволяла получить белое пенистое твердое вещество (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)феноксифосфориламино]пропионой кислоты



Гидрохлорид изопропилового эфира L-аланина (330 г, 1,97 моль) предварительно высушивали путем совместного выпаривания с толуолом (2×400 мл) при пониженном давлении, а затем высушивали в вакуумной печи (50°C , 0,2 мм рт.ст., 17 ч). В перемешиваемый раствор 4-нитрофенилфосфордихлорида (500,0 г, 1,953 моль) в безводном дихлорметане (3,0 л) вносили раствор фенола (183,8 г, 1,953 моль) и

триэтиламина (300 мл, 2,15 моль) в дихлорметане (900 мл) при внутренней температуре -60°C в течение 3 ч. Смесь перемешивали при этой температуре в течение следующих 30 мин и затем позволяли нагреться до -5°C в течение 2,5 ч. Предварительно высушенный эфир аминокислоты вносили при $-5-0^{\circ}\text{C}$ в атмосфере азота в течение 10 мин. Остаток соли аминоэфира в колбе добавления переносили в реакционную смесь путем промывки дихлорметаном (2×100 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 40 мин и вносили вторую порцию триэтиламина (571 мл, 4,10 моль) в течение 40 мин при 0°C . Смесь перемешивали при $0-10^{\circ}\text{C}$ в течение 3 ч, а затем отфильтровывали белое твердое вещество (гидрохлорид триэтиламина) и промывали его дихлорметаном (3×300 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и гомогенизировали остаток с метил-*t*-бутиловым эфиром (МТВЕ, 4 л). Образовавшуюся при этом дополнительную твердую соль отфильтровывали и промывали МТВЕ (3×150 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая прозрачное светло-коричневое масло. Остаток совместно выпаривали с гексаном (2×140 мл) с целью удаления остаточного МТВЕ, а затем высушивали в вакууме при 40°C в течение 2 ч. Сухой остаток смешивали с диизопропиловым эфиром (ИРЕ, 1,1 л) и перемешивали при 5°C на водно-ледяной бане. В раствор вносили небольшое количество кристаллической заправки целевого S_p -изомера продукта и перемешивали смесь при 5°C в течение 22 ч, образуя суспензию средней густоты. Суспензию оставляли в морозильной камере (-10°C) в течение 44 ч. Осажденный продукт собирали фильтрацией и промывали предварительно охлажденными смешанными растворителями ИРЕ и гексаном (1:1, $\times 190$ мл). Твердое вещество высушивали в вакууме (0,5 мм рт.ст.) при комнатной температуре до постоянной массы, получая 227,23 г (выход: 28,5%) белого твердого порошка. Соотношение двух диастереомеров S_p : R_p составляло 9,65/1 согласно ^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6 , δ -0,31 (S_p), -0,47). Продукт перекристаллизовывали растворением в ИРЕ (840 мл) при нагревании на бане при 60°C . Вышеупомянутый раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем вносили небольшое количество заправки кристаллического S_p -изомера. В течение 2 ч образовывался белый твердый порошок; затем колбу хранили в морозильной камере (-10°C) в течение 16 ч. Полученное белое тонкодисперсное кристаллическое твердое вещество отфильтровывали, промывали предварительно охлажденным ИРЕ (3×50 мл) и высушивали в вакууме (комнатная температура, 0,5 мм рт.ст.) до постоянной массы, получая белое рыхлое твердое вещество (177,7 г, 22% общий выход или 44% общий выход на основе теоретического выхода S_p -изомера) с соотношением диастереомеров 48/1 согласно ^{31}P -ЯМР. Температура плавления $62-66^{\circ}\text{C}$.

^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6): δ -0,31; ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,30-8,27 (м, 2H), 7,49 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,41-7,37 (м, 2H), 7,23-7,19 (м, 3H), 6,66 (дд, $J=13,6$, 10,0 Гц, 1H), 4,86-4,78 (м, 1H), 3,97-3,86 (м, 1H), 1,19 (д, $J=7,2$ Гц, 3H), 1,10 (д, $J=6,4$ Гц, 6H);

^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -2,05; (162 МГц, ДМСО- d_6): δ -0,31; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,22 (д, $J=9,2$ Гц, 2H), 7,41-7,33 (м, 4H), 7,26-7,18 (м, 3H), 5,05-4,96 (м, 1H), 4,14-4,05 (м, 1H), 3,93-3,88 (м, 1H), 1,38 (д, $J=6$, 8 Гц, 3H), 1,22 (дд, $J=6,2$ и 3,0 Гц, 6H); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,30-8,27 (м, 2H), 7,49 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,41-7,37 (м, 2H), 7,23-7,19 (м, 3H), 6,66 (дд, $J=13,6$, 10,0 Гц, 1H), 4,86-4,78 (м, 1H), 3,97-3,86 (м, 1H), 1,19 (д, $J=7,2$ Гц, 3H), 1,10 (д, $J=6,4$ Гц, 6H);

MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$.

Стереохимию соединения 8 (S_p -изомера) подтверждали монокристаллической рентгеновской кристаллографией, подробности см. ниже.

Пример 7. Разделение смеси диастереомеров изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)-феноксифосфориламино]пропионовой кислоты с помощью сверхкритической жидкостной хроматографии

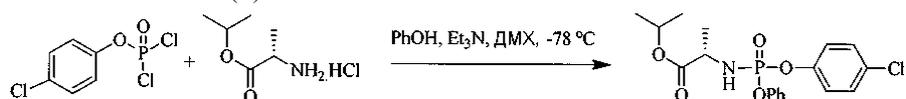
Образец смеси диастереомеров (4,8 г), обогащенный R_p -изомером, подвергали сверхкритической жидкостной хроматографии (SFC), используя колонку ChiralPak AD-H (2×15 см) и элюировали 35% изопропанолом в диоксиде углерода при 100 бар. Использовали инъекционную загрузку 4 мл образца в концентрации 17 мг/мл метанола. R_p -изомер изопропилового эфира [(S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)-феноксифосфориламино]пропионовой кислоты элюировался первым. Соответствующие фракции множественных прогонов объединяли и концентрировали при пониженном давлении, получая 2,9 г R_p -изомера изопропилового эфира (S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты в виде светло-желтого вязкого масла и 1,9 г S_p -изомера изопропилового эфира [(S)-2-[(R)-(S)-(4-нитрофенокси)-феноксифосфориламино]пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества. Аналитические данные R_p -изомера были аналогичны данным продукта, выделенного с помощью вышеописанного способа кристаллизации.

Аналитические данные изопропилового эфира (S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, R_p -изомер).

^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6): δ -0,47;

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,30-8,27 (м, 2H), 7,46-7,38 (м, 4H), 7,27-7,20 (м, 3H), 6,68 (дд, $J=13,8$, 10,2 Гц, 1H), 4,86-4,77 (м, 1H), 3,97-3,86 (м, 1H), 1,20 (д, $J=7,2$ Гц, 3H), 1,10 (дд, $J=6,2$, 2,2 Гц, 6H); MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$.

Пример 8-1. Получение рацемического изопропилового эфира 2-[(4-хлорфенокси)феноксифосфорилиамино]пропионовой кислоты (\pm)



В перемешиваемый раствор 4-хлорфенилфосфордихлоридата (2,45 г, 10,0 ммоль) в дихлорметане (20 мл) вносили раствор фенола (0,94 г, 10 ммоль) и триэтиламина (1,56 мл, 11 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при -78°C в течение 20 мин. Смесь перемешивали при этой температуре в течение 30 мин, а затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид изопропилового эфира L-аланина (1,67 г, 10 ммоль) в дихлорметане (50 мл) при 0°C . В смесь вносили вторую порцию триэтиламина (2,92 мл, 21 ммоль) в течение 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, а затем выпаривали растворитель. Остаток гомогенизировали с этилацетатом (30 мл) и отфильтровывали белое твердое вещество. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтое масло. Неочищенное соединение хроматографировали, используя 10-20% градиент этилацетата/гексана, получая продукт (2,0 г, 50% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1.

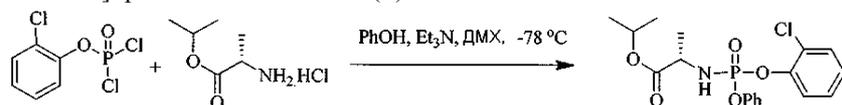
^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -1,58, -1,62; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,06-7,51 (м, 8H), 7,15-7,28 (м, 2H), 7,29-7,47 (м, 2H), 4,0-4,10 (м, 1H), 3,82-3,88 (м, 3H), 1,35-1,36 (дд, 6H); 1,19-1,22 (м, 3H). MS (ESI) m/z 398 (M-1) $^+$.

Полученный продукт очищали экстракцией, кристаллизацией или хроматографией, 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(феноксифосфорилиамин)пропаноата (4).

В перемешиваемый 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 безводном ТГФ (50 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение 15 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор рацемического сложного изопропилового эфира 2-[(4-хлорфенокси)феноксифосфорилиамино]пропионовой кислоты (4,08 г, 10 ммоль) в ТГФ (15 мл) в течение 10 мин. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 72 ч. ТСХ с эталонным продуктом показала, что образовывалось приблизительно 5% целевого продукта по сравнению с исходным нуклеозидом.

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



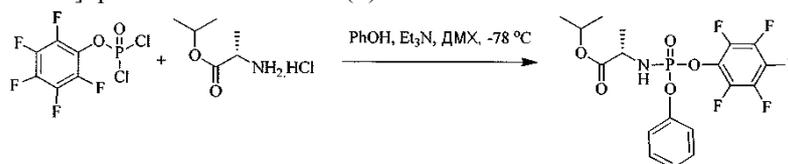
В перемешиваемый раствор 2-хлорфенилфосфордихлоридата (9,8 г, 40 ммоль) в дихлорметане (80 мл) вносили раствор фенола (3,76 г, 40 ммоль) и триэтиламина (6,16 мл, 44 ммоль) в дихлорметане (80 мл) при -78°C в течение 20 мин. Смесь перемешивали при этой температуре в течение 30 мин, а затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид изопропилового эфира L-аланина (6,7 г, 40 ммоль) в дихлорметане (150 мл) при 0°C . В смесь вносили вторую порцию триэтиламина (11,6 мл, 84 ммоль) в течение 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, а затем выпаривали растворитель. Остаток гомогенизировали с этилацетатом (100 мл) и отфильтровывали белое твердое вещество. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтое масло. Неочищенное соединение хроматографировали, используя 10-20% градиент этилацетата/гексана, получая продукт (11,3 г, 72% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1.

^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -1,58, -1,61; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,06-7,51 (м, 8H), 5,02-5,94 (м, 1H), 4,10-4,16 (м, 1H), 3,31-3,94 (м, 1H), 1,18-1,35 (м, 3H), 1,38-1,40 (дд, 6H); MS (ESI) m/z 398 (M-1) $^+$. Полученный продукт очищали экстракцией, кристаллизацией или хроматографией, как отмечено выше.

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

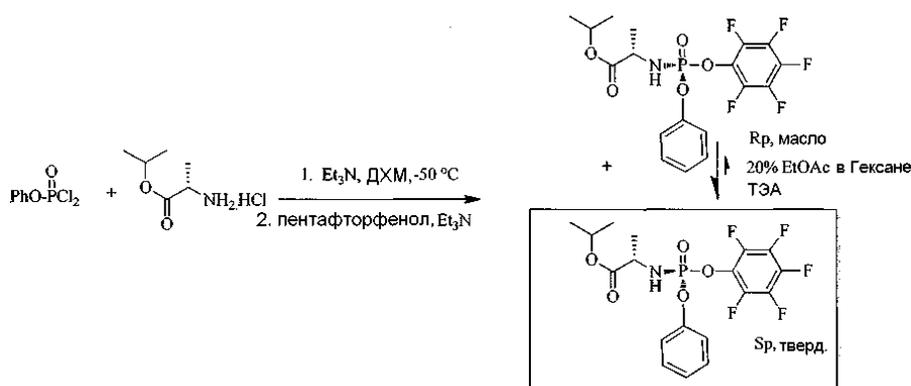
В перемешиваемый раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1H-пиримидин-2,4-диона (3, 2,6 г, 10 ммоль) в безводном ТГФ (50 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение 15 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира 2-[(2-хлорфенокси)-феноксифосфорилиамино]пропионовой кислоты (рацемический, 4,08 мг, 10 ммоль) в ТГФ (15 мл) в течение 10 мин. Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 72 ч. ТСХ с эталонным продуктом показала, что образовывалось приблизительно 5-10% целевого продукта по сравнению с исходным нуклеозидом.

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



В перемешиваемый раствор пентафторфенилфосфордихлоридата (6,0 г, 20 ммоль) в дихлорметане (40 мл) вносили раствор фенола и триэтиламина (3,08 мл, 22 ммоль) в дихлорметане (40 мл) при -78°C в течение 20 мин. Смесь перемешивали при этой температуре в течение 30 мин, а затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид изопропилового эфира L-аланина (3,35 г, 20 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при 0°C . В смесь вносили вторую порцию триэтиламина (5,84 мл, 42 ммоль) в течение 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, а затем выпаривали растворитель. Остаток гомогенизировали с этилацетатом (60 мл) и отфильтровывали белое твердое вещество. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтое масло в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1. ^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -0,49, -0,58. Полученный продукт очищали экстракцией, кристаллизацией или хроматографией, как отмечено выше.

Пример 10-2. Получение смеси диастереомеров изопропилового эфира (S)-2-[(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты и выделение одиночного диастереомера изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты с помощью многопроходного динамического разделения, вызванного кристаллизацией.



В 2-л трехгорлую круглодонную колбу, оснащенную механической мешалкой и низкотемпературным термометром, вносили 60 г (284 ммоль) фенилдихлорфосфата и 300 мл безводного дихлорметана. Раствор охлаждали до 0°C в атмосфере азота и быстро вносили соль гидрохлорида изопропилаланина (высушенного в вакуумной печи, 47,7 г, 284 ммоль) в виде твердого вещества. Смесь перемешивали и охлаждали до -55°C на бане с ацетоном и сухим льдом. Через капельную воронку вносили раствор 60,32 г триэтиламина (596 ммоль) в 300 мл дихлорметана в течение 70 мин. Белую непрозрачную смесь перемешивали при -55°C в течение получаса, а затем медленно повышали температуру до -5°C в течение 1,5 ч. В смесь через капельную воронку вносили предварительно охлажденную (до комнатной температуры) смесь пентафторфенола (52,42 г, 284 ммоль) и триэтиламина (32,11 г, 317 ммоль) в 180 мл дихлорметана в течение 1 ч при 0°C , полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 4 ч. Белый осадок (ТЭА.HCl) отфильтровывали и промывали дихлорметаном (3×50 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и гомогенизировали белый твердый остаток с 880 мл t-бутилметилового эфира (ТВМЕ) при комнатной температуре в течение часа. Белую суспензию фильтровали и промывали твердое вещество ТВМЕ (3×150 мл). Твердое вещество распределяли в смеси этилацетата (600 мл) и воды (150 мл). Органический слой отделяли и промывали водой (3×100 мл). Органический слой высушивали над MgSO_4 и концентрировали, получая 29,92 г (66 ммоль) продукта (Sp-изомер, подтверждено рентгеновской кристаллографией, ниже) в виде белого легкого твердого вещества.

Фильтрат вышеупомянутого гомогенизата с ТВМЕ концентрировали при пониженном давлении до белого твердого остатка и гомогенизировали твердое вещество с 450 мл смеси этилацетата и гексана (20:80 об/об) при комнатной температуре в течение 75 мин. Твердое вещество (твердое вещество 1) собирали фильтрованием и промывали 20% этилацетатом в гексане (75 мл, 2×30 мл). Маточный раствор концентрировали до образования грязно-белого твердого вещества, которое затем гомогенизировали с 20% этилацетатом в гексане (185 мл) при комнатной температуре в течение 17 ч. Белое твердое вещество (твердое вещество 2) собирали фильтрованием и промывали 20% этилацетатом в гексане (2×10 мл). Твердое вещество 1 и твердое вещество 2 объединяли и растворяли в 1,2 л этилацетата. Раствор промывали

вали водой (3×150 мл), насыщенным раствором NaCl (50 мл) и высушивали над MgSO₄. Раствор концентрировали при пониженном давлении, получая 72,8 г (161 ммоль) чистого продукта. Общее количество продукта составило 102,72 г (226 ммоль, 80%). ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ: 7,38-7,33 (м, 2H), 7,27-7,24 (м, 2H), 7,23-7,19 (м, 1H), 5,04 (гепт, 1H), 4,18-4,09 (м, 1H), 4,01-3,96 (м, 1H), 1,45 (д, 3H), 1,25 (дд, 6H). ³¹P ЯМР (CDCl₃, 162 МГц) δ: -0,50.

Пример 10-3: Получение смеси диастереомеров изопропилового эфира (S)-2-[(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифеноксифосфориламино)пропионовой кислоты и выделение одиночного диастереомера изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифеноксифосфориламино)пропионовой кислоты с помощью однопроходного динамического разделения, вызванного кристаллизацией.

В 1-л сухую трехгорлую колбу, оборудованную низкотемпературным термометром и механической мешалкой, загружали фенилфосфордихлоридат (25 г, 118,5 ммоль). Вносили безводный дихлорметан (125 мл) и охлаждали раствор до 0°C. При встряхивании в атмосфере N₂ быстро вносили соль эфира аланина (высушенную в печи) (19,86 г, 1 экв.). Раствор охлаждали приблизительно до -50°C (внутренняя температура (в бане с ацетоном/сухим льдом в атмосфере N₂)). Через капельную воронку по каплям при -50°C вносили раствор триэтиламина (25,2 г, 2,1 экв.) в ДХМ (125 мл) в течение 0,5 ч; полученную белую суспензию перемешивали приблизительно при -50°C в течение 0,5 ч. Смеси позволяли нагреться до 0°C в течение 1,5 ч, а затем через капельную воронку вносили предварительно смешанный охлажденный раствор пентафторфенола (21,82 г, 1 экв.) и ТЭА (13,2 г, 1,1 экв.) (внимание: выделение тепла при смешивании пентафторфенола и ТЭА) в 75 мл ДХМ в течение 0,5 ч при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение следующих 4 ч.

Смесь фильтровали через воронку Бюхнера, собранный твердый гидрохлорид триэтиламина промывали ДХМ (3×40 мл). Фильтрат проверяли с помощью ³¹P-ЯМР (соотношение приблизительно 1,14:1 в пользу S_P-диастереомера - сдвиг пика в сторону слабого поля) и делили на две части равной массы. Одну из них концентрировали при пониженном давлении. Белый твердый остаток (31 г) гомогенизировали в смеси EtOAc и гексана (150 мл, 20:80, об/об) при кт в течение 17 ч, давая время для динамического разделения менее растворимого S_P-изомера. Белую суспензию фильтровали и промывали твердое вещество 20% EtOAc в гексане (2×25 мл). Твердое вещество (22,58 г) проверяли с помощью ¹H-ЯМР и ³¹P-ЯМР; оно содержало продукт в виде одного изомера, загрязненного солью гидрохлорида триэтиламина. Твердое вещество растворяли и фракционировали в 310 мл EtOAc и 100 мл воды. После отделения органического слоя водный слой подвергали обратной экстракции EtOAc (50 мл). Объединенный органический слой промывали водой (3×80 мл), насыщенным раствором NaCl (50 мл) и высушивали над MgSO₄. Раствор концентрировали при пониженном давлении, а затем высушивали в глубоком вакууме при кт до постоянной массы, получая 17,36 г продукта в виде белого твердого вещества из половины реакционной смеси. Выход составил 64%. Упомянутый выше маточный раствор концентрировали до клейкого остатка (7,89 г), содержавшего реагенты в соотношении 1:1,2 (целевой/нецелевой) согласно ³¹P-ЯМР.

