



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56137 (13) C2

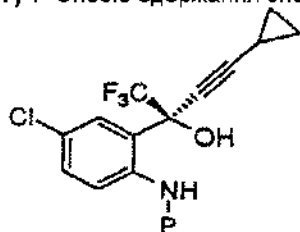
(51) 7 C07C213/00, 217/58, 215/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

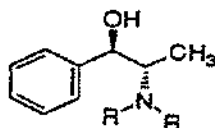
(54) СПОСІБ АСИМЕТРИЧНОГО СИНТЕЗУ ХІРАЛЬНОЇ СПОЛУКИ ТА ХІРАЛЬНА СПОЛУКА

1

(21) 97126229  
(22) 21 05 1996  
(24) 15 05 2003  
(86) PCT/US96/07294, 21 05 1996  
(31) 08/450,330  
(32) 25 05 1995  
(33) US  
(46) 15 05 2003, Бюл. №5, 2003 р  
(72) Томпсон Ендрю С., US, Корлі Едвард Г., US,  
Грабовський Едвард Дж. дж., US, Ясуда Нобуесі, US  
(73) МЕРК ЕНД КО, ІНК, US  
(56) Journal of organic chemistry, vol 60, no 6, 24  
March 1995, EASTON US, pages 1590-94  
Chemical abstracts, vol 89, no 13, 25 September  
1978, abstract no 108235  
Journal of organic chemistry, vol 56, no 13, 1991,  
EASTON US, pages 4264-68  
EP, A, 0 582 455, 1994  
(57) 1 Спосіб одержання сполуки формули

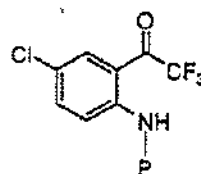


в якій Р - амінозахисна група,  
який відрізняється тим, що здійснюють стадії  
а) одержання суміші надлишку (1R, 2S)-N-  
заміщеного норефедрину формули

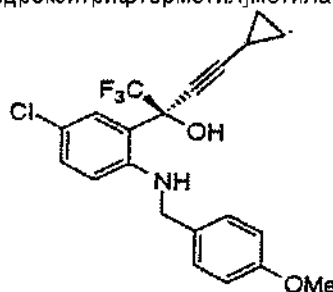


в якій R - C<sub>1-4</sub> алкіл або -NR<sub>2</sub> утворює піропідиніл  
або піперидиніл,  
з надлишком циклопропацетилену і надлишком  
літкуючої речовини, вибраної з н-бутиллітію або  
втор-бутиллітію, або трет-бутиллітію при темпера-  
турі в діапазоні від приблизно -78°C до приблизно  
10°C в апротонному розчиннику,  
б) змішування із сумішшю стадії а) приблизно од-  
ного еквівалента реагенту формули

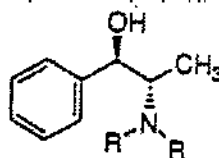
2



в якій Р - амінозахисна група  
і зберігання одержаної реакційної суміші при тем-  
пературі від приблизно -78°C до приблизно -20°C,  
с) гасіння реакції за допомогою додавання джере-  
ла протонів,  
д) одержання бажаної сполуки  
2 Спосіб згідно з п. 1 одержання N-(4-  
метоксибензил)-6-хлор-2-[(R)-циклопропілетиніл-  
гідрокситрифторметил]метиланіліну формули



який відрізняється тим, що здійснюють стадії  
а) одержання суміші надлишку (1R, 2S)-N-  
заміщеного норефедрину формули

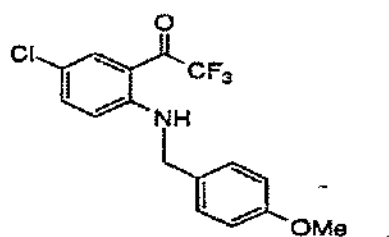


в якій R - C<sub>1-4</sub> алкіл або -NR<sub>2</sub> утворює піропідиніл  
або піперидиніл,  
з надлишком циклопропацетилену і надлишком  
літкуючої речовини, вибраної з н-бутиллітію або  
втор-бутиллітію, або трет-бутиллітію при темпера-  
турі в діапазоні від приблизно -78°C до приблизно  
10°C в апротонному розчиннику,  
б) змішування із сумішшю стадії а) приблизно од-  
ного еквівалента реагенту N-(4-метоксибензил)-6-  
хлор-2-(2-трифтор-1-оксоетил)аніліну формули

(13) C2

(11) 56137

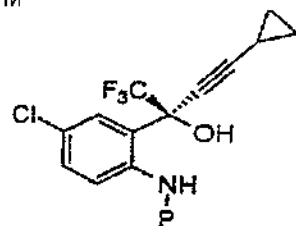
(19) UA



і зберігання одержаної реакційної суміші при температурі від приблизно  $-78^{\circ}\text{C}$  до приблизно  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  
с) гасіння реакції за допомогою додавання джерела протонів,