Пример 10-4. Получение изопропилового эфира (S)-2-[(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифеноксифосфориламино)пропионовой кислоты

В чистый и сухой стеклянный реактор загружали ДХМ (11,5 л). В атмосфере азота в реактор загружали фенилдихлорфосфат (2,3 кг, 10,9 моль). Раствор охлаждали до 0°C. Затем в один прием при непрерывном перемешивании в течение 30 мин вносили гидрохлорид изопропилового эфира L-аланина (1,83 кг, 10,9 моль). Реакционную массу охлаждали до внутренней температуры -50°C с помощью бани с ацетоном/сухим льдом. В вышеупомянутый реакционный раствор медленно вносили смесь ТЭА (2,1 экв., 3,17 л) в ДХМ (11,5 л) в течение 8 ч, поддерживая внутреннюю температуру между -40 и -50°C. После завершения внесения температуру смеси поддерживали в этом же диапазоне в течение приблизительно 1 ч. Смеси позволяли нагреться до 0°C в течение приблизительно 4 ч.

Одновременно в другой реактор загружали ДХМ (6,9 л) и вносили пентафторфенол (2,0 кг, 10,9 моль) в атмосфере азота. Раствор охлаждали до 0°C, затем вносили в раствор пентафторфенола ТЭА (1,1 экв., 1,65 л) (экзотермическая реакция) в течение приблизительно 2 ч. Полученный раствор, в свою очередь, медленно вносили в первый раствор, содержащий фенилдихлорфосфат и эфир аминокислоты, поддерживая температуру между 0 и 5°C, в течение приблизительно 7 ч. После завершения внесения продолжали перемешивание при этом диапазоне температур в течение приблизительно 4 ч. Ход реакции отслеживали с помощью ВЭЖХ. Когда оставалось менее 5% пентафторфенола, реакцию останавливали. Следует отметить, что в этот момент хиральная ВЭЖХ указывала на однородность смеси диастереомеров продукта.

Реакционную суспензию фильтровали через нутч-фильтр для удаления большей части суспендированной соли гидрохлорида триэтиламина. Сгусток соли промывали избыточным количеством ДХМ (9 л) и эту жидкость добавляли к основному фильтрату. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении при 35°C, получая твердый остаток. Твердый остаток совместно выпаривали с гексаном (4 л) для дальнейшего снижения уровней остаточного ДХМ. К твердому остатку добавляли 6 л 20% МТВЕ/гексана и перемешивали суспензию в течение приблизительно 17 ч при комнатной температуре под контролем ВЭЖХ. pH раствора оставался щелочным из-за остаточного ТЭА. В это время происходи-

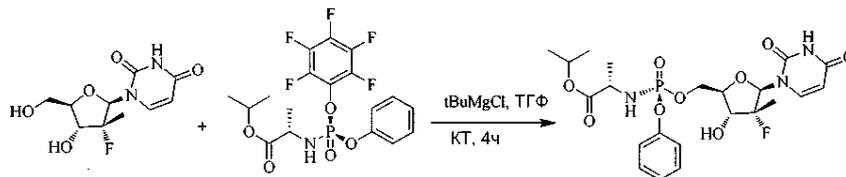
ло динамическое разделение, при котором осаждаемое твердое вещество представляло собой целевой S_p -диастереомер, а в надосадочной жидкости сохранялось равновесие между S_p - и R_p -диастереомерами.

Суспензию пропускали через нутч-фильтр и промывали твердый целевой продукт, все еще загрязненный гидрохлоридом ТЭА, 5% МТВЕ/гексаном (1 л). Твердое вещество растворяли в этилацетате (35 л) и промывали водой (3×35 л) и насыщенным раствором NaCl (10 л), а затем высушивали над твердым сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, поддерживая температуру реактора ниже 44°C. Твердый остаток совместно выпаривали с гексаном (4 л). Реактор охлаждали до комнатной температуры и вносили 5% МТВЕ/гексан (5 л). Густую суспензию перемешивали в течение 15 мин и затем собирали твердое вещество фильтрацией. Собранное твердое вещество промывали гексаном (2,5 л) и высушивали в глубоком вакууме при комнатной температуре до постоянной массы, получая конечный продукт (S_p -4) в виде белого твердого вещества, 2,6 кг (53%); 99,5% чистоты согласно ВЭЖХ, содержащий 0,4% R_p -4.

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

В перемешиваемый 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 безводном ТГФ (50 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение 15 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор неочищенного рацемического изопропилового эфира 2-([2,3,4,5,6-пентафторфеноксифосфорил)амино]пропионовой кислоты (4,08 мг, 10 ммоль) в ТГФ (15 мл) в течение 10 мин. Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 72 ч. ТСХ с эталонным продуктом показала, что образовывалось приблизительно 40-50% целевого продукта по сравнению с исходным нуклеозидом.

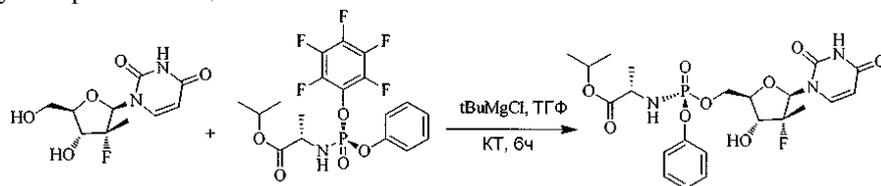
Пример 10-6. Получение (S)-изопропил 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноата (S_p -4), используя изопропиловый эфир (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифосфорил)амино]пропионовой кислоты и очистку только путем кристаллизации.



В перемешиваемый раствор соединения 3 (10 г, 38,46 ммоль, высушенный в вакууме при 50°C в течение 20 ч) в безводном ТГФ (165 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида в ТГФ (47,5 мл, 80,77 ммоль) в течение 20 мин на холодной водяной бане (5°C) в атмосфере азота. После завершения внесения охлаждающую баню удаляли и перемешивали белую суспензию при комнатной температуре (20°C) в течение 30 мин. Затем в реакционную смесь вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифосфорил)амино]пропионовой кислоты (20,9 г, 46,11 ммоль) в безводном ТГФ (165 мл) в течение 30 мин. Смесь перемешивали при комнатной температуре (20°C) в течение 3,5 ч. Перемешивание продолжали в течение дополнительных 1,5 ч; на этом этапе ТСХ указывал на >95% конверсию и отсутствие значимых различий в количестве примеси 3',5'-бис-фосфорамидата с момента времени 2 ч. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором NH_4Cl (10 мл), а затем выпаривали растворитель при 25°C. Остаток фракционировали между этилацетатом (400 мл) и смесью насыщенный раствор хлорида аммония (60 мл)/вода (20 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщенным раствором хлорида аммония (80 мл) и водой (3×60 мл). Водный слой хранили отдельно. Органический слой промывали 5% водным раствором карбоната натрия (3×50 мл) и водой (2×60 мл). Первый водный слой экстрагировали дополнительным количеством этилацетата (100 мл), промывали водой (2×20 мл), а затем этим же этилацетатным экстрактом экстрагировали водный слой, полученный после промывки карбонатом натрия. Органический слой промывали водой (2×20 мл) и объединяли с основной партией. Объединенные органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, получая пенистое твердое вещество (19,32 г). Остаток растворяли в 60 мл дихлорметана (выпадал белый твердый осадок и образовывался осажденный слой в течение приблизительно пяти минут), а затем вносили 25 мл ИРЕ. Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Белое твердое вещество фильтровали, промывали 1:1 смесью холодного (0°C) ИРЕ/дихлорметана (20 мл) и высушивали, получая 11,77 г (выход 58%) продукта в виде аморфного белого твердого вещества. Вышеупомянутое твердое вещество повторно растворяли в дихлорметане (350 мл), фильтровали и выпаривали при атмосферном давлении (температура бани 45°C) до объема ~120 мл. Раствор оставляли при комнатной температуре (21°C) в течение 20 ч. Белое кристаллическое твердое вещество (сольват дихлорметана) собирали фильтрацией, промывали холодным (0°C) дихлорметаном (10 мл) и высушивали в глубоком вакууме в течение 4 ч при комнатной температуре, получая чистый несольватированный про-

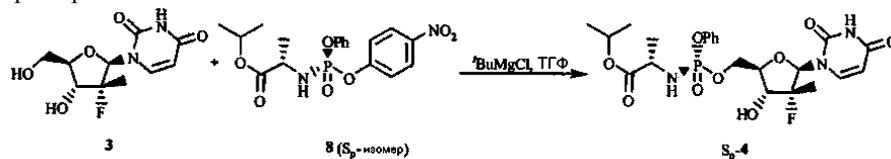
дукт (10,62 г, выход 52%) в виде белых игл. Чистота согласно ВЭЖХ 99,8%. Спектральные свойства соответствовали значениям, приведенным здесь.

Пример 10-7. Получение (S)-изопропил 2-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфориламино)пропаноата (S_P-4), используя изопропиловый эфир (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)-феноксифосфориламино]пропионовой кислоты, модифицированные условия и обработку реакции и очистку только путем кристаллизации.



В перемешиваемую суспензию 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-пиримидин-2,4(1H,3H)-диона (3, 5,0 г, 19,1 ммоль, высушенного в вакууме при 50°C в течение 20 ч) в безводном ТГФ (75 мл) с помощью капельной воронки вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида в ТГФ (23,7 мл, 40,35 ммоль) в течение 30 мин при -5°C. Белую суспензию перемешивали при этой температуре в течение 30 мин и затем позволяли нагреться до комнатной температуры (20°C), при которой перемешивали в течение дополнительных 30 мин. Реакционную смесь охлаждали до 5°C, а затем вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)-феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (10,45 г, 23,06 ммоль) в ТГФ (50 мл) в течение 30 мин. Смесь перемешивали при 5°C в течение 18 ч, охлаждали до -5°C, а затем останавливали реакцию 2 н. HCl (25 мл). В смесь вносили толуол (100 мл) и нагревали до комнатной температуры. Спустя 20 минут разделяли слои. Органический слой промывали 1 н. HCl (2×10 мл), водой (10 мл), 5% водным раствором Na₂CO₃ (4×10 мл), водой (2×10 мл) и насыщенным раствором NaCl (10 мл). Все водные слои повторно экстрагировали толуолом (20 мл), промывали 5% водным раствором Na₂CO₃ (2×5 мл), водой (10 мл) и насыщенным раствором NaCl (5 мл). Объединенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали до приблизительного объема 20 мл. В раствор вносили дихлорметан (20 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 18 ч. Твердое вещество фильтровали, промывали 1:1 смесью МТВЕ/ДХМ (2×10 мл) и высушивали в глубоком вакууме, получая белое твердое вещество (7,7 г). ВЭЖХ твердого вещества на этом этапе определяла содержание 98,21% S_P-4, 0,18% непрореагировавшего соединения 3 и 0,67% примеси 3',5'-бис-фосфорамидата. Вышеупомянутое твердое вещество S_P-4 повторно растворяли в дихлорметане (77 мл, нагретом в сосуде высокого давления при 55°C) и оставляли при комнатной температуре на 20 ч. Кристаллическое твердое вещество фильтровали, промывали холодным дихлорметаном (5 мл, 0°C) и высушивали в глубоком вакууме, получая чистый продукт в виде белого твердого вещества (6,9 г, выход 68%, 99,79 чистоты согласно ВЭЖХ).

Получение и очистка С или С' обеспечивали прямой доступ к S_P-4 или R_P-4, как иллюстрировано следующими примерами.



Пример 11. Получение S_P-4 (32-мг масштаб)

В перемешиваемый раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона 3 (32 мг, 0,12 ммоль) в безводном ТГФ (1 мл) вносили 1 М раствор t-бутилмагнийхлорида (0,26 мл, 0,26 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение 3 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)-феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, S_P-изомер) в ТГФ (0,5 мл) в течение 3 мин. Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 42 ч и останавливали реакцию насыщенным водным NH₄Cl (10 мл). Смесь фракционировали между этилацетатом и водой. Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток хроматографировали с 0-4% градиентом метанола/дихлорметана, получая S_P-4 в виде пенистого твердого вещества (29 мг, выход 44,5%). ¹H и ³¹P ЯМР согласовывались с описанием, приведенным здесь.

Пример 12. Получение S_P-4 (2,6-г масштаб, без хроматографии)

В перемешиваемый раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (2,6 г, 10 ммоль) в безводном ТГФ (50 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение 15 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)-

феноксифосфориламино]пропионой кислоты (8, S_p -изомер, 4,08 г, 10 ммоль) в ТГФ (15 мл) в течение 10 мин. Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 60 ч и останавливали реакцию насыщенным водным NH_4Cl (20 мл). Смесь фракционировали между этилацетатом (150 мл) и последовательно 10% водным раствором Na_2CO_3 (3×20 мл) и водой (20 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтый остаток (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 ПЭ/дихлорметаном (5 мл) и высушивали в вакууме, получая чистый продукт в виде белого твердого вещества (1,85 г, выход 35%).

Пример 13. Получение S_p -4 с использованием NaHMDS

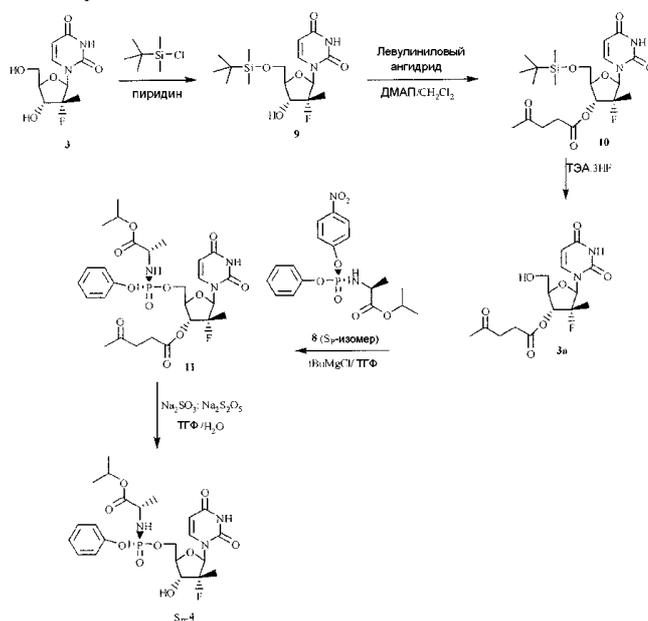
В перемешиваемый раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (71 мг, 0,27 ммоль) в безводном ТГФ (2,0 мл) вносили 2,0 М раствор бис(триметилсилил)амида натрия (NaHMDS) в ТГФ (270 мкл, 0,54 ммоль) при -78°C в течение 2 мин. Спустя 30 мин в смесь вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)-феноксифосфориламино]пропионой кислоты (8, S_p -изомер, 111 мг, 0,27 ммоль) в ТГФ (1 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при этой температуре в течение 2 ч, затем нагревали до -20°C и перемешивали при этой температуре в течение дополнительных 20 ч. ТСХ определяла ~30% непрореагировавшего исходного нуклеозидного материала. Поэтому в реакционную смесь вносили дополнительные 0,5 экв. реагента (55 мг, 0,14 ммоль) в ТГФ (0,5 мл) и перемешивали еще в течение 6 ч. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором хлорида аммония, а затем фракционировали между этилацетатом и водой. Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали, получая светло-коричневый остаток. Колоночная хроматография неочищенного продукта с 0-5% градиента метанола/дихлорметана позволяла получить S_p -4 (22 мг, выход 15%), 3'-фосфорамидат (5, S_p -изомер, 11,5 мг, выход 16%) и бис-фосфорамидат (6, S_p , S_p -изомер, 12,6 мг).

Пример 14. Получение R_p -4 (260-мг масштаб)

В перемешиваемый 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 безводном ТГФ (6 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (1,23 мл, 2,1 ммоль, 2,1 экв.) при комнатной температуре в течение 5 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)-феноксифосфориламино]пропионой кислоты (8, R_p -изомер) в ТГФ (3 мл) в течение 3 мин. Смесь оставляли перемешиваться при этой температуре в течение 96 ч, а затем останавливали насыщенным водным раствором NH_4Cl (10 мл). Остаток фракционировали между этилацетатом (50 мл) и водой (2×20 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтый остаток (490 мг). Остаток хроматографировали с 0-5% градиентом метанола/дихлорметана, получая продукт в виде белого твердого вещества (160 мг, выход 30%).

Соединения S_p -4 и R_p -4, кроме того, можно получить путем реакции 3'-защищенного соединения 3 с соответствующим реагентом С и С' или смесью, содержащей С и С', как показано в следующих примерах.

Пример 15. Получение S_p -4 с использованием соединения 3а в качестве интермедиата синтеза



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

В перемешиваемый раствор 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина (3, 81,1 г, 312 ммоль) в безводном пиридине (750 мл) по каплям вносили раствор TBDMSCl (103,19 г, 685,6 ммоль) в безводном пиридине (500 мл) при комнатной температуре в течение 45 мин. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 24 ч. В реакционную смесь вносили метанол (85 мл) и оставляли смесь перемешиваться в течение 10 мин, а затем отгоняли растворитель при пониженном давлении. В реакционную массу вносили горячую воду (45°C) (1 л) и экстрагировали смесь этилацетатом (2×500 мл), промывали водой (1×500 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия. Отгоняли этилацетат и совместно выпаривали полученный остаток с толуолом (2×500 мл), получая неочищенное соединение 9 в качестве белой пены. Выход=116,9 г (количественный).

¹H ЯМР (CDCl₃, 300 МГц): δ 0,1 (с, 6H), 0,91 (с, 9H), 1,22 (д, 3H, J=21 Гц), 2,50 (с, 2H), 3,75-4,05 (м, 4H), 5,54 (д, 1H, J=9 Гц), 5,73 (с, 1H), 6,0 (д, 1H, J=18 Гц), 7,81 (д, 1H, J=9 Гц), 8,57 (шс, 1H), 11,1 (с, 1H).

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

В перемешиваемый раствор нуклеозида 9 (116,9 г, 312,1 ммоль) в ДХМ (1 л) вносили DMAP (30,5 г, 249,7 ммоль) и оставляли перемешиваться при кт в течение 20 мин. В смесь вносили раствор левулинового ангидрида (133,6 г, 642,3 ммоль) в ДХМ (200 мл) и оставляли перемешиваться в течение 24 ч. ТСХ смеси указывала на завершение реакции. Вносили холодную воду (500 мл) и перемешивали смесь в течение 20 мин. Слои разделяли, органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×250 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия, а затем отгоняли растворитель при пониженном давлении, получая желтое масло. Выход неочищенного продукта: 197,6 г (135%). Этот материал использовали на следующем этапе без обработки.

¹H ЯМР (CDCl₃, 300 МГц) δ 0,11 (с, 6H), 0,94 (с, 9H), 1,34 (д, 3H, J=21 Гц), 2,22 (с, 3H), 2,6-2,89 (м, 4H), 3,72 (м, 1H), 4,01 (д, 1H, J=12 Гц), 4,23 (д, 1H, J=9 Гц), 5,33 (дд, 1H, J=15 Гц), 5,73 (д, 1H, J=6 Гц), 6,26 (д, 1H, J=15 Гц), 8,12 (д, 1H, J=12 Гц), 8,72 (шс, 1H).

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

Неочищенное соединение 10 (197,6 г, ~312,1 ммоль) растворяли в ДХМ (1л), в который вносили ТЭА.3HF (50,3 г, 312,1 ммоль) и оставляли перемешиваться в течение ночи при комнатной температуре. ТСХ смеси указывала на приблизительно 50% завершение реакции. Вносили еще один эквивалент ТЭА.3HF (50,3 г, 312,1 ммоль) и оставляли реакционную смесь перемешиваться в течение 6 ч. ТСХ в этот момент указывала на приблизительно 10% непрореагировавшего исходного материала. Вносили еще 0,25 экв. ТЭА.3HF (12,5 г, 78,0 ммоль) и оставляли реакционную смесь перемешиваться в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали досуха, получая желтое масло. Неочищенный продукт всех партий очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-2% MeOH в ДХМ), получая 124,1 г 3'-левулината в виде белого пенистого твердого вещества (выход очистки в три этапа 90% от 2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилуридина).

¹H ЯМР: (CDCl₃, 400 МГц) δ 1,55 (д, 3H, CH₃, J=20 Гц), 2,36 (с, 3H, CH₃), 2,8-3,03 (м, 5H, CH₂CH₃), 3,91-3,96 (дд, 1H, CH''), 4,2-4,25 (м, 1H, CH'), 4,34 (дд, 1H, CH, J=8 Гц), 5,25 (дд, 1H, J=16 Гц), 5,93 (д, 1H, J=8 Гц), 8,20 (д, 1H, J=8 Гц), 9,18 (с, 1H).

Пример 15-4. Стереоселективный синтез (S)-изопропилового эфира (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2H-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-(4-оксопентаноил)-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]-феноксифосфиламино}-пропионовой кислоты (11)

В раствор нуклеозида (3а, 1,00 ммоль, 358 мг) в 5 мл безводного ТГФ, охлажденный до 0°C, вносили tBuMgCl (1,7 М в ТГФ, 2 экв.), позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение получаса. В эту смесь в один прием вносили реагент (приблизительно 97% хиральной чистоты) изопропиловый эфир (S)-2-[(S)-(4-нитрофеноксифеноксифосфиламино)пропионовой кислоты (8, Sp-изомер) (408 мг, 1,00 ммоль, 1,00 экв.) и оставляли перемешиваться при кт. Спустя 16 ч оставалось ~30% исходного материала. Реакцию останавливали 10 мл насыщенного раствора NH₄Cl и экстрагировали водную фазу этилацетатом (3×25 мл). Объединенный органический слой промывали насыщенным раствором NaCl, высушивали над безводным сульфатом натрия и выпаривали досуха, получая бледно-желтую пену (500 мг). Продукт очищали хроматографией на силикагеле, используя 2-5% метанол в метилхлориде, получая продукт в виде белой пены (275 мг) приблизительно 97% хиральной чистоты относительно R и непрореагировавший исходный материал (162 мг). Основываясь на израсходованном исходном материале, выход составлял 76%.

³¹P ЯМР (CDCl₃, 162 МГц): 3,7 м.д.; ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,22 (дд, 6H, J=6,4 Гц), 1,37 (с, 3H), 1,58 (с, 3H), 2,18 (с, 3H), 2,63-2,9 (м, 4H), 4,0 (д, 1H, J=8 Гц), 4,2-4,33 (м, 1H), 4,57 (д, 1H, J=8 Гц), 4,96-5,00 (септ, 1H), 5,2 (дд, 1H, J=9 Гц), 5,42 (д, 1H, J=8 Гц), 6,19 (д, 1H, J=18 Гц), 7,15-7,35 (м, 5H), 7,5 (д, 1H, J=5,6 Гц), 8,2 (шс, 1H).

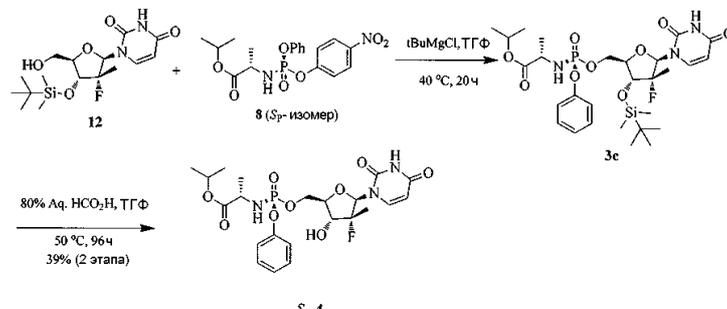
Пример 15-5. Синтез (S)-изопропилового эфира (S)-2-[[[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2H-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (S_P-4)

Раствор сульфита натрия получали, внося Na₂S₂O₃ (1,51 г) и Na₂S₂O₈ (0,57 г) в воду (25 мл). 1,0 мл раствора сульфита натрия вносили в раствор левулината (11, 250 мг, 0,40 ммоль) в безводном ТГФ (2,5 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь вливали в воду (15 мл), экстрагировали этилацетатом (3×25 мл) и выпаривали, количественно получая белый твердый продукт приблизительно 97% хиральной чистоты относительно R, соответствовавший физическим и химическим свойствам S_P-4, полученного непосредственно из незащищенного нуклеозида.

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

В перемешиваемый раствор (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2H-пиримидин-1-ил)-4-фтор-2-гидрокси-метил-4-метилтетрагидрофуран-3-илового эфира 4-оксопентановой кислоты (3а, 210 мг, 0,59 ммоль) в безводном ТГФ (1,5 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (1,07 мл, 1,82 ммоль) при комнатной температуре в течение 2 мин. Вначале наблюдали белый осадок, а спустя 10 мин реакционную смесь превращалась в темно-желтый раствор. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8 (S_P-изомер), 382 мг, 0,94 ммоль) в ТГФ (1,5 мл) в течение 3 мин. Смесь нагревали до 40°C в течение 5 ч; в этот момент времени ТСХ и ¹H ЯМР определяли менее 2% непрореагировавшего исходного материала. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором хлорида аммония, а затем фракционировали между этилацетатом и водой. Объединенный органический слой промывали 10% водным раствором Na₂CO₃ (3×10 мл), а затем водой. Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали, получая коричневый остаток (410 мг). Неочищенный продукт растворяли в тетрагидрофуране (1,0 мл), а затем вносили водный раствор смеси сульфита натрия (37 мг, 0,295 ммоль) и метабисульфита натрия (224 мг, 1,18 ммоль) в 1 мл воды. Смесь нагревали до 45°C в течение 20 ч; на этом этапе согласно ТСХ наблюдали лишь 10% конверсию, вследствие чего вносили дополнительное количество сульфита натрия (74 мг) и метабисульфита натрия (448 мг) и продолжали нагревание в течение дополнительных 52 ч. В этот момент наблюдали приблизительно 40% конверсию согласно ТСХ. Реакционную смесь фракционировали между водой и этилацетатом. Объединенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали, получая коричневый остаток (210 мг). Колончатая хроматография остатка в 0-5% градиенте MeOH/ДХМ позволяла получить непрореагировавший исходный материал (89 мг) и S_P-4 (57 мг, выход 18% или 24%, основываясь на выделенном исходном материале).

Пример 17. Получение S_P-4 с использованием соединения 3с в качестве интермедиата синтеза



Пример 17-1. Получение 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланокси)-3-фтор-5-гидрокси-метил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона, 12.

В раствор соединения 3 (10,0 г, 38,43 ммоль) в пиридине (50 мл) вносили дихлорметан (50 мл). Раствор охлаждали до 0°C. В раствор вносили 4,4'-диметокситритилхлорид (14,32 г, 42,27 ммоль) и перемешивали раствор при 0°C в течение 5 ч. Для остановки реакции вносили метанол (5 мл). Раствор концентрировали досуха при пониженном давлении и фракционировали остаток между этилацетатом (500 мл) и водой (50 мл). Органический раствор промывали насыщенным раствором NaCl (50 мл) и высушивали (сульфатом натрия, 4 г). Растворитель удаляли при пониженном давлении, а остаток растворяли в дихлорметане (100 мл). В раствор вносили имидазол (7,83 г, 115 ммоль) и t-бутилдиметилсиланхлорид (8,68 г, 57,6 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Для остановки реакции вносили метанол (5 мл), раствор удаляли при пониженном давлении, а остаток фракционировали между этилацетатом (500 мл) и водой (50 мл). Органический раствор высушивали (сульфатом натрия, 4 г) и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали колончатой хроматографией (10-40% EtOAc в гексане), получая промежуточный продукт 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS. Его, в свою очередь, обрабатывали 1% трифторуксусной кислотой в дихлорметане (200 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Вносили воду (20 мл) и перемешивали раствор при комнатной температуре в течение еще 1 ч. Медленно вносили метанол (5 мл) и перемешивали раствор при комнатной температуре

в течение еще 1 ч. С целью подгонки pH раствора до 7 вносили гидроксид аммония. Органический раствор отделяли, высушивали (сульфатом натрия, 4 г) и выпаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1-5% метанол в дихлорметане), получая соединение 12 в виде белого твердого вещества (7,5 г, выход 50% в три стадии).

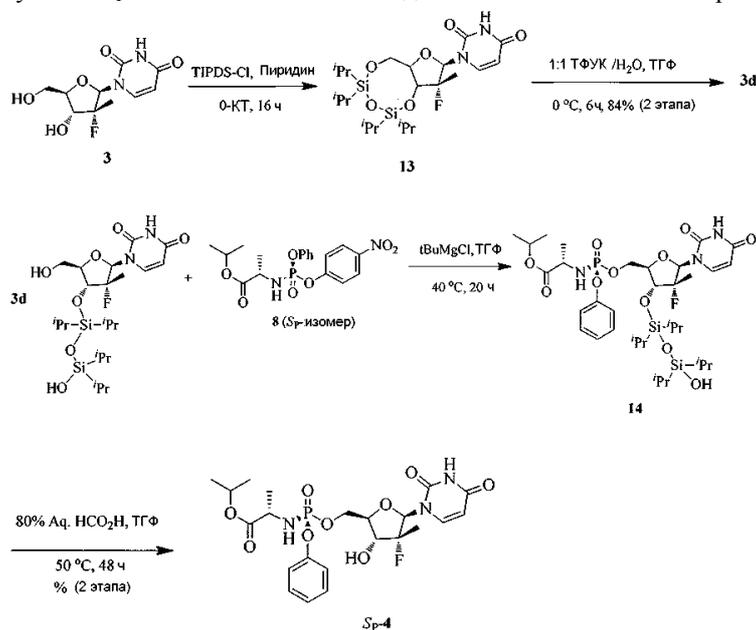
^1H ЯМР (ДМСО- d_6) δ (м.д.) 11,48 (шс, 1H, NH), 7,94 (д, 1H, H-6), 6,00 (д, 1H, H-1'), 5,69 (д, 1H, H-5), 4,06 (дд, 1H, 3'-H), 3,85 (м, 2H, H-5'a, H-4'), 3,58 (шд, 1H, H-5'b), 1,27 (д, 3 H, 2-CH $_3$), 0,89 (с, 9H, C(CH $_3$) $_3$), 0,12 (с, 6H, Si (CH $_3$) $_2$).

Пример 17-2. Получение S_p -4 с использованием 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (3с).

В перемешиваемый раствор 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (12, 374 мг, 1 ммоль) в безводном ТГФ (3 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (1,8 мл, 3,1 ммоль) при комнатной температуре в течение 2 мин. Вначале наблюдали белый осадок, а спустя 10 мин реакционная смесь превращалась в прозрачный темно-желтый раствор. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, S_p -изомер, 653 мг, 1,6 ммоль) в ТГФ (2,5 мл) в течение 3 мин. Смесь нагревали до 40°C в течение 20 ч; в этот момент времени ТСХ и ^1H ЯМР определяли менее 5% непрореагировавшего исходного материала. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором хлорида аммония, а затем фракционировали между этилацетатом и водой. Органический слой промывали 10% водным раствором Na $_2$ CO $_3$ (3×10 мл), а затем водой (20 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали, получая

коричневый остаток, содержащий 3с (850 мг). Неочищенный продукт растворяли в тетрагидрофуране (2 мл) и вносили 0,8 мл 8 0% водного раствора муравьиной кислоты при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 50°C в течение 96 ч. С помощью ТСХ наблюдали приблизительно 70% конверсию. Реакционную смесь вливали в холодный насыщенный водный раствор бикарбоната натрия, а затем фракционировали между этилацетатом и водой. Объединенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали, получая коричневый остаток (220 мг). Колоночная хроматография остатка в 0-5% градиенте MeOH/ДХМ позволяла получить непрореагировавший исходный материал (21 мг) и S_p -4 (77 мг, выход 35 или 39%, основываясь на выделенном исходном материале).

Пример 18. Получение S_p -4 с использованием соединения 3d в качестве интермедиата синтеза



Пример 18-1. Получение соединения 3d

В перемешиваемый раствор соединения 3 в пиридине (20 мл)

при 0°C по каплям вносили TIPDS-Cl в течение 15 мин. Смеси позволяли медленно нагреться до комнатной температуры, при которой ее перемешивали в течение 16 ч. Пиридин выпаривали, а остаток совместно выпаривали с толуолом (50 мл). Остаток гомогенизировали с гексаном и отфильтровывали белый осадок с помощью целитной фильтровальной подушки. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая пенистое твердое вещество (12,97 г). Неочищенный продукт (13) растворяли в тетрагидрофуране (75 мл), а затем вносили водный раствор ТФУК (75 мл, 1:1 ТФУК/вода) при 0°C в течение 20 мин. Смесь перемешивали при этой температуре в течение 6 ч. ТСХ определяла ~5% исходного материала. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором NaHCO $_3$ до достижения pH 8, а за-

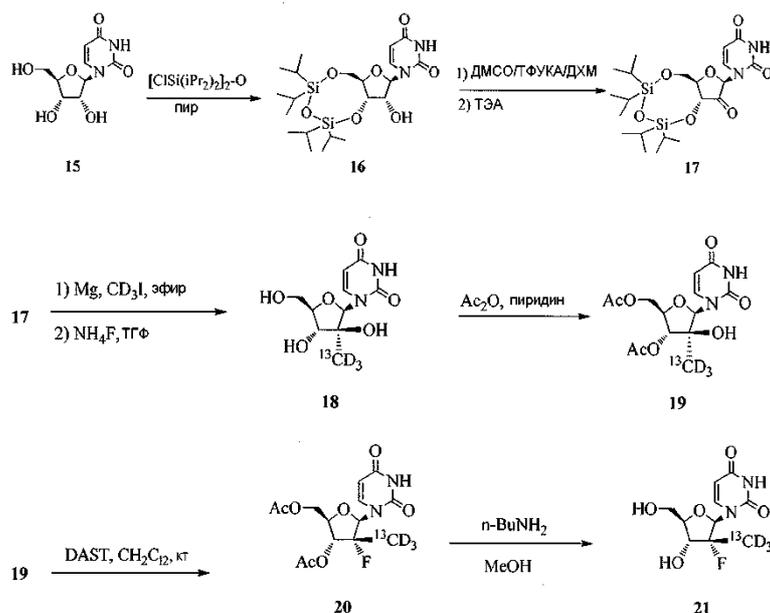
тем экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический экстракт промывали водой, высушивали и концентрировали, получая белое кристаллическое твердое вещество. Дальнейшая гомогенизация этого твердого вещества с гексаном (30 мл) позволяла получить белое твердое вещество, которое фильтровали и высушивали в глубоком вакууме, получая соединение 3d (10,1 г, выход 84% в 2 этапа). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) : δ 8,83 (шс, 1H), 7,94 (шд, $J=6,0$ Гц, 1H), 6,10 (шд, $J=18,4$ Гц, 1H), 5,71 (д, $J=8,2$ Гц, 1H), 4,43 (шс, 1H), 4,36 (дд, $J=22,6, 9,0$ Гц, 1H), 4,27 (шс, 1H), 4,10 (д, $J=13,2$ Гц, 1H), 4,03 (д, $J=9,2$ Гц, 1H), 3,92 (д, $J=13,2$ Гц, 1H), 1,39 (д, $J=22,0$ Гц, 3H), 1,11-0,92 (м, 28H).

Пример 18-2. Получение S_p -4

В перемешиваемый раствор 3d (520 мг, 1 ммоль) в безводном ТГФ (5 мл) вносили 1,7 М раствор трет-бутилмагнийхлорида (1,8 мл, 3,1 ммоль, 3,1 экв.) при комнатной температуре в течение 15 мин. Спустя 30 мин по каплям вносили раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)-феноксифосфориламино]пропионой кислоты (8, S_p -изомер, 653 мг, 1,6 ммоль) в ТГФ (1 мл) в течение 3 мин. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 60 ч. ^1H и ^{31}P ЯМР необработанного образца определяли смесь диастереомеров в соотношении приблизительно 1:0,76. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором NH_4Cl (20 мл). Смесь фракционировали между этилацетатом (150 мл) и последовательно 10% водным раствором Na_2CO_3 (3×20 мл) и водой (20 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая бледно-желтый остаток (14, 878 мг).

Вышеуказанное соединение 14 повторно растворяли в тетрагидрофуране (3 мл), а затем вносили 80% водный раствор муравьиной кислоты. Смесь нагревали при 55°C в течение 20 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C , а затем останавливали реакцию насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (рН 7,0). Затем реакционную смесь фракционировали между этилацетатом и водой. Объединенный органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали, получая 560 мг остатка. Остаток хроматографировали с 0-5% градиентом метанола/дихлорметана, получая непрореагировавший исходный материал (14, 242 мг) и S_p -4 (80 мг, выход 15%) в виде белого твердого вещества.