д) одержання бажаної сполуки

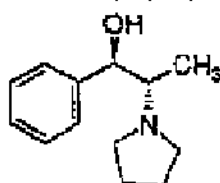
3 Спосіб згідно з п. 1 одержання сполуки формули



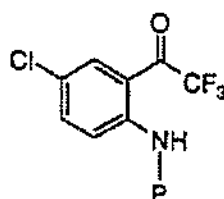
в якій Р - амінозахисна група,

який відрізняється тим, що здійснюють стадії

а) одержання суміші надлишку (1R, 2S)-N-піролідиніл норефедрину формули



з надлишком циклопропацетилену і надлишком літуючої речовини, вибраної з н-бутиллітію або втор-бутиллітію, або трет-бутиллітію при температурі приблизно  $-15^{\circ}\text{C}$  в апротонному розчиннику,  
б) змішування із сумішшю стадії а) приблизно одного еквівалента реагенту формули



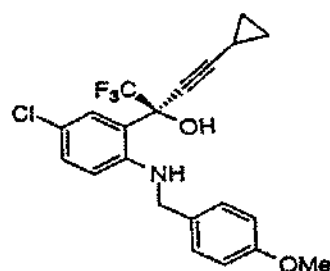
в якій Р - амінозахисна група

і зберігання одержаної реакційної суміші при температурі приблизно  $-40^{\circ}\text{C}$ ,

с) гасіння реакції за допомогою додавання джерела протонів,

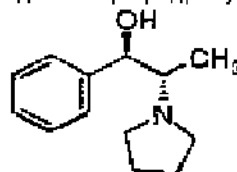
д) одержання бажаної сполуки

4 Спосіб згідно з п. 3 одержання сполуки N-(4-метоксибензил)-6-хлор-2-[(R)-циклопропілетинілгідрокситрифторметил]метиланіліну формули



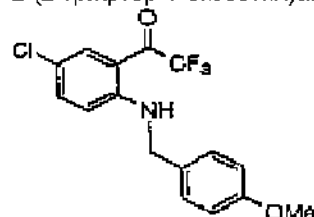
який відрізняється тим, що здійснює стадії

а) одержання суміші надлишку (1R, 2S)-N-піролідиніл норефедрину формули



з надлишком циклопропацетилену і надлишком н-бутиллітію при температурі приблизно  $-15^{\circ}\text{C}$  в апротонному розчиннику,

б) змішування із сумішшю стадії а) приблизно одного еквівалента реагенту N-(4-метоксибензил)-6-хлор-2-(2-трифтор-1-оксоетил)аніліну формули



і зберігання одержаної реакційної суміші при температурі приблизно  $-40^{\circ}\text{C}$ ,

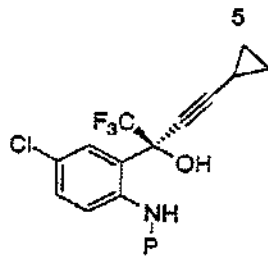
с) гасіння реакції за допомогою додавання джерела протонів,

д) одержання бажаної сполуки, з виходом  $\geq 85\%$   $\geq 95\%$ , енантімерний надлишок

5 Спосіб згідно з будь-яким з пп. 1, 2, який відрізняється тим, що проводять додатково стадію нагрівання між стадією а) і стадією б), тобто, суміш стадії а) нагрівають до температури від приблизно  $-10^{\circ}\text{C}$  до приблизно  $10^{\circ}\text{C}$  протягом, щонайменше, 5 хвилин, потім охолоджують до температури від приблизно  $-78^{\circ}\text{C}$  до приблизно  $-20^{\circ}\text{C}$  перед стадією б)

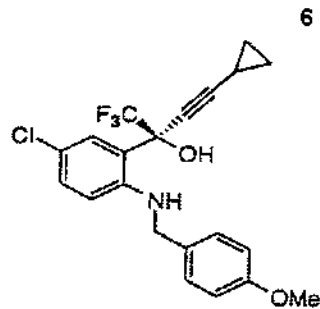
6 Спосіб згідно з будь-яким з пп. 3, 4, який відрізняється тим, що проводять додатково стадію нагрівання між стадією а) і стадією б), тобто, суміш стадії а) нагрівають до температури від приблизно  $-10^{\circ}\text{C}$  до приблизно  $0^{\circ}\text{C}$  протягом від приблизно 10 хвилин до приблизно 60 хвилин, потім охолоджують до температури, щонайменше, приблизно  $-40^{\circ}\text{C}$  перед стадією б)

7 Сполука загальної формули



в якій Р - амінозахисна група

8 Сполука згідно з п. 7, яка є N-(4-метоксибензил)-6-хлор-2-[(R)-циклопропілетиніл]-гідрокситрифторметил]метиланіліном формули