Пример 19. Получение изотопно меченого S_p -4



Пример 19-1. Получение 1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-гидрокси-2,2,4,4-тетраизопропилтетрагидро-6H-фуоро[3,2-f][1,3,5,2,4]триоксасилоцин-8-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, 16

Уридин (15, 100,0 г, 409,5 ммоль) совместно выпаривали досуха с безводным пиридином (600 мл) и ресуспендировали в безводном пиridине (700 мл). В эту перемешиваемую тонкодисперсную суспензию вносили 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисулксан (135,7 г, 482,5 ммоль) в течение 60 мин при комнатной температуре. После перемешивания тонкодисперсной суспензии в течение 17 ч при комнатной температуре реакцию останавливали внесением метанола (20 мл), а затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток фракционировали между этилацетатом (1,5 л) и водой (2 л). Затем органический слой промывали 5% соляной кислотой (2×1 л), насыщенным раствором NaCl (500 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия (50 г), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении до неочищенного продукта в количестве приблизительно 250 г. Остаток подвергали фильтрации на колонке с силикагелем (1,75 кг) в градиенте этилацетата в гексане 20-65%. Фракции чистого продукта, отобранные согласно гомогенной ТСХ (R_f 0,55 в 1:1 смеси гексана-этилацетата) объединяли, концентрировали при пониженном давлении и высушивали (40°C , 0,2 мм рт.ст., 24 ч), получая 145,5 г (76%) соединения 16 в виде белого пенящегося твердого вещества. Кроме того, собирали дополнительную фракцию (35 г) слег-

ка загрязненного соединения 16. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6) δ (м.д.) 11,35 (с, 1H, NH), 7,66 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-6), 5,57 (д, 1H, J=4,8 Гц, 2'-ОН), 5,50-5,49 (м, 2H, 1'-H и H-5), 4,14-4,18 (м, 3H, 2',3',4'-H), 3,97-3,87 (м, 2H, 5'-Ha и Hb), 1,02-0,95 (м, 28H, CH(CH $_3$) $_2$).

Пример 19-2. Получение 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-тетраизопропил-9-оксотетрагидро-6H-фуоро[3,2-f][1,3,5,2,4]триоксадисилоцин-8-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, 17

В сухую трехгорлую круглую колбу вносили безводный ДХМ (600 мл) и ДМСО (30,82 г, 394,5 ммоль). Раствор охлаждали до -78°C на бане сухим льдом/ацетоном в атмосфере азота. Трифторуксусный ангидрид (чистый, 77,7 г, 369,8 ммоль) вносили с помощью шприца в течение 40 мин и получали мутную смесь. В смесь через капельную воронку вносили по каплям раствор производного уридина 16 в ДХМ (600 мл) в течение 75 мин при -78°C . Эту гетерогенную смесь перемешивали в течение 2 ч при $-78\sim-65^\circ\text{C}$, а затем с помощью шприца быстро вносили безводный триэтиламин (92 мл), образуя прозрачный светло-желтый раствор. Спустя 1 ч при низкой температуре реакция завершалась согласно ТСХ (30% EtOAc в гексане). Охлаждающую баню удаляли, а реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением насыщенного NH_4Cl (180 мл). Вносили воду (200 мл) и отделяли органический слой. Водный слой повторно экстрагировали ДХМ (300 мл). Объединенный органический слой промывали водой (3 \times 400 мл), насыщенным раствором NaCl (150 мл) и высушивали над Na_2SO_4 .

Удаление растворителя позволяло получить клейкий коричневый остаток.

Неочищенный маслянистый остаток (содержавший следовые количества ДХМ) хранили в течение ночи в морозильной камере. После ночи в масле наблюдали некоторое количество кристаллического твердого вещества. Масло растворяли в 500 мл гексана при комнатной температуре. Раствор хранили в морозильной камере в течение 24 ч, в результате чего образовывалось большее количество твердого вещества. Твердое вещество собирали фильтрованием и промывали холодным 10% ДХМ в гексане (1 л) с целью удаления большей части оранжевого окрашивания. Твердое вещество (17) высушивали в вакууме в течение 2 ч, а затем высушивали воздухом в течение 24 ч. Твердое вещество весило 21 г после высушивания в вакууме при 50°C . Фильтрат концентрировали, остаток очищали колоночной хроматографией (10-70% этилацетат в гексане), получая дополнительные 37 г (объединенный выход 97%) соединения 17 в виде светло-оранжевого твердого вещества.

Пример 19-3. Получение 1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)-3- ^{13}C -пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, 18

Магний (3,53 г, 147 ммоль), промытый 5% водным раствором соляной кислоты и высушенный (50°C , 0,2 мм рт.ст., 24 ч), помещали в двугорлую круглодонную колбу, оснащенную магнитной мешалкой и холодильником. Колбу заполняли газообразным аргоном, а затем вносили безводный эфир (80 мл). К магнию в эфире медленно добавляли пердейтерио- ^{13}C -метилюрид (15,06 г, 110,3 ммоль), что приводило к экзотермической реакции. После охлаждения реакционной смеси надосадочную жидкость переносили в раствор высушенного соединения 17 (50°C , 0,2 мм рт.ст., 15 ч) (10,0 г, 20,63 ммоль) в безводном ТГФ (1 л) при -50°C в течение 20 мин. Температуре позволяли повыситься до -40°C и перемешивали смесь при диапазоне температур от -40 до -25°C в течение 4 ч. После завершения реакции смесь разбавляли EtOAc (1 л) при -50°C , а затем медленно вносили насыщенный раствор NaCl (300 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщенным раствором хлорида аммония (300 мл \times 2) и высушивали сульфатом натрия. После фильтрации и концентрирования при пониженном давлении остаток растворяли в MeOH (250 мл). Вносили фторид аммония (12 г) и TBAF (400 мг). Полученную смесь перемешивали при 90°C в течение 7 ч, а затем концентрировали с силикагелем (20 г) при пониженном давлении. После тщательной вакуумной сушки полученный остаток очищали флэш-колоночной хроматографией на силикагеле (MeOH:CH $_2$ Cl $_2$ =1:20-1:10), получая соединение 18 (5 г, 46%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6) δ (м.д.) 11,26 (с, 1H, NH), 7,65 (д, 1H, J=8,4 Гц, H-6), 5,77 (д, 1H, J=2,4 Гц, H-1'), 5,57 (д, 1H, J=8,0 Гц, H-5), 5,46 (д, 1H, J=5,2 Гц, HO-3'), 5,24 (д, 1H, J=2,4 Гц, HO-2'), 5,14 (т, 1H, J=5,6 Гц, HO-5'), 3,74-3,56 (м, 4H, H-3',4',5',5'').

Пример 19-4. Получение ((2R,3R,4S,5R)-3-ацетокси-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-гидрокси-4- ^{13}C -пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метилацетата, 19

В раствор соединения 18 (5,00 г, 19,1 ммоль) в безводном пиридине (100 мл) вносили уксусный ангидрид (3 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч, разбавляли EtOAc (250 мл), промывали водой (50 мл \times 3) и высушивали сульфатом натрия. После фильтрации и концентрирования остаток очищали флэш-колоночной хроматографией (MeOH от 0 до 5% в CH $_2$ Cl $_2$), получая соединение 19 (4,0 г, 68%) в виде серого твердого вещества.

Пример 19-5. Получение ((2R,3R,4R,5R)-3-ацетокси-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-4- ^{13}C -пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метилацетата, 20

В раствор соединения 19 (2,33 г, 6,73 ммоль) в безводном CH $_2$ Cl $_2$ (60 мл) медленно вносили DAST (1,33 мл, 10,1 ммоль) при -78°C . Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин после помещения в условия с комнатной температурой. Дополнительные две реакции в масштабе 2,33 г и одну реакцию в масштабе 1,00 г проводили точно таким же образом. Смеси, полученные в результате всех четырех реакций, объединяли, разбавляли CH $_2$ Cl $_2$ (300 мл), промывали водой со льдом (100 мл \times 2), а затем холодным

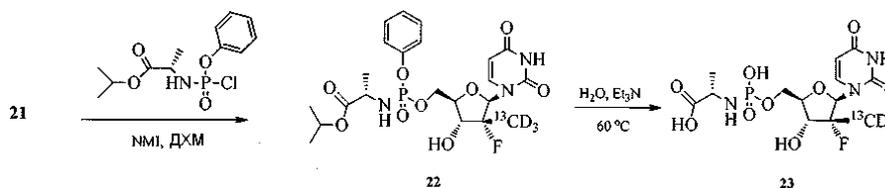
водным раствором NaHCO_3 (100 мл×2). После высушивания, фильтрации и концентрирования остаток очищали флэш-колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc от 0 до 50% в гексане, выход соединения приблизительно 48%), получая соединение 20 (2,0 г, 24% от общих 7,99 г соединения 19) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (CDCl_3) δ (м.д.) 8,27 (с, 1H, NH), 7,55 (д, 1H, $J=8,4$ Гц, H-6), 6,17 (д, 1H, $J=18,8$ Гц, H-1'), 5,78 (дд, 1H, $J=1,2, 8,4$ Гц, H-5), 5,12 (дд, 1H, $J=9, 6, 21,6$ Гц, H-3'), 4,40-4,31 (м, 3H, H-4',5',5''), 2,19 (с, 3H, CH_3), 2, 15 (с, 3H, CH_3).

Пример 19-6. Получение 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-3- ^{13}C -пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, 21

В раствор соединения 20 (2 г, 5,74 ммоль) в метаноле (20 мл) вносили *n*-бутиламин (6 мл). Полученную смесь перемешивали при кт в течение 15 ч, а затем концентрировали с силикагелем *in vacuo*. Полученный остаток очищали флэш-колоночной хроматографией с силикагелем (MeOH от 0 до 10% в CH_2Cl_2), получая соединение 21 (1,3 г, 85%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (CD_3OD) δ (м.д.) 8,08 (д, 1H, $J=8,0$ Гц, H-6), 6,13 (д, 1H, $J=18,4$ Гц, H-1'), 5,70 (д, 1H, $J=8,0$ Гц, H-5), 3,99 (д, 1H, $J=13,6$ Гц, H-5'), 3,97-3,91 (м, 2H, H-3',4'), 3,80 (дд, 1H, $J=2,0, 12,8$ Гц, H-5''), ESMS ($M+1$) расчетное 265, наблюдаемое значение 265.



Пример 19-7. Получение (S)-изопропил 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4- ^{13}C -пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфориламино)пропаноата, 22

В раствор незащищенного нуклеозида 21 (207 мг, 0,783 ммоль) и *N*-метилимидазола (0,4 мл, 5 ммоль) в ТГФ (4 мл) по каплям вносили предварительно изготовленный фосфорхлоридат в ТГФ (1,0 М, 2,35 мл, 2,35 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры в течение 1 ч, а затем вносили воду (1 мл) и EtOAc (5 мл). Органический раствор промывали насыщенным водным раствором одноосновного цитрата натрия (2×2 мл), насыщенным водным раствором NaHCO_3 (1×2 мл), высушивали (MgSO_4) и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией с силикагелем, используя 0-5% $^1\text{PrOH}$ в CH_2Cl_2 в качестве элюента, получая фосфорамидат 22 (216 мг, 52%, смесь *R*-диастереомеров 1:1) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 11,54 (с, 1H), 7,56 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 7,40-7,35 (м, 2H), 7,23-7,18 (м, 3H), 6,14-5,96 (м, 2H), 5,89 (дд, $J=5, 6, 25,6$ Гц, 1H), 5,55 (т, $J=8,4$ Гц, 1H), 4,85 (дк, $J=1,6, 6,0$ Гц, 1H), 4,44-4,32 (м, 1H), 4,25 (м, 1H), 4,06-3,98 (м, 1H), 3,86-3,70 (м, 2H), 1,30-1,08 (м, 9H); ^{31}P ЯМР (162 МГц, DMCO-d_6) δ 4,90, 4,77; LRMS (ESI) $[M+H]^+$ рассчитанное значение для $\text{C}_{21}^{13}\text{CH}_{27}\text{D}_3\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$ 534,5, найденное значение 534,4.

Пример 19-8. Получение (2S)-2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2, 4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4- ^{13}C -пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(гидрокси)фосфорил)амино)пропионовой кислоты, 23

Фосфорамидат 22 (147 мг, 0,276 ммоль) суспендировали в триэтилаmine (2 мл) и воде (0,5 мл) и нагревали при 60°C в течение 30 ч. Затем выпаривали при пониженном давлении летучие компоненты. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией с силикагелем, элюируя его 50-70% $^1\text{PrOH}$ в CH_2Cl_2 , а затем 0-20% NH_4OH в $^1\text{PrOH}$, получая соединение 23 в виде белого твердого вещества (95 мг, 83%): ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 8,00 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 5,98 (д, $J=19,2$ Гц, 1H), 5,52 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 4,02-3,81 (м, 4H), 1,10 (д, $J=6, 8$ Гц, 3H); ^{31}P ЯМР (162 МГц, DMCO-d_6) δ 8,12; LRMS (ESI) $[M+H]^+$ рассчитанное значение для $\text{C}_{12}^{13}\text{CH}_{17}\text{D}_3\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$ 416,3, найденное значение 416,4.

Свойства образцов R_p -4, 4 и S_p -4

Образцы R_p -4, 4 и S_p -4 анализировали с помощью рентгеновской порошковой дифрактометрии (XRPD), спектрометрии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (Фурье-ИК), дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), термогравиметрического анализа (TGA), гравиметрической сорбции паров (GVS), анализа термодинамической растворимости в воде и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Пример 20. Рентгеновская порошковая дифрактометрия

Образцы R_p -4, 4 и S_p -4 анализировали с помощью рентгеновской порошковой дифрактометрии (XRPD) по следующей схеме.

a. Bruker AXS/Siemens D5000

Порошковые дифрактограммы собирали на дифрактометре Siemens D5000, используя Cu K α -излучение (40 кВ, 40 мА), угломер θ - θ , расхождение V20 и приемных щелей, графитовый вторичный монохроматор и сцинтилляционный счетчик.

Производительность инструмента проверяли согласно сертифицированному стандарту Corundum (NIST 1976). Программное обеспечение, использованное для сбора данных, представляло собой Diffrac Plus XRPD Commander v2.3.1; данные анализировали и представляли с помощью Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 или v 13.0.0.2.

Условия окружающей среды

Образцы, запускавшиеся при условиях окружающей среды, были изготовлены как плоские пластинчатые препараты, использующие порошок непосредственно после получения. Приблизительно 35 мг образца аккуратно упаковывали в углубление в полированной кремниевой пластине с нулевым шумом (510). Во время анализа образец вращали в его плоскости. Подробности сбора данных были следующими: угловой диапазон: от 2 до 42° 2θ ; размер шага: 0,05° 2θ ; время сбора: 4 с.шаг⁻¹.

b. Bruker AXS C2 GADDS

Порошковые дифрактограммы собирали на дифрактометре Bruker AXS C2 GADDS, используя Cu K α -излучение (40 кВ, 40 мА), автоматический XYZ-предметный столик, лазерный видеомикроскоп для автоматического позиционирования образца и двумерный детектор площади HiStar. Рентгеновская оптика состояла из единственного многослойного зеркала Göbel, сопряженного с точечным 0,3-мм коллиматором.

Расходимость луча, т.е. эффективный размер рентгеновского луча на образце, составляла приблизительно 4 мм. При расстоянии образец-детектор 20 см, позволявшем получить эффективный 2 θ -диапазон 3,2°-29,7°, использовали непрерывный режим сканирования θ - θ . Обычно образец экспонировали для рентгеновского пучка в течение 120 с. Программное обеспечение, использованное для сбора данных, представляло собой GADDS для WNT 4.1.16; данные анализировали и представляли с помощью Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 или v 13.0.0.2.

Условия окружающей среды

Образцы, запускавшиеся при условиях окружающей среды, были изготовлены как плоские пластинчатые препараты без шлифовки, использующие порошок непосредственно после получения. Приблизительно 1-2 мг образца слегка запрессовывали в предметное стекло, получая плоскую поверхность.

Рентгеновская порошковая дифрактометрия (XRPD)

С помощью XRPD обнаружили, что соединение 4 являлось аморфным (см. фиг. 1). XRPD-анализ высокого разрешения образца R_p-4, полученного согласно примеру 3, подтвердил кристаллическую природу твердого вещества, порошковая дифрактограмма которого отличалась от дифрактограммы S_p-4 (полученного согласно примеру 4, способу 4), кристаллическая природа которого также подтверждалась. Результаты XRPD для R_p-4 и S_p-4 показаны в табл. 1, причем все пики, обладавшие интенсивностью $\leq 5\%$ (R_p-4) и $\leq 3\%$ (S_p-4), исключены.

Таблица 1. Данные XRPD для R_p-4 и S_p-4

Данные XRPD для R _p -4		Данные XRPD для S _p -4	
(Форма 1)			
Угол 2-тета °	Интенсивность %	Угол 2-тета °	Интенсивность %
6,616	51,1	4,900	6,8
7,106	40,5	5,190	19,8
8,980	30,0	7,501	100,0

026341

11,020	21,7	8,355	4,1
11,559	77,1	8,965	7,7
11,950	12,8	9,619	21,2
13,023	5,2	10,145	3,6
14,099	6,2	14,393	4,9
15,121	5,7	16,300	7,0
15,624	5,4	16,688	10,6
16,003	17,8	17,408	5,5
17,882	100,0	17,820	8,2
18,567	8,8	18,262	31,5
19,564	22,7	18,600	6,3
20,280	5,6	18,900	7,3
20,728	42,5	19,150	6,1
21,047	19,9	19,696	4,8
21,671	22,0	20,398	4,4
21,943	23,3	20,710	6,9
22,214	18,9	21,950	6,1
23,074	28,5	22,175	12,2
24,145	30,3	22,511	5,6
24,355	39,1	22,924	3,1
25,366	7,6	23,360	6,5
26,146	36,2	23,538	7,1
27,000	9,0	23,910	7,4
27,313	15,6	24,873	3,7
27,677	22,7	25,123	4,9
28,219	12,8	25,649	4,2
28,661	6,2	26,748	5,2
29,450	6,8	27,339	3,7
29,735	9,4	27,646	3,5
31,372	8,2	28,066	3,1
31,967	10,9	29,050	3,0
32,295	6,4	29,541	3,6
33,001	11,4	30,178	3,8
33,774	11,8	31,648	3,1
34,385	6,6	32,721	3,5
34,734	6,5	33,154	3,0
35,600	7,3	33,923	3,5
35,965	13,1	34,341	3,1
36,409	14,7	35,465	3,5
36,880	7,0	36,923	3,1
37,509	5,9	37,760	3,4
37,870	6,0	38,404	3,3
38,313	5,8	40,416	3,1
38,943	8,4		
40,093	6,6		
40,511	7,8		
41,429	6,5		

Образец Sp-4 измельчали с помощью ступки и пестика, а затем последовательно пропускали через сита с размером ячейки 500 и 250 мкм с целью получения образца в виде тонкодисперсного порошка.

Этот образец повторно анализировали XRPD высокого разрешения, которая подтвердила отсутствие изменений формы.

Пример 21. Исследования кристаллизации S_p-4

Кристаллический S_p-4 обладал полиморфизмом. Таким образом, аспект был направлен на кристаллический S_p-4 и его отдельные полиморфные формы. S_p-4 мог существовать, по меньшей мере, в виде пяти полиморфных форм, обозначенных как Формы 1-5. Кроме того, также можно было получить аморфный S_p-4. Типичная кристаллизация обеспечивала для растворения приблизительно 100 мг S_p-4 в соответствующем объеме растворителя для кристаллизации (ацетонитрил (5 объемов), хлороформ (5 объемов), п-бутилацетат (7 объемов), дихлорметан (50 объемов), метоксибензол (7 объемов) и 1:1 МТВЕ/гептан (50 объемов)), и, таким образом, позволяла выпаривать раствор при 5°C. Получали различные кристаллические формы, однако каждая форма после фильтрации и/или высушивания образовывала Форму 1.

Формы 1, 2 и 3 представляли собой несольватированную форму, 1:1 сольват ДХМ и 1:1 сольват хлороформа, соответственно, что подтвердили монокристалльным рентгеновским и XRPD-анализом. Формы 4 и 5 получали при кристаллизации S_p-4 из растворов ацетонитрила и метоксибензола соответственно. Достаточных данных для определения того, являлись ли Формы 4 и 5 несольватированными, гидратированными или сольватированными, не было получено, поскольку не были получены одиночные кристаллы достаточного качества. Формы 4 и 5 при фильтрации превращались в Форму 1. При кристаллизации S_p-4 из п-бутилацетата (ⁿBuAc) и раствора, содержавшего метил-трет-бутиловый эфир (МТВЕ) и гептан, получили две дополнительные кристаллические формы; при фильтрации обе эти кристаллические формы превращались в форму 1. Формы 2 и 3 также превращались в Форму 1 при выделении. Форма 1 представляла собой несольватированную форму, обладавшую широкой эндотермой плавления с температурой начала 94,3°C и ΔH_{fus} 24,0 кДж моль⁻¹. Дополнительная XRPD-дифрактограмма Формы 1 S_p-4 изображена на фиг. 4.

Превращение Формы 1 S_p-4 в Форму 6 S_p-4

Форму 1 можно было преобразовать в форму 6, по меньшей мере, двумя путями.

Во-первых, воздействием атмосферной влажности на тонкодисперсные кристаллы Формы 1 в течение нескольких суток получали моногидрат Формы 1 с появлением затвердевающей смолы. После измельчения моногидрата твердого вещества в тонкодисперсный порошок дифрактограмма оставалась соответствующей Форме 1. При нахождении в открытом сосуде в течение 6-10 недель молотый материал медленно превращался в Форму 6 в виде безводного твердого вещества. В герметичном контейнере Форма 1 была стабильной по меньшей мере в течение 2 лет.

В альтернативном случае Форму 1 можно было суспендировать в воде в количестве 5-50 мг/мл при комнатной температуре и через несколько часов преобразовать в Форму 6. Эффективность процесса преобразования в воде можно было улучшить за счет нагревания воды до определенного значения, при котором или выше которого можно растворить большее количество Формы 1 и увеличить текучесть несмешивающейся части S_p-4 от плотной смолы до суспендированного масла. Со временем Форма 6 могла начать кристаллизоваться при 50°C. Дальнейшее охлаждение суспензии до 0-10°C приводило к большому восстановлению твердого вещества. Кристаллизация из воды также удаляла большее количество полярных следовых примесей, приводя к повышению общей чистоты.

Повторное растворение Формы 6 в органическом растворителе, например, дихлорметане или ацетонитриле, с последующей кристаллизацией приводило к получению Формы 1 даже при затравке кристаллической Формой 6.

В сухую 100-мл одnogорлую круглодонную колбу, оснащенную резиновой перегородкой и магнитной мешалкой, загружали 1,04 г Формы 1 S_p-4. Чистота согласно ВЭЖХ 99,7%. Загружали 40 мл деионизованной воды. Начинали энергичное перемешивание суспензии при нагревании до 50°C. После достижения температуры 50°C раствор поддерживали в наиболее гомогенном состоянии в течение 60 мин; в это время твердые вещества начинали осаждаться из раствора, образуя тонкодисперсную суспензию. Суспензию охлаждали до 20°C в течение 90 мин и поддерживали в течение 16 ч при 20°C, после чего охлаждали до 0-5°C в течение 30 мин и поддерживали при 0-5°C в течение 2,5 ч. Суспензию фильтровали через воронку из среднепористого стекла и промывали 10 мл воды, охлажденной льдом. Влажный осадок высушивали отсасыванием в течение 2 ч, а затем высушивали в вакуумной печи в течение ночи (23 ч) при 50°C. Выделяли 0,88 г (восстановление 84,6%) Формы 6 S_p-4.

Наблюдаемая температура плавления Формы 6 составляла приблизительно 124,5-126°C.

Пример 21-1. Форма 1 S_p-4

Список пиков Формы 1 S_p-4 представлен в табл. 2

026341

Угол	Интенсивность %
2-тета °	%
5,0	74,8
7,3	100,0
7,8	2,2
8,2	6,8
8,8	9,3
9,4	23,5
10,0	8,4
11,4	4,2
13,3	3,0
14,2	6,1
14,9	3,5
16,1	7,9
16,6	13,2
17,3	15,4
17,7	10,1
18,1	42,6
18,4	7,6
18,7	11,4
18,9	5,7
19,3	5,0
19,6	2,9
20,2	8,5
20,5	11,5
20,8	3,6
21,8	7,2
22,0	14,5
22,4	9,6
23,2	5,3
23,4	5,8
23,5	4,6
23,8	7,4
24,0	3,1
24,7	2,5
25,0	13,0
25,5	3,1
26,6	4,5
27,2	3,2
27,5	2,2
28,1	2,9
30,0	3,2

Пример 21-2. Форма 2 Sp-4
 XRPD-дифрактограмма Формы 2 Sp-4 изображена на фиг. 5. Список пиков Формы 2 Sp-4 представлен в табл. 3.

Угол	Интенсивность %
2-тета °	%
4,9	44,1
5,1	19,1
6,9	62,1
8,7	6,8
9,8	28,6
10,1	10,4
13,7	7,0
16,7	3,1
19,5	8,9
19,8	45,5
20,1	18,6
20,4	3,6
20,6	25,6
20,9	15,9
21,1	10,9
22,1	3,4
24,6	38,7
24,7	100,0
25,1	61,2
26,1	53,3
39,0	6,3

Пример 21-3. Форма 3 S_p-4

ХРРД-дифрактограмма Формы 3 S_p-4 изображена на фиг. 6. Список пиков Формы 3 S_p-4 представлен в табл. 4.

Угол	Интенсивность %
2-тета °	%
5,0	10,0
6,9	23,3
9,8	22,6
19,7	34,8
20,6	100,0
21,8	10,5
24,6	65,3
34,7	4,1

Пример 21-4. Форма 4 S_p-5

ХРРД-дифрактограмма Формы 4 S_p-4 изображена на фиг. 7. Список пиков Формы 4 S_p-4 представлен в табл. 5.

Угол	Интенсивность %
2-тета °	%
5,0	29,8
6,8	100,0
8,2	4,8
8,7	5,2
9,9	3,8
13,7	1,7
14,9	4,8
19,9	22,5
20,4	2,1
20,6	20,0
20,9	20,0
24,7	3,4
24,9	29,9
25,1	1,5
36,8	3,1

Пример 21-5. Форма 5 Sp-4

ХРПД-дифрактограмма Формы 5 Sp-4 изображена на фиг. 8. Список пиков Формы 5 Sp-4 представлен в табл. 6.

Угол	Интенсивность %
2-тета °	%
5,2	52,9
6,6	100,0
7,1	25,9
9,7	12,1
10,4	16,4
13,4	11,4
15,7	25,8
19,1	31,1
19,9	12,9
20,0	9,0
21,3	3,5
25,0	22,3
25,6	2,3
26,3	5,9
26,9	2,0
31,7	2,1

Пример 21-5. Форма 6 Sp-4

ХРПД-дифрактограмма Формы 6 Sp-4 изображена на фиг. 21. Список пиков Формы 6 Sp-4 представлен в следующей таблице.

Угол 2-тета °	d-интервал Å	Интенсивность %
6,08	14,51	66,7
8,2	10,77	62,1
10,38	8,52	29,8
10,85	8,14	10,4
12,17	7,26	12,0
12,7	6,96	66,4
13,73	6,44	14,9
14,1	6,27	13,8
15,91	5,57	3,1
16,83	5,26	8,7
17,17	5,16	19,7
17,66	5,01	56,2
17,95	4,93	37,7
18,79	4,72	59,0
19,1	4,64	14,3
19,41	4,57	37,2
19,8	4,48	46,0
20,11	4,41	68,8
20,82	4,26	100,0
21,81	4,07	36,8
22,03	4,03	7,4
23,03	3,86	14,2
23,26	3,82	21,6
23,64	3,76	6,3
23,89	3,72	7,0
24,73	3,6	3,3

Пример 21-7. Sp-4 (аморфный)

XRPD-дифрактограмма аморфного Sp-4 изображена на фиг. 9.

Пример 22. Монокристаллическая рентгеновская кристаллография Sp-4 и его сольватов

Пример 22-1. Монокристаллическая рентгеновская кристаллография Sp-4 (Формы 1)

На фиг. 10 показана рентгеновская кристаллическая структура Формы 1 Sp-4. На фигуре показан вид молекул Формы 1 согласно кристаллической структуре, показывающий использованную схему нумерации. Эллипсоиды анизотропного смещения атомов, не являющихся атомами водорода, показаны с уровнем вероятности 50%. Атомы водорода изображены с произвольно малым радиусом. Расчет структуры получили с использованием прямых способов, оптимизации полной матрицы наименьших квадратов по F^2 с весовыми коэффициентами $w^{-1} = \sigma^2 (F_o^2) + (0,0592P)^2 + (0,6950P)$, где $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$, параметров анизотропного смещения, эмпирической коррекции поглощения с помощью сферических гармоник, реализованных в алгоритме масштабирования SCALE3 ABSPACK. Конечный $wR^2 = \{ \Sigma [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \Sigma [w(F_o^2)^2]^{1/2} \} = 0,0871$ для всех данных, традиционный $R_1 = 0,0329$ по значениям F 7090 отражений с $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,016$ для всех данных и 870 параметров. Конечный $\Delta/\sigma(\text{макс.})$ 0,001, $\Delta/\sigma(\text{средний})$, 0,000. Конечное различие располагается между +0,534 и -0,36 $e/\text{Å}^3$.

Таблица 7. Параметры элементарной ячейки Формы 1

Молекулярная формула	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Молекулярная масса	529,45				
Кристаллическая система	Моноклинная				
Пространственная группа	P2 ₁	a	20,0898(5) Å,	α	90°,
		b	6,10290(10) Å,	β	112,290(3)°,
		c	23,0136(6) Å,	γ	90°
V	2610,79(10) Å ³				
Z	4				
D _c	1,347 г.см ⁻¹				
μ	1,475 мм ⁻¹				
Источник, λ	Cu Kα, 1,54178 Å				
F(000)	1112				
T	100(1) К				
Кристалл	Бесцветная пластина, 0,12×0,09×0,03 мм				
Данные усечены до	0,80 Å				
θ _{max}	74,46°				
Завершенность	99,4%				
Отражения	14854				
Уникальные отражения	7513				
R _{int}	0,0217				

Пример 22-2. Монокристаллическая рентгеновская кристаллография S_p-4 (Формы 2)

На фиг. 11 показана рентгеновская кристаллическая структура Формы 2 S_p-4. На этой фигуре показан вид молекул Формы 2 согласно кристаллической структуре, показывающий использованную схему нумерации. Гетероатомы разрешали изотропно вследствие крайне недостаточных данных. Атомы водорода не изображены.

Решение структуры получили с использованием прямых способов, оптимизации полной матрицы наименьших квадратов по F² с весовыми коэффициентами $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0975P)^2 + (10,6969P)$, где $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, параметров анизотропного смещения, эмпирической коррекции поглощения с помощью сферических гармоник, реализованных в алгоритме масштабирования SCALE3 ABSPACK. Конечный $wR^2 = (\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum[w(F_o^2)^2])^{1/2} = 0,1883$ для всех данных, традиционный R₁=0,0741 по значениям F 2525 отражений с F_o>4σ(F_o), S=1,05 для всех данных и 158 параметров. Конечный Δ/σ(макс.) 0,000, Δ/σ(средний) 0,000. Конечное различие располагается между +1,388 и -0,967 е/Å⁻³.

Таблица 8. Параметры элементарной ячейки Формы 2

Молекулярная формула	C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ FN ₃ O ₉ P				
Молекулярная масса	614,38				
Кристаллическая система	Моноклинная				
Пространственная группа	P2 ₁	a	12,8315(3) Å,	α	90°,
		b	6,14530(10) Å,	β	91,752(2)°,
		c	17,6250(4) Å,	γ	90°
V	1389,14(5) Å ³				
Z	2				
D _c	1,469 г.см ⁻¹				
μ	3,196 мм ⁻¹				
Источник, λ	Cu-K, 1,54178 Å				
F(000)	640				
T	293(2) К				
Данные усечены до	0,80 Å				
θ _{max}	62,23°				
Завершенность	91,1%				
Отражения	3528				
Уникальные отражения	2562				
R _{int}	0,0227				

Пример 22-3. Монокристаллическая рентгеновская кристаллография S_p-4 (Формы 2)

На фиг. 12 показана рентгеновская кристаллическая структура (ORTEP - анизотропный) S_p-4 (Формы 2).

Кристаллическая структура метилхлоридного сольвата S_p-4 (Формы 2), $C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$, давала моноклинную пространственную группу $P2_1$ (систематические отсутствия $0k0$: k =нечетное) с $a=12,8822$ (14) Å, $b=6,1690(7)$ Å, $c=17,733(2)$ Å, $\beta=92,045(3)^\circ$, $V=1408,4(3)$ Å³, $Z=2$ и $d_{\text{расч}}=1,449$ г/см³. Данные рентгеновской интенсивности получали на ПЗС-детекторе площади Rigaku Mercury, используя графит-монохроматизированное излучение $Mo-K\alpha$ ($\lambda=0,71073$ Å) при температуре 143 К. Предварительный расчет индексов выполняли на основе серии из двенадцати снимков при повороте на $0,5^\circ$ с временем экспозиции 30 с. Всего было собрано 648 снимков поворота при расстоянии от кристалла до детектора 35 мм, угле отклонения 2θ -12° , интервале поворота $0,5^\circ$ и времени экспозиции 30 с: скан № 1 представлял собой φ -скан от 315° до 525° при $\omega=10^\circ$ и $\chi=20^\circ$; скан № 2 представлял совместный скан от -20° до 5° при $\chi=-90^\circ$ и $\varphi=315^\circ$; скан № 3 представлял собой ω -скан от -20° до 4° при $\chi=-90^\circ$ и $\varphi=135^\circ$; скан № 4 представлял собой ω -скан от -20° до 5° при $\chi=-90^\circ$ и $\varphi=225^\circ$; скан № 5 представлял собой ω -скан от -20° до 20° при $\chi=-90^\circ$ и $\varphi=45^\circ$. Снимки поворота обрабатывали с помощью CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), генерировавшего список неусредненных значений F^2 и $\sigma(F^2)$, которые затем передавали в программный пакет CrystalStructure (CrystalStructure: программный пакет анализа кристаллической структуры, Rigaku Corp. Rigaku/MSO (2002)) для дальнейшей обработки и расчета структуры на компьютере Dell Pentium III. Всего измерили 7707 отражений в диапазонах $5,48 \leq 2\theta \leq 50,04^\circ$, $14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$, что позволило получить 4253 уникальных отражений ($R_{\text{int}}=0,0180$). Данные интенсивности скорректировали с учетом эффектов Лоренца и поляризации и поглощения с помощью REQAB (минимальное и максимальное пропускание 0,824, 1,000).

Структуру рассчитывали с помощью прямых способов (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). J. Appl. Cryst., 32, 115-119). Оптимизацию выполняли с помощью полной матрицы наименьших квадратов по F^2 , используя SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64, 112-122). Во время оптимизации использовали все отражения. Схема расчета весовых коэффициентов представляла собой $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + 0,0472P^2 + 0,4960P]$, где $P=(F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Атомы, не являющиеся атомами водорода, оптимизировали анизотропно, а атомы водорода оптимизировали с помощью модели "верховой езды". Оптимизация сошлась при $R_1=0,0328$ и $wR_2=0,0817$ для 4046 отражений, для которых $F > 4\sigma(F)$ и $R_1=0,0348$, $wR_2=0,0838$ и $GOF=1,056$ для всех 4253 уникальных, ненулевых отражений и 358 переменных ($R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR_2 = \{ \sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2 \}^{1/2}$; $GOF = \{ \sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n-p) \}^{1/2}$; где n =количество отражений, а p =количество оптимизированных параметров). Максимальный Δ/σ в конечном цикле расчета наименьших квадратов составил 0,000, а два наиболее выраженных пика при конечной разности Фурье составляли $+0,312$ и $-0,389$ е/Å³. Оптимизированный параметр абсолютной структуры Флака составлял $-0,06(6)$, тем самым подтверждая стереохимию соединения.

В табл. 1 перечислены сведения о ячейке, параметры сбора данных и данные оптимизации. Конечные параметры положения и эквивалентные изотропные тепловые параметры приведены в табл. 2. Анизотропные тепловые параметры представлены в табл. 3.

("ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations". С.К. Johnson (1976) ORNL-5138.) показано представление молекулы с 30% вероятностью эллипсоидов теплового смещения.

Таблица 9. Краткие сведения об определении структуры соединения $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$

Формула:	$C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$
Молекулярная масса по формуле:	614,38
Класс кристалла:	моноклинный
Пространственная группа:	$P2_1$ (#4)
Z	2

Константы ячейки:	
a	12,8822(14) Å
b	6,1690(7) Å
c	17,733(2) Å
β	92,045(3) °
V	1408,4(3) Å ³
ρ	3,48 см ⁻³
размер кристалла, мм	0,42×0,12×0,10
D _{расч}	1,449 г/см ³
F(000)	640
Излучение:	Mo-K α ($\lambda=0,71073$ Å)
диапазон 2 θ	5,48-50,04 °
собранные hkl:	-14≤h≤15; -7≤k≤6; -19≤l≤21
Количество измеренных отражений:	7707
Количество уникальных отражений:	4253 (R _{int} =0,0180)
Количество наблюдаемых отражений	4046 (F>4 σ)
Количество отражений, использованных при оптимизации	4253
Количество параметров	358
Показатели R (F>4 σ)	R ₁ =0,0328 wR ₂ =0,0817
Показатели R (все данные)	R ₁ =0,0348 wR ₂ =0,0838
GOF:	1,056
Пики конечных различий, e/Å ³ .	+0,312, -0,389

Пример 22-4. Монокристаллическая рентгеновская кристаллография S_p-4 (Формы 3)

На фиг. 13 показана рентгеновская кристаллическая структура Формы 3 S_p-4. На этой фигуре показан вид молекул.

Формы 3 согласно кристаллической структуре, показывающий использованную схему нумерации. Эллипсоиды анизотропного смещения атомов, не являющихся атомами водорода, показаны с уровнем вероятности 50%. Атомы водорода изображены с произвольно малым радиусом.

Решение структуры получили с использованием прямых способов, оптимизации полной матрицы наименьших квадратов по F² с весовыми коэффициентами $w^{-1}=\sigma^2(F_o^2)+(0,0512F)^2+(0,6810P)$, где $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$, параметров анизотропного смещения, эмпирической коррекции поглощения с помощью сферических гармоник, реализованных в алгоритме масштабирования SCALE3 ABSPACK. Конечный $wR^2=\{\sum[w(F_o^2-F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2}=0,0796$ для всех данных, традиционный R₁=0,0294 по значениям F 2486 отражений с F_o>4 σ (F_o), S=1,068 для всех данных и 377 параметров. Конечный Δ/σ (макс.) 0,001, Δ/σ (средний), 0,000. Конечное различие располагается между +0,211 и -0,334 e/Å³.