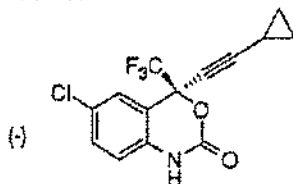


Дана заявка відноситься до заявки компанії Мерк 187931В, яка є частковим продовженням заявки 187931 А, що, у свою чергу, є частковим продовженням заявки компанії Мерк 18793, поданої 7 серпня 1992 р. U. S. S. N. 07/926 607 і 19345

Названий ретровірусом вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) є етіологічним фактором складного захворювання, яке включає прогресуючу руйнацію імунної системи (синдром придбаного імунодефіциту, СНІД) і дегенерацію центральної і периферичної нервової системи. Раніше цей вірус був відомий під назвами LAV, HTLV-111 або ARV. Загальною ознакою реплікації ретровірусу є обернена транскрипція геному РНК, вірусно закодованої оберненою транскриптазою для генерування копій ДНК послідовностей ВІЛ, етапу, необхідного при реплікації вірусів. Відомо, що деякі сполуки, наприклад, азидотимідин або АЗТ, є інгібіторами оберненої транскриптази і є ефективними засобами для лікування СНІДу і подібних йому захворювань.

Визначення нуклеотидної послідовності ВІЛ показує наявність гена pol в одній відкритій рамці читання [Ratner, L. et al. Nature, 313,277 (1985)]. Гомологія амінокислотної послідовності надає доказ, що послідовність pol кодує обернену транскриптазу, ендонуклеазу і протеазу ВІЛ [Toh, H. et al., EMBO J., 4, 1267 (1985), Power, M. D. et al. Science, 231, 1567 (1986), Pearl, L. H. et al. Nature, 329, 351 (1987)].

Заявники демонструють у значній мірі вдосконалений синтез інгібітора оберненої транскриптази ВІЛ структури



який називають (-) 6-хлор-4-циклопропілетиніл-4-трифторметил-1,4-дигідро-2Н-3,1-бензоксазин-2-оном, далі іменованого "Сполука А". Ця сполука має високу активність навіть проти оберненої транскриптази ВІЛ, стійкої до інших протівірусних сполук СНІДу.

Заявники винайшли асиметричний синтез Сполуки А. Відповідно до раніше запропонованих способів було потрібно одержання рацемату в якості передостаннього продукту, і вони давали

більш низький загальний вихід продукту. Даний винахід відноситься до прямого синтезу оптично активної Сполуки А за допомогою хірального приєднання до кетонного проміжного продукту для одержання третинного спирту з енантімерним надлишком, що перевищує 95%.

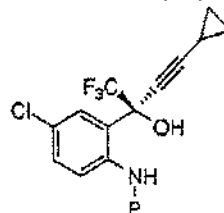
Крім того, несподіваним є те, що в результаті реакції ацетиліду з трифторметилкетонном утворюється оптично активна хімічна сполука. В даному винаході це досягається хіральним аміноспиртом для опосередкування реакції приєднання по асиметричному шляху.

Заявники також відкрили, що нагрівання (з наступним охолодженням) суміші літійованого аміноспирту і циклопропілацетиліну перед додаванням трифторкетону, сприяє підвищенню енантімерного надлишку з приблизно 85% при типовому проведенні реакції приблизно до більше 95%. Незвичайно високі рівні оптичної активності (> 95% енантімерний надлишок) роблять цей спосіб вигідним і практичним.

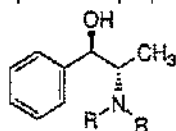
Суть винаходу

Розкрито вдосконалений синтез (-)-6-хлор-4-циклопропілетиніл-4-трифторметил-1,4-дигідро-2Н-3,1-бензоксазин-2-ону, який включає хіральне приєднання до кетонного проміжного продукту для одержання третинного спирту. Сполука може використовуватися при подавленні оберненої транскриптази ВІЛ (і його стійких різновидів), в профілактиці інфекції ВІЛ, при лікуванні інфекції ВІЛ і при лікуванні СНІДу і/або пов'язаного зі СНІДом комплексу, у вигляді сполук, фармацевтичне прийнятних солей (у підхожих випадках), інгредієнтів фармацевтичної композиції, окремо або в комбінації з іншими протівірусними засобами, протинфекційними засобами, імуномодуляторами, антибіотиками або вакцинами. Розкриті також способи лікування СНІДу, способи профілактики інфекції ВІЛ і способи лікування інфекції ВІЛ.