Таблица 10. Параметры элементарной ячейки Формы 3

Молекулярная формула	$C_{23}H_{30}Cl_3F_1N_3O_9P_1$				
Молекулярная масса	648,82				
Кристаллическая система	Моноклинная				
Пространственная группа	P21	a	12,9257(4) Å,	α	90°,
		b	6,18080(10) Å,	β	96,399(2)°,
		c	18,0134(4) Å,	γ	90°
V	1430,15(6) Å ³				
Z	2				
D _c	1,507 г.см ⁻³				
μ	3,977 мм ⁻¹				
Источник, λ	Cu K α , 1,54178 Å				
F(000)	672				
T	100(1) K				
Кристалл	Бесцветная игла, 0,22×0,03×0,02 мм				
Данные усечены до	0,80 Å				
θ_{max}	74,41°				
Завершенность	69,1%				
Отражения	3062				
Уникальные отражения	2607				
R _{int}	0,0198				

Пример 23. Стабильность при повышенных температурах и относительной влажности

Образец R_p-4 хранили в камере влажности при 40°C и 75% относительной влажности в течение недели, после чего повторно анализировали с помощью XRPD. Порошковая дифрактограмма, полученная для R_p-4, не показала существенных изменений в ходе эксперимента, что означало отсутствие наблюдаемых изменений формы твердого вещества. Это составляло контраст с образцом соединения 4, который разжижился в течение приблизительно 16 ч при хранении при 40°C и 75% относительной влажности. На практике разжижающаяся природа соединения 4 иллюстрировалась следующим экспериментом. Образец соединения 4 пропускали через сито с размером ячеек 250 мкм, после чего образцы хранили при 40°C/75% относительной влажности и 25°C/53% относительной влажности и через регулярные интервалы выполняли визуальное обследование. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 11. Стабильность соединения 4 при повышенной относительной влажности

Условия	t=1,5 ч	t=4,5 ч	t=6,5 ч	t=8,5 ч	t=73 ч
40°C/75%					
относительной влажности	Разжижение	-	-	-	-
25°C/53%					
относительной влажности	Разжижение отсутствует	Вязкое твердое вещество	Частичное разжижение	Почти полное разжижение	Разжижение

При хранении при 40°C и 75% относительной влажности образец S_p-4 разжижился в пределах 16 часов. Например, образец S_p-4 измельчали с помощью ступки и пестика, а затем последовательно пропускали через сита с размером ячейки 500 и 250 мкм с целью получения образца в виде тонкодисперсного порошка. Образцы этого материала хранили при 40°C и 75% относительной влажности и 25°C и 53% относительной влажности и через регулярные интервалы выполняли визуальное обследование. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 12. Стабильность S_p-4 при повышенной относительной влажности.

Условия	t=1,5 ч	t=4,5 ч	t=104 ч
40°C/75%			
относительной влажности	Разжижение отсутствует	Разжижение	-
25°C/53%			
относительной влажности	Разжижение отсутствует	Разжижение отсутствует	Разжижение отсутствует

ХРПД-анализ образца после хранения при 25°C и 53% относительной влажности в течение 104 ч не показал существенных изменений полученных диффрактограмм, что означало отсутствие изменений формы.

Пример 24. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (Фурье-ИК)

Данные получали на Perkin-Elmer Spectrum One, оснащенном универсальным пробоотборным приспособлением затухающего полного отражения (ATR). Данные получали и анализировали с помощью программного обеспечения Spectrum v5.0.1.

ИК-спектры, полученные для 4, R_p-4 и S_p-4, показаны на фиг. 5-7, соответственно. Выбранные пики, выраженные в волновых числах (см⁻¹), приведены ниже:

4: ~1680, ~1454, ~1376, ~205, ~1092, ~1023 (фиг. 14);

RP-4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (фиг. 15);

и

SP-4 (Форма 1): ~1743, ~1713, ~1688, ~1454, ~1378, ~1208, ~1082 (фиг. 16).

Пример 25. Дифференциальная сканирующая калориметрия (DCS).

Термогравиметрический анализ (TGA)

Данные DSC получали на TA Instruments Q2000, оснащенном 50-позиционным автоматическим пробоотборником. Калибровку теплоемкости осуществляли с помощью сапфира, а калибровку энергии и температуры - с помощью сертифицированного индия.

DSC с регулируемой температурой обычно выполняли, используя 0,8-1,2 мг каждого образца, в алюминиевой кювете с микроотверстиями, с помощью исходной скорости нагревания 2°C·мин⁻¹ и параметрами регулировки температуры ±0,2°C·мин⁻¹ и 40 с. Образец продували сухим азотом со скоростью 50 мл·мин⁻¹.

Для управления прибором использовали программное обеспечение Advantage for Q Series v2.8.0.392 и Thermal Advantage v4.8.3, данные анализировали с помощью Universal Analysis v4.3A.

Данные DSC получали на Mettler DSC 823e, оснащенном 34-позиционным автоматическим пробоотборником. Прибор калибровали по энергии и температуре, используя сертифицированный индий. Обычно 0,8-1,2 мг каждого образца в алюминиевой кювете с микроотверстиями нагревали при 10°C·мин⁻¹ с 25 до 250°C. Образец продували азотом со скоростью 50 мл·мин⁻¹. Для управления прибором и анализа данных использовали программное обеспечение STARe v9.20.

Данные DSC для S_p-4 (Формы 6) получали с помощью прибора DSC (TA Q2000), используя скорость нагревания 10°C/мин в непрерывном потоке сухого газообразного азота (100 мл/мин). Приблизительно 2,2 мг образца аккуратно взвешивали и нагревали в негерметичной кювете 'Tzero' с неплотно прилегающей крышкой. Прибор калибровали (по энтальпии и температуре), используя индиевый стандарт и (по теплоемкости) сапфировый стандарт. Факторы неопределенности оценивали как ±0,1°C для температуры и ±5% для измеренных значений энтальпии. Для измерения температуры начала разложения использовали программное обеспечение TA Universal Analysis.

Данные TGA получали на Mettler TGA/SDTA 851e, оснащенном 34-позиционным автоматическим пробоотборником. Прибор калибровали по температуре, используя сертифицированный индий. Обычно 8-12 мг каждого образца помещали в предварительно взвешенный алюминиевый тигель и нагревали при 10°C·мин⁻¹ от комнатной температуры до 350°C. Образец продували азотом со скоростью 50 мл·мин⁻¹. Для управления прибором и анализа данных использовали программное обеспечение STARe v9.20.

DSC-анализ соединения 4 показал наличие единственной широкой эндотермы с началом при 58,7°C (ΔH 14 Дж·г⁻¹), которая, согласно дальнейшему регулируемому DCS-анализу, была обусловлена молекулярной релаксацией во время стеклования (фиг. 17). TGA-анализ соединения 4 не показал потери массы до разложения при температуре свыше 240°C, подтверждая, что материал был несольватированным. Поскольку XRPD-анализ соединения 4 подтвердил, что материал являлся аморфным, выполнили регулируемый DSC-анализ с целью попытки расчета температуры стеклования, которая оказалась равна 57°C.

DSC-анализ показал наличие единственной остроконечной эндотермы с началом при 136,2°C (ΔH 76 Дж·г⁻¹), которая согласно высокотемпературной микроскопии представляла собой плавление. См. фиг. 18. TGA-анализ R_p-4 не показал потери массы до разложения при температуре свыше 240°C, подтверждая, что материал был несольватированным.

DSC-анализ S_p-4 показал наличие единственной широкой эндотермы с началом при 93,9°C (ΔH 43 Дж·г⁻¹), которая, согласно высокотемпературной микроскопии, представляла собой плавление. См. фиг. 19. TGA-анализ S_p-4 не показал потери массы до разложения при температуре свыше 240°C, подтверждая, что материал был несольватированным.

DSC-анализ S_p-4 (Формы 6) показал наличие широкой эндотермы с началом при 120,7°C (ΔH 79 Дж·г⁻¹).

Пример 26. Гравиметрическая сорбция паров (GVS) SMS DVS Intrinsic

Изотермы сорбции получали с помощью анализатора сорбции влажности SMS DVS Intrinsic, контролируемого программным обеспечением SMS Analysis Suite. Температуру образца поддерживали при 25°C с помощью прибора. Влажность контролировали, смешивая потоки сухого и влажного азота при

общей скорости потока 200 мл·мин⁻¹. Относительную влажность измеряли калиброванным зондом Rotronic (динамический диапазон 1,0-100% относительной влажности), расположенным около образца. Изменение массы (релаксацию массы) образца в зависимости от относительной влажности (%) непрерывно отслеживали с помощью микровесов (точность $\pm 0,005$ мг).

Обычно 5-20 мг образца помещали в тарированную сетчатую корзину из нержавеющей стали при условиях окружающей среды. Образец помещали и извлекали при 40% относительной влажности и 25°C (типичные комнатные условия). Изотерму сорбции влажности получали, как описано ниже (за 2 скана, составлявшие один полный цикл). Стандартную изотерму получали при 25°C с 10% интервалами относительной влажности в диапазоне относительной влажности 0,5-90%.

Таблица 13. Параметры способа для экспериментов с SMS DVS Intrinsic

Параметры	Значения
Адсорбция - скан 1	40-90
Десорбция/Адсорбция - скан 2	90-0, 0-40
Интервалы (% относительной влажности)	10
Количество сканов	2
Скорость потока (мл·мин ⁻¹)	200
Температура (°C)	25
Стабильность (°C·мин ⁻¹)	0,2
Время сорбции (часов)	таймаут 6 часов

После завершения изотермы образец восстанавливали и повторно анализировали XRPD.

GVS-анализ показал, что R_p-4 являлся негигроскопическим и демонстрировал обратимое поглощение приблизительно 0,2 мас.% воды при увеличении относительной влажности от 0 до 90%. Повторный анализ образца с помощью XRPD после GVS-эксперимента не показал изменений формы.

Образец S_p-4 измельчали с помощью ступки и пестика, а затем последовательно пропускали через сита с размером ячейки 500 и 250 мкм с целью получения образца в виде тонкодисперсного порошка, который затем анализировали с помощью способа модифицированного одиночного цикла. Образец переносили с 40% относительной влажности (приблизительно комнатной) в условия с 60% относительной влажности вместо 90% для стандартного способа, а затем изменяли относительную влажность до 0% и обратно до 40% относительной влажности. Этот анализ показал, что S_p-4 являлся негигроскопическим до 60% относительной влажности, обратимо поглощая ~0,2 мас.% воды при увеличении относительной влажности от 0 до 60%.

Пример 27. Термодинамическая растворимость в воде

Растворимость в воде определяли путем суспендирования достаточного количества соединения в воде, получая максимальную конечную концентрацию исходной произвольной формы соединения ≥ 10 мг·мл⁻¹. Суспензию уравнивали при 25°C в течение 24 ч, а затем измеряли pH. Затем фильтровали суспензию через стекловолоконный фильтр С в 96-луночный планшет. Затем фильтрат разбавляли в 101 раз. Количественное определение выполняли с помощью ВЭЖХ по отношению к стандартному раствору приблизительно 0,1 мг·мл⁻¹ в ДМСО. Вводили различные объемы стандарта, разбавленного и неразбавленного раствора образца. Растворимость рассчитывали на основе площадей пиков, определенных слиянием пика, наблюдаемого при том же времени удерживания, что и основной пик при введении стандарта.

Таблица 14. Параметры ВЭЖХ-способа для измерений растворимости

Тип способа:	Обращенно-фазная хроматография с градиентным элюированием
Колонка:	Phenomenex Luna, C18 (2) 5 мкм 50×4,6 мм
Температура колонки (°C)	25
Введения стандарта (мкл)	1, 2, 3, 5, 7, 10
Введения тестируемого	1, 2, 3, 10, 20, 50

образца (мкл)			
Обнаружение:			
Длина волны, полоса пропускания (нм):	260, 80		
Скорость потока (мл.мин ⁻¹):	2		
Фаза А:	0,1% ТФУК в воде		
Фаза В:	0,085% ТФУК в ацетонитриле		
График:	Время (мин)	% фазы А:	% фазы В:
	0,0	95	5
	1,0	80	20
	2,3	5	95
	3,3	5	95
	3,5	95	5
	4,4	95	5

Анализ выполняли при вышеуказанных условиях с помощью системы Agilent HP1100 series, оборудованной детектором на диодной матрице, используя программное обеспечение ChemStation vB.02.01-SR1.

Таблица 15. Результаты растворимости в воде для R_p-4, 4 и S_p-4

ID образца	pH	Растворимость/ мг. мл ⁻¹	Комментарии
	неотфильтрованной смеси		
R _p -4	7,12	1,58	Суспензия
4	7,03	6,11	Остаточное твердое вещество
S _p -4	6,88	5,65	Остаточное твердое вещество

Пример 28. ВЭЖХ-определение химической чистоты

Для определения химической чистоты соединений, описанных здесь, использовали различные условия ВЭЖХ. Один из таких примеров описан здесь по отношению к исследованиям термодинамической растворимости в воде. Другие примеры описаны ниже.

Условия ВЭЖХ:

ЖХ: Модуль разделения Waters Alliance 2695 Separations Module, детектор Waters 2996 PDA и программное обеспечение Waters Empower 2 (версия 6.00)

Колонка: Phenomenex Luna C18(2); 4,6x50 мм; 3 мкм

Скорость потока: 1,2 мл/мин

Вводимый объем: 10 мкл

Подвижная фаза: Растворитель А: 95% воды с 5% метанола и 10 мм ацетата аммония; pH~5,3

Растворитель В: MeOH с 10 mM ацетата аммония

Градиент: поддержание при 0%B 3 мин

0-47%B 3-4 мин

поддержание при 47%B 4-10 мин

47%-74%B 10-11 мин

поддержание при 74%B 11-13,5 мин

возвращение к 0%B 13,5-13,6 мин

поддержание при 0%B 13,6-15,5 мин

При этих условиях определили, что чистота 4, R_p-4 и S_p-4 составляла ~99,6, ~99% и ~99,5% соответственно. Следует отметить, что при оптимизации вышеописанных способов можно достичь более высокой чистоты.

Обследование XRPD-дифрактограмм показало, что два кристаллических отдельных диастереомера давали однозначно разные XRPD-дифрактограммы. Кроме того, температуры плавления этих двух кристаллических диастереомеров были безусловно различными, причем R_p-4 характеризовался существенно более высокой температурой начала плавления, чем S_p-4 (136°C по сравнению с 94°C).

Пример 29. Дополнительные способы разделения

Следующие SFC-разделения (условия перечислены ниже) обеспечивали адекватное разделение смеси диастереомеров R_p-4 и S_p-4.

Препаративный способ:	Аналитический способ:
Chiralpak AS-H (2×25 см) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25×0,46 см)
20% метанол/CO ₂ (100 бар)	20% метанол/CO ₂ (100 бар)
50 мл/мин, 220 нм.	3 мл/мин, 220 нм.
Концентрация: 260 мг/30 мл метанола, вводимый объем: 1,5 мл	

Следующие SFC-разделения (условия перечислены ниже) обеспечивали адекватное разделение смеси диастереомеров R_p-4 и S_p-4.

Препаративный способ:	Аналитический способ:
Chiralpak IA (2×15 см) 802091	Chiralpak IA (15×0,46 см)
30% изопропанол (0,1% DEA)/CO ₂ , 100 бар	40% метанол (DEA)/CO ₂ , 100 бар
60 мл/мин, 220 нм.	3 мл/мин, 220 нм.
Вводимый объем: 2 мл, 20 мг/мл метанола	

Таблица 16. Сводка результатов оценки характеристик R_p-4, 4 и S_p-4

Анализ	R _p -4	4	S _p -4
Протонный ЯМР	Одиночный диастереомер	Смесь диастереомеров 1:1	Одиночный диастереомер
XRPD	Кристаллический - отличающийся от S _p -4.	Аморфный	Кристаллический - отличающийся от R _p -4.
DSC	Эндотерма; плавление - 136°C	Эндотерма; 59°C	Эндотерма; плавление - 94°C
TGA	Потери массы отсутствуют, разложение >240°C	Потери массы отсутствуют, разложение >240°C	Потери массы отсутствуют, разложение >240°C
ИК	См. выше	См. выше	См. выше
Растворимость в воде (мг.мл ⁻¹)	1,58	6,11	5,65
Чистота согласно ВЭЖХ	96,9%	99,6%	99,5%
40°C/75% относительной влажности	Изменение формы отсутствует	Разжижение в пределах 1,5 ч	Разжижение в пределах 4,5 ч
25°C/53% относительной влажности	-	Разжижение	Изменение формы отсутствует
GVS	Негигроскопичен до 90% относительной влажности	-	Негигроскопичен до 60% относительной влажности

Пример 30. Рентгеновская кристаллография соединения 8 (S_p-изомер)

Соединение 8 (S_p-изомер), C₁₈H₂₁N₂PO₇, кристаллизовалось в моноклинную пространственную группу P2₁ (систематические отсутствия 0k0: k=нечетное) с a=5,3312(4) Å, b=15,3388(8) Å, c=23,7807(13) Å, β=92,891(3)°, V=1942,2(2) Å³, Z=4 и ρ=1,397 г/см³. Данные рентгеновской интенсивности получали на ПЗС-детекторе площади Bruker APEXII d_{расч}, используя графит-монохроматизированное излучение Mo-Kα (λ=0,71073 Å) при температуре 100(1)К. На фиг. 20А и 20В показаны молекулы асимметричной единицы номер 1 и 2 соответственно.

Предварительный расчет индексов выполняли на основе серии из тридцати шести снимков при повороте на 0,5° с временем экспозиции 30 с. Всего было собрано 3608 снимков при расстоянии от кристалла до детектора 70,00 мм, интервале поворота 0,5° и времени экспозиции 20 с.

ТИП скана	2θ	ω	ϕ	χ	СНИМКИ
ϕ	-35,50	279,40	27,32	48,96	725
ϕ	24,50	22,31	35,56	69,08	692
ω	-13,00	321,68	247,79	69,08	95
ϕ	34,50	204,08	28,21	-92,80	293
ϕ	-30,50	310,60	214,10	54,21	361
ϕ	32,00	304,67	24,47	50,72	722
ϕ	-35,50	122,14	316,59	-78,84	720

Снимки поворота объединяли с помощью SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Мадисон, штат Висконсин, США), позволяющей получить список неусредненных значений F^2 и $\sigma(F^2)$, которые затем передавали в программный пакет SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Мадисон, штат Висконсин, США) для дальнейшей обработки и расчета структуры на компьютере Dell Pentium 4. Всего измерили 6909 отражений в диапазонах $1,58 \leq \theta \leq 25,09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$, что позволило получить 6909 уникальных отражений ($R_{int}=0,0581$). Данные интенсивности скорректировали с учетом эффектов Лоренца и поляризации и поглощения с помощью SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Germany) (минимальное и максимальное пропускание 0,6093, 0,7452).

Структуру рассчитывали с помощью прямых способов (SHELXL-97(Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64, 112-122)). Оптимизацию выполняли с помощью полной матрицы наименьших квадратов по F^2 , используя SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64, 112-122). Во время оптимизации использовали все отражения. Схема расчета весовых коэффициентов представляла собой $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0000P)^2 + 14,0738P]$, где $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$.

Атомы, не являющиеся атомами водорода, оптимизировали анизотропно, а атомы водорода оптимизировали с помощью модели "верховой езды". Оптимизация сошлась при $R1=0,0847$ и $wR2=0,1899$ для 6173 отражений, для которых $F > 4\sigma(F)$ и $R1=0,0963$, $wR2=0,1963$ и $GOF=1,119$ для всех 6909 уникальных, ненулевых отражений и 512 переменных ($R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n-p)]^{1/2}$; где n =количество отражений, а p =количество оптимизированных параметров). Максимальный Δ/σ в конечном цикле расчета наименьших квадратов составил 0,000, а два наиболее выраженных пика при конечной разности Фурье составляли +0,402 и -0,559 $e/\text{Å}^3$. Фиг. 20А и 20В представляют собой ORTEP (30% вероятность тепловых эллипсоидов) молекул асимметричной единицы номер 1 и 2.

Таблица 17. Краткие сведения об определении структуры соединения 8 (S_p -изомер)

Эмпирическая формула	$C_{18}H_{21}N_2PO_7$
Молекулярная масса по формуле	408,34
Температура	100(1) K
Длина волны	0,71073 Å
Сингония	Моноклиная
Пространственная группа	$P2_1$
Константы ячейки:	
a	5,3312(4) Å
b	15,3388(8) Å
c	23,7807(13) Å
β	92,891(3) °

Объем	1942,2(2) Å ³
Z	4
Плотность (рассчитанная)	1,397 Mg/м ³
Коэффициент поглощения	0,185 мм ⁻¹
F(000)	856
Размер кристалла	0,40×0,10×0,08 мм ³
Тета-диапазон для получения данных	от 1,58 до 25,09°
Диапазоны индекса	-6≤h≤6, -18≤k≤18, -28≤l≤28
Собранные отражения	6909
Независимые отражения	6909 [R(int)=0,0581]
Завершенность до тета=25,09°	99,6%
Коррекция поглощения	Полуэмпирическая на основе эквивалентов
Макс. и мин. пропускание	0,7452 и 0,6093
Способ оптимизации:	Полная матрица наименьших квадратов по F ²
Данные/ограничения/параметры	6909/1/512
Критерий согласия по F ²	1,119
Конечные показатели R [I>2 сигма (I)]	R1=0,0847, wR2=0,1899
Показатели R (все данные)	R1=0,0963, wR2=0,1963
Параметр абсолютной структуры	0,1(2)
Наибольшая разность пика и впадины	0,402 и -0,559 е.Å ⁻³

Пример 32. Рентгеновская кристаллография (S)-изопропил 2-(((S)-(перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата.

(S)-изопропил 2-(((S)-(перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат, C₁₈H₁₇NPO₅F₅, кристаллизовался в триклинную пространственную группу P1 с 5,2641(6) Å, b=12,0548(13) Å, c=16,4307(15) Å, α=74,960(4)°, β=83,959(4)°, γ=80,275(4)°, V=990,40(18) Å³, Z=2 и d_{расч}=1,520 г/см³. Данные рентгеновской интенсивности получали на ПЗС-детекторе площади Bruker APEXII, используя графит-монохроматизированное излучение Mo-Kα (λ=0,71073 Å) при температуре 143(1) К. Предварительный расчет индексов выполняли на основе серии из тридцати шести снимков при повороте на 0,5° с временем экспозиции 20 с. Всего было собрано 3593 снимка при расстоянии от кристалла до детектора 37,600 мм, интервале поворота 0,5° и времени экспозиции 20 с.

тип скана	2θ	ω	φ	χ	снимки
φ	-15,50	258,48	-351,72	19,46	739
φ	-20,50	-17,45	-37,67	-73,06	725
ω	-10,50	-53,05	-87,93	99,72	80
φ	19,50	-32,21	-88,94	36,30	219
ω	-10,50	-14,33	80,80	-60,33	122
ω	17,00	-38,90	-41,64	83,36	116
ω	17,00	-37,89	-175,56	82,07	114
φ	19,50	59,55	-11,29	-26,26	739
φ	-10,50	318,39	-335,56	52,47	739

Снимки поворота объединяли с помощью SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Мадисон, штат Висконсин, США), позволяющей получить список неусредненных значений F² и o(F²), которые затем передавали в программный пакет SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Мадисон, штат Висконсин, США) для дальнейшей обработки и расчета структуры на компьютере Dell Pentium 4. Всего измерили 17880 отражений в диапазонах 1,77≤θ≤25,12°, -6≤h≤6, -14≤k≤14, -19≤l≤19, что позволило получить 6897 уникальных отражений (Rint=0,0212). Данные интенсивности скорректировали с учетом эффектов Лоренца и поляризации и поглощения с помощью SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Germany) (минимальное и максимальное пропускание 0,6887, 0,7452).

Структуру рассчитывали с помощью прямых способов (SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64, 112-122)). Оптимизацию выполняли с помощью полной матрицы наименьших квадратов по F², используя SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64, 112-122)). Во время оптимизации использовали все отражения. Схема расчета весовых коэффициентов представляла собой $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0344P)^2 + 0,1102P]$, где $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$.

Атомы, не являющиеся атомами водорода, оптимизировали анизотропно, а атомы водорода оптимизировали с помощью модели "верховой езды". Оптимизация сошлась при $R1=0,0259$ и $wR2=0,0609$ для 6527 отражений, для которых $F > 4\sigma(F)$ и $R1=0,0284$, $wR2=0,0621$ и $GOF=1,040$ для всех 6897 уникальных, ненулевых отражений и 548 переменных. ($R1 = \sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$; $wR2 = [\sum (F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum (F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n-p)]^{1/2}$; где n = количество отражений, а p = количество оптимизированных параметров). Максимальный Δ/σ в конечном цикле расчета наименьших квадратов составил 0,001, а два наиболее выраженных пика при конечной разности Фурье составляли $+0,254$ и $-0,236$ $e/\text{Å}^3$. Фиг. 22А и 22В представляют собой ORTEP (30% вероятность тепловых эллипсоидов) молекул асимметричной единицы номер 1 и 2.

Таблица 18. Краткие сведения об определении структуры (S)-изопропил 2-(((S)-(перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата

Эмпирическая формула	$C_{18}H_{17}NFO_5F_5$
Молекулярная масса по формуле	453,30
Температура	143(1) K
Длина волны	0,71073 Å
Сингония	Триклинная
Пространственная группа	P1
Константы ячейки:	
a	5,2641(6) Å
b	12,0548(13) Å
c	16,4307(15) Å
α	74,960(4) °
β	83,959(4) °
γ	80,275(4) °
Объем	990,40(18) Å ³
Z	2
Плотность (рассчитанная)	1,520 Мг/м ³
Коэффициент поглощения	0,216 мм ⁻¹
F(000)	464
Размер кристалла	0,45×0,05×0,04 мм ³
Тета-диапазон для получения данных	1,77–25,12 °
Диапазоны индекса	$-6 \leq h \leq 6$, $-14 \leq k \leq 14$, $-19 \leq l \leq 19$
Собранные отражения	17880
Независимые отражения	6897 [R(int)=0,0212]
Завершенность до тета=25,12 °	99,5%
Коррекция поглощения	Полуэмпирическая на основе эквивалентов
Макс. и мин. пропускание	0,7452 и 0,6887
Способ оптимизации	Полная матрица наименьших квадратов по F ²
Данные/ограничения/параметры	6897/3/548
Критерий согласия по F ²	1,040
Конечные показатели R [I>2 сигма (I)]	R1=0,0259, wR2=0,0609
Показатели R (все данные)	R1=0,0284, wR2=0,0621
Параметр абсолютной структуры	-0,01(5)
Наибольшая разность пика и впадины	0,254 и -0,236 $e \cdot \text{Å}^{-3}$

Пример 33. Биологическая активность

Клетки, содержавшие репликон, высевали по 3000 клеток/лунку (50 мкл) в 96-луночные белые/непрозрачные планшеты либо по 1500 клеток/лунку (25 мкл) в 384-луночные белые/непрозрачные планшеты. 50 мкл 2X соединения вносили в 96-луночный планшет или 25 мкл 2X соединения вносили в 384-луночный планшет. Планшеты инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 4 суток. После инкубирования вносили реагент Bright-Glo (50 мкл в 96-луночный планшет или 25

мкл в 384-луночный планшет) для измерения репортера репликации ВГС на основе люциферазы светляка. Рассчитывали процент ингибирования по сравнению с контролем при отсутствии лекарства.

Соединение	Активность репликаона ВГС (мкМ)
4	0,58
R _p -4	2,87
S _p -4	0,13

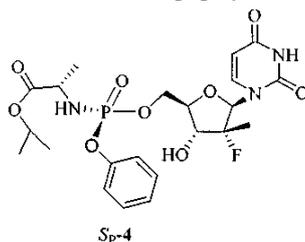
Продемонстрировали, что R_p-4 и S_p-4 имели широкий охват генотипов. Например, показано, что оба изомера были активны против генотипов 1-4 вируса гепатита С.

Настоящая заявка представляет собой заявку с частичным продолжением заявки на патент США № 12/783680, поданной 20 мая 2010 г., которая претендует на приоритет предварительных заявок на патенты США №№ 61/179923, поданной 20 мая 2009 г. и 61/319513, поданной 31 марта 2010 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Объект изобретения заявок на патенты США №№ 12/783680 и 12/053015 и предварительных заявок на патенты США №№ 61/179923, поданной 20 мая 2009 г. и 61/319513, поданной 31 марта 2010 г. полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Объект всех цитированных ссылок включен в настоящий документ в качестве ссылки. В случае если значение включенного термина конфликтует со значением термина, определенного здесь, значения терминов, содержащиеся в настоящем описании, имеют преимущественную силу перед значениями включенных терминов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллический (S)-изопропиловый эфир 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропионовой кислоты, представленный формулой S_p-4



имеющий следующие значения угла отражения $2\theta(\pm 0,2^\circ)$ на дифрактограмме XRPD: 6,1 и 12,7.

2. Кристаллический S_p-4 по п.1, имеющий значения угла отражения $2\theta(^\circ)$ на дифрактограмме XRPD приблизительно 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8 и 23,3.

3. Кристаллический S_p-4 по п.1 или 2, имеющий, по существу, такую же дифрактограмму порошкового рентгеноструктурного анализа (XRPD), как показанная на фиг. 21.

4. Фармацевтическая композиция для лечения вирусной инфекции гепатита С, содержащая терапевтически эффективное количество кристаллического S_p-4 по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Способ лечения вирусной инфекции гепатита С у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы кристаллического S_p-4 по любому из пп.1-3.

6. Способ по п.5, в котором пациентом является человек.

7. Способ лечения вирусной инфекции гепатита С у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективной дозы кристаллического S_p-4 по п.1 или 2 в сочетании с другим противовирусным агентом.

8. Способ по п.7, где другой противовирусный агент представляет собой ингибитор протеазы NS3 вирусной инфекции гепатита С (ВГС).

9. Способ по п.7, где другой противовирусный агент представляет собой ингибитор протеазы NS5A ВГС.

10. Фармацевтическая композиция по п.4, дополнительно включающая другой противовирусный агент.

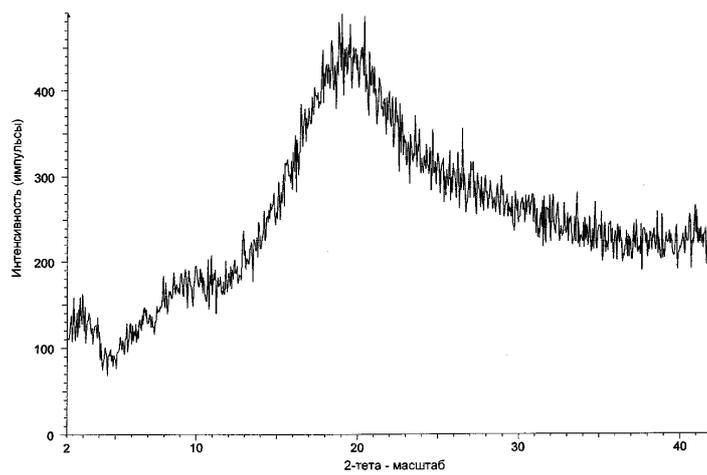
11. Фармацевтическая композиция по п.10, где другой противовирусный агент представляет собой ингибитор протеазы NS3 ВГС.

12. Фармацевтическая композиция по п.10, где другой противовирусный агент представляет собой ингибитор протеазы NS5A ВГС.

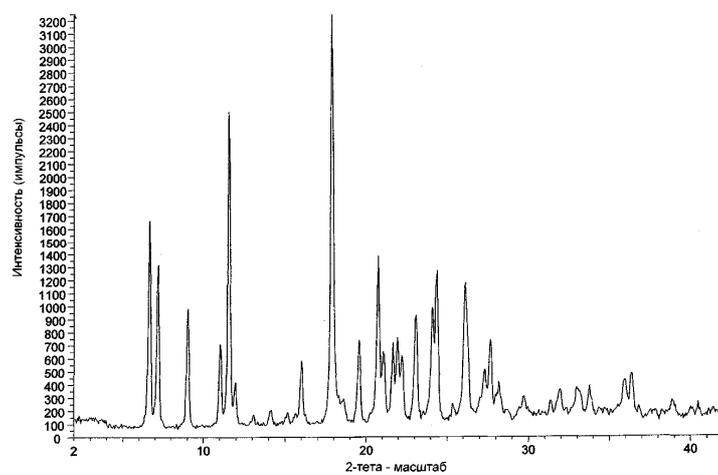
13. Таблетка, содержащая кристаллический S_p-4 по п.1 или 2.

14. Применение таблетки по п.13 для лечения вирусной инфекции гепатита С.

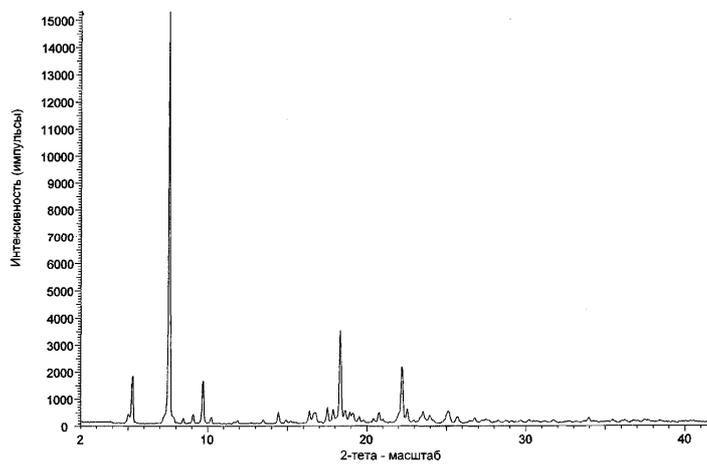
026341



Фиг. 1

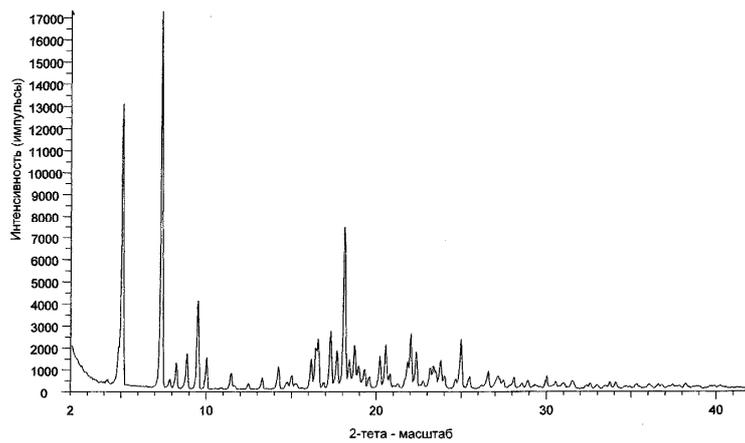


Фиг. 2

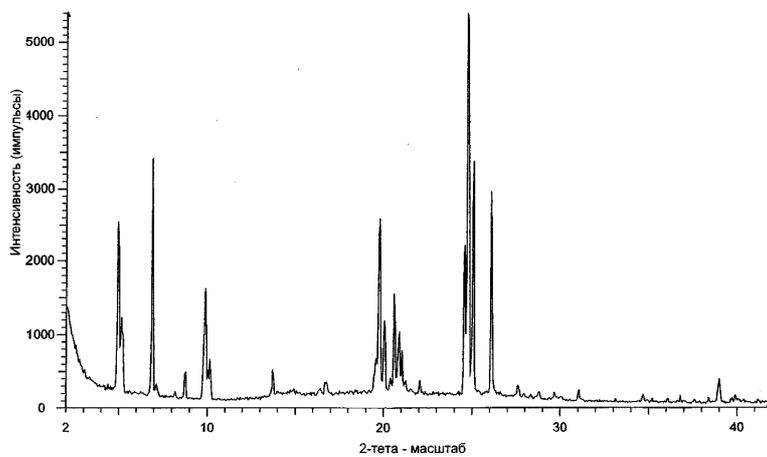


Фиг. 3

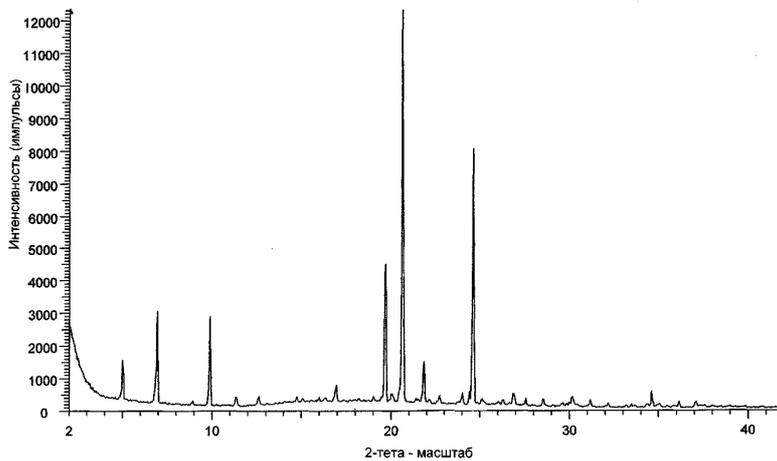
026341



Фиг. 4

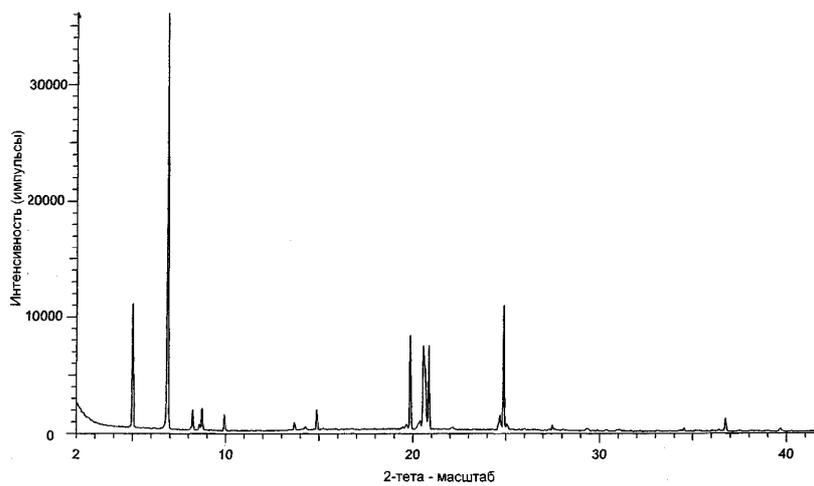


Фиг. 5

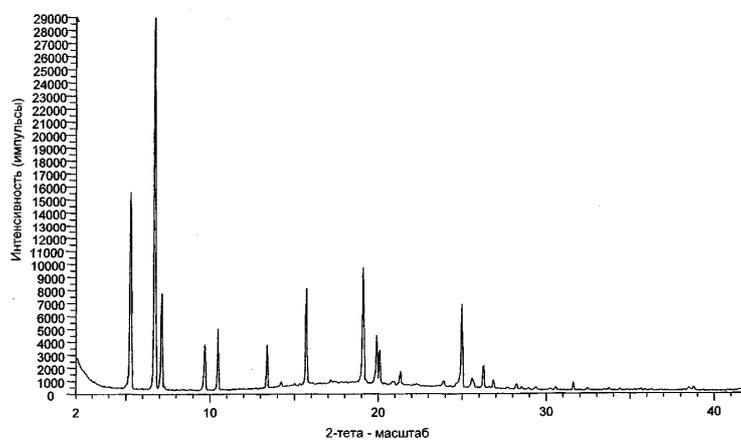


Фиг. 6

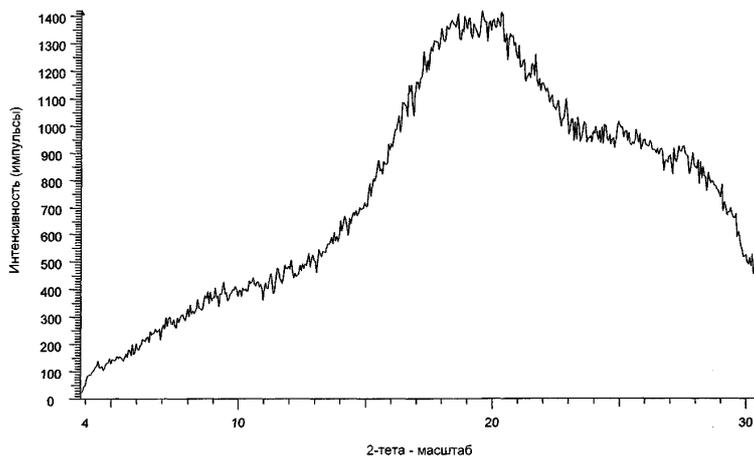
026341



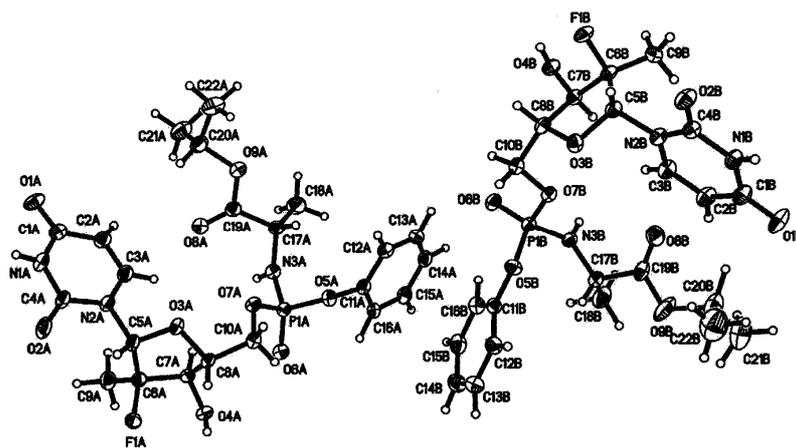
Фиг. 7



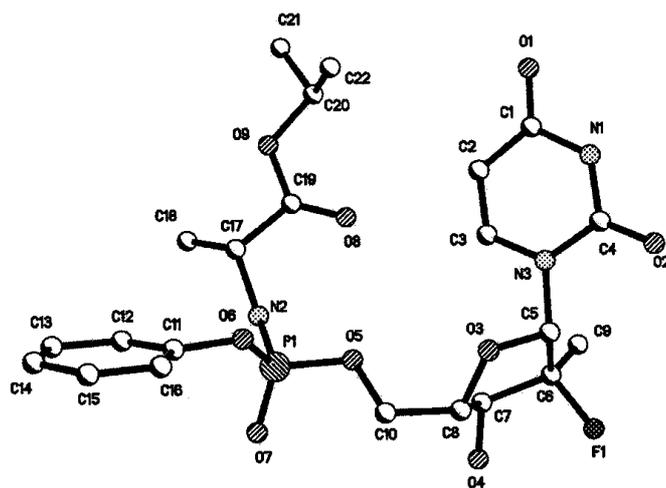
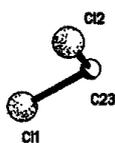
Фиг. 8



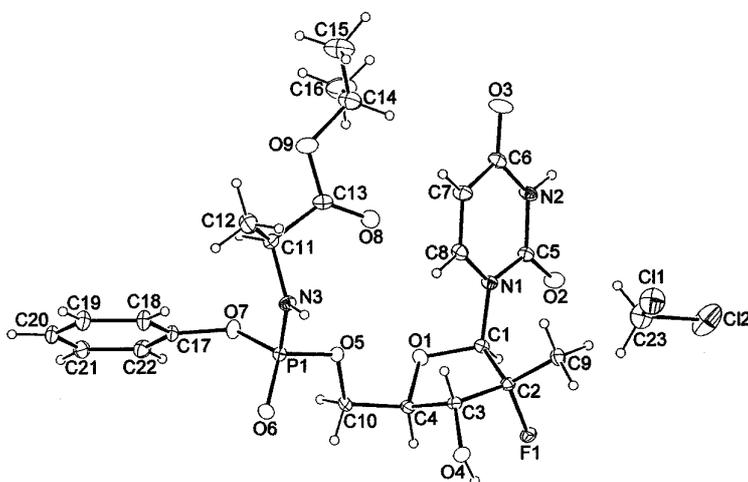
Фиг. 9



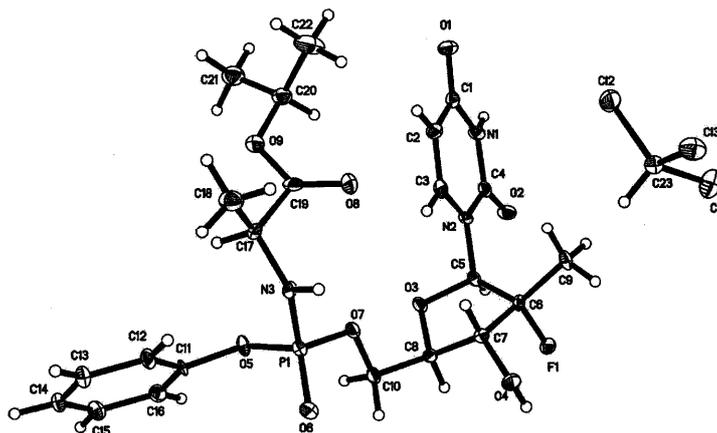
Фиг. 10



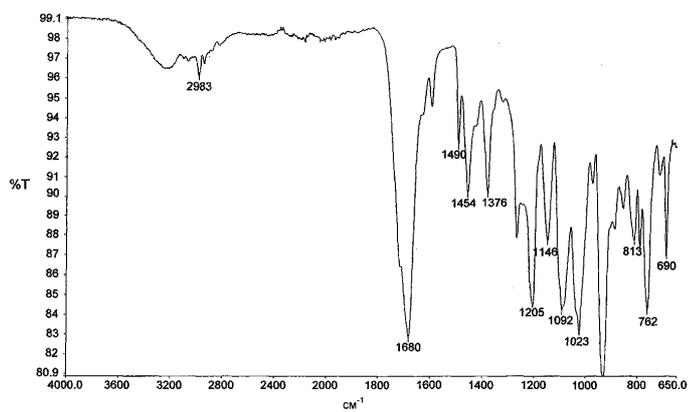
Фиг. 11



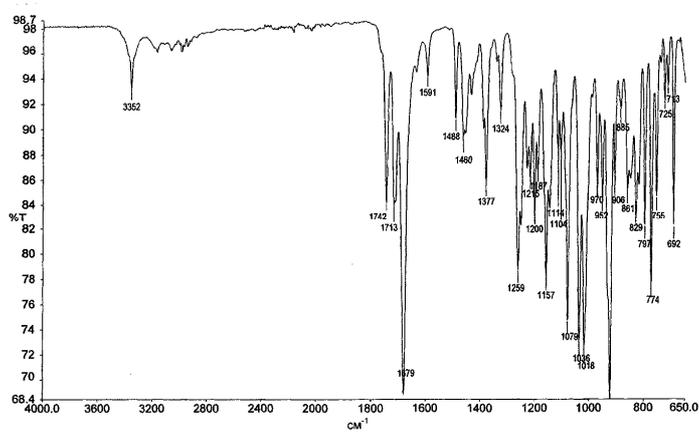
Фиг. 12



Фиг. 13

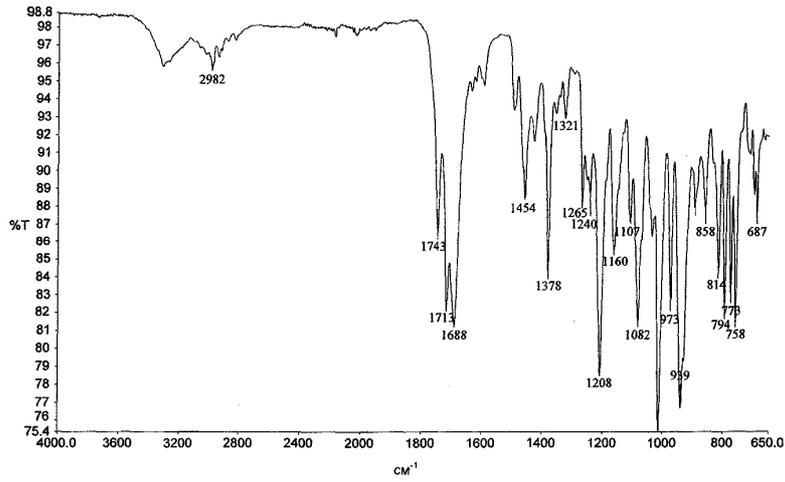


Фиг. 14

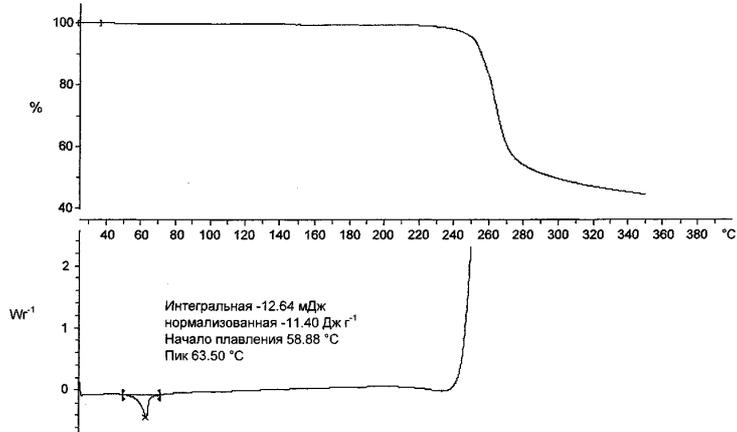


Фиг. 15

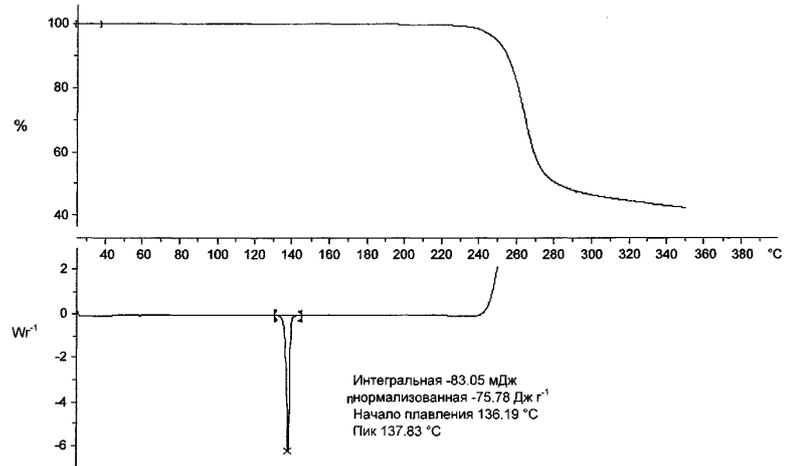
026341



Фиг. 16

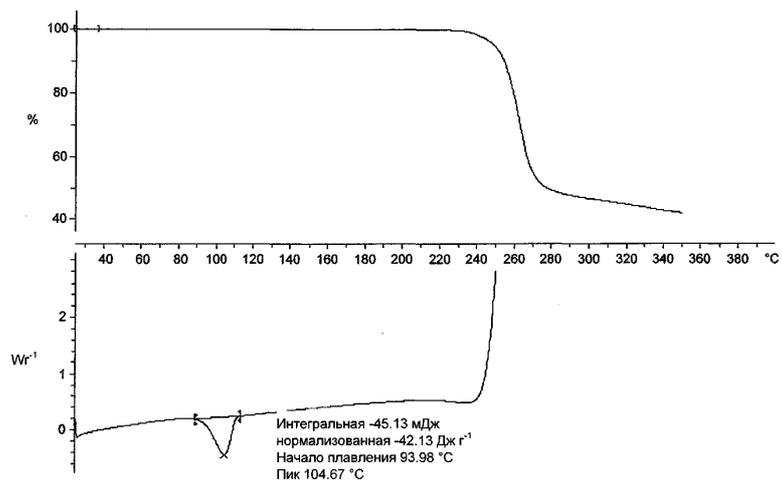


Фиг. 17

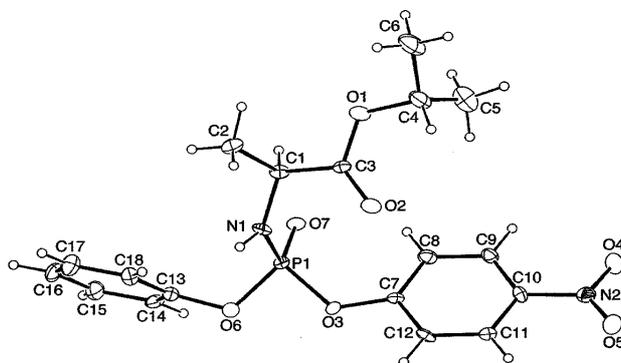


Фиг. 18

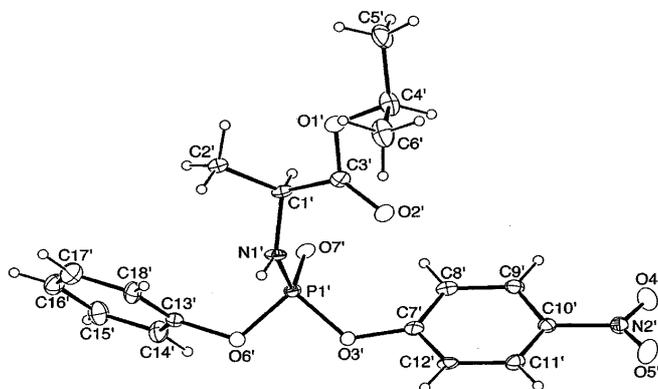
026341



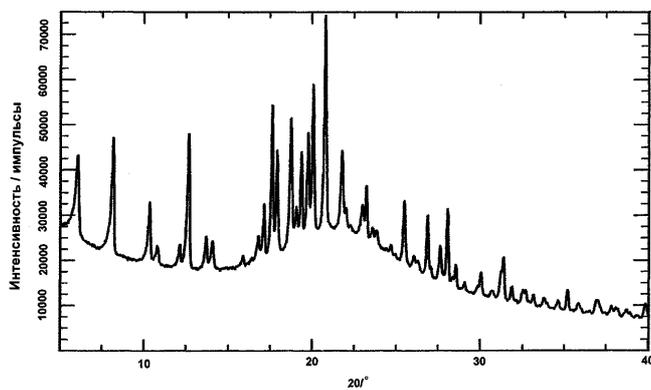
Фиг. 19



Фиг. 20А

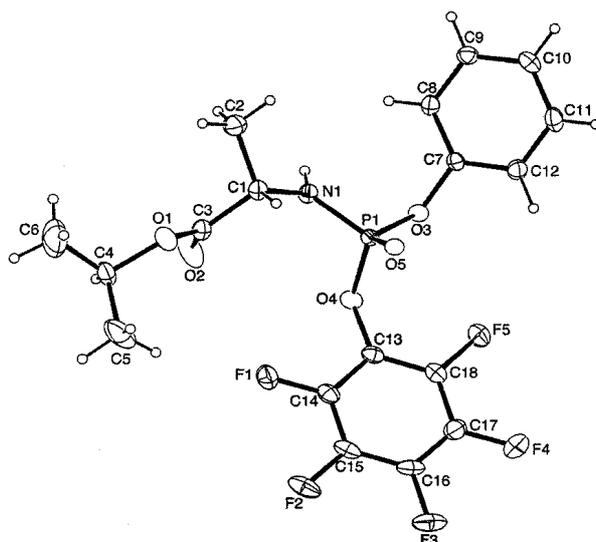


Фиг. 20В

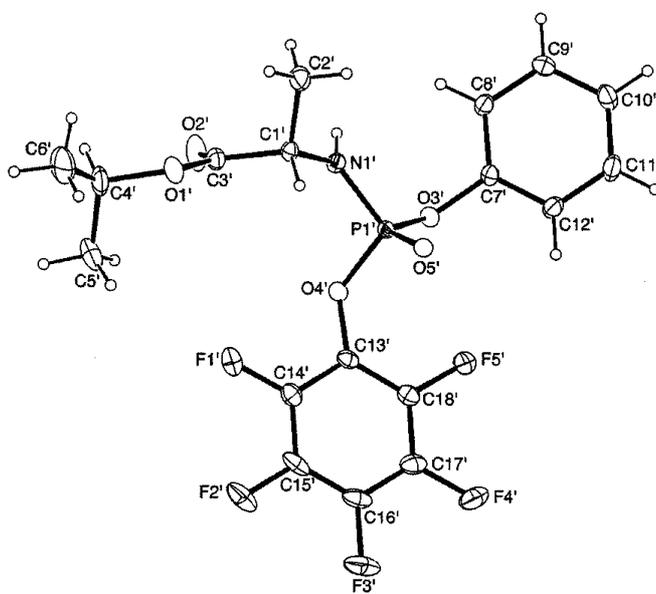


Фиг. 21

026341



Фиг. 22А



Фиг. 22В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2