Докладний опис винаходу і кращих варіантів реалізації. У цьому винаході розкрито спосіб асиметричного синтезу хіральної сполуки структури



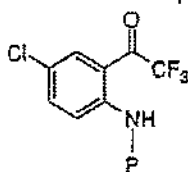
в якій Р є амінозахисна група,  
який включає стадії  
а) одержання суміші надлишку (1R, 2S)-N -  
заміщеного норепедрину структури



в якій R є C<sub>14</sub> алкіл або NR<sub>2</sub> форми піролідинілу або піперидинілу,

з надлишком циклопропілацетилену і надлиш-  
ком літучої речовини, вибраної з н-бутиллітїю  
або втор-бутиллітїю або трет-бутиллітїю в діапазо-  
ні температури від приблизно -78°C до приблизно  
10°C в апротонному розчиннику,

б) змішування із сумішшю стадії (а) приблизно  
одного еквівалента реагенту структури



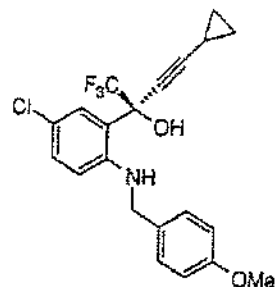
в якій Р є амінозахисна група,

і збереження отриманої реакційної суміші при  
температурі від приблизно -78°C до приблизно  
-20°C,

с) гасіння реакції за допомогою додавання  
джерела протонів,

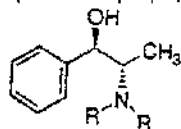
д) одержання бажаної сполуки

Один із варіантів реалізації цього винаходу є  
спосіб асиметричного синтезу хіральної сполуки  
M-(4-метоксибензил)-6-хлор-2- [(R) -циклопропіл-  
етиніл-гідрокси-трифторметил] -метиланіліну стру-  
ктури



який включає стадії

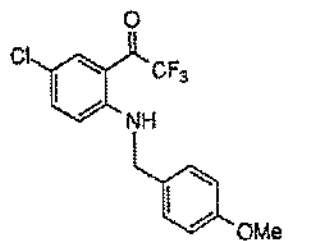
а) одержання суміші надлишку (1R, 2S )-N -  
заміщеного норепедрину структури



в якій R є C<sub>14</sub> алкіл- або -NR<sub>2</sub> форма піролди-  
нілу або піперидинілу,

з надлишком циклопропілацетилену і надлиш-  
ком літучої речовини, вибраної з н-бутиллітїю  
або втор-бутиллітїю, або трет-бутиллітїю в діапа-  
зоні температури від приблизно -78°C до приблиз-  
но 10°C в апротонному розчиннику

б) змішування із сумішшю стадії (а) приблизно  
одного еквівалента реагенту M-(4-метоксибензил)-  
6-хлор-2-(2-трифтор-1-оксоетил)-аніліну структури

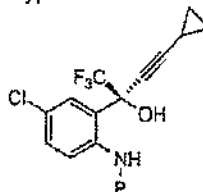


і зберігання отриманої реакційної суміші при  
температурі від приблизно - 78°C до приблизно-  
20°C,

с) гасіння реакції за допомогою додавання  
джерела протонів,

д) одержання бажаної сполуки

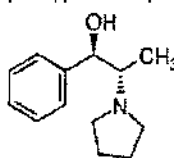
Інший варіант реалізації того ж винаходу є  
спосіб асиметричного синтезу хіральної сполуки  
структури



в якій Р є амінозахисна група,

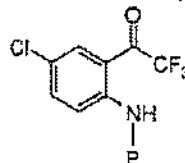
який включає стадії

а) одержання суміші надлишку (1R, -2S)-  
M-піролідиніл норепедрину структури



з надлишком циклопропілацетилену і надлиш-  
ком літучої речовини, вибраної з н-бутиллітїю  
або втор-бутиллітїю, або трет-бутиллітїю при тем-  
пературі приблизно -15° C в апротонному розчин-  
нику,

д) змішування із сумішшю стадії (а) приблизно  
одного еквівалента реагенту структури



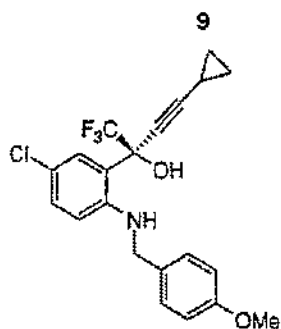
в якій Р є амінозахисна група,

і зберігання отриманої реакційної суміші при  
температурі приблизно - 40°C,

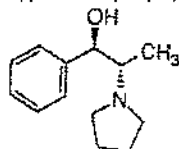
с) гасіння реакції за допомогою додавання  
джерела протонів,

д) одержання бажаної сполуки

Інший варіант реалізації того ж винаходу є  
спосіб асиметричного синтезу хіральної сполуки  
M-(4-метоксибензил)-6-хлор-2-[(R) -циклопропіл-  
етиніл-гідрокси-трифторметил] -метиланіліну структури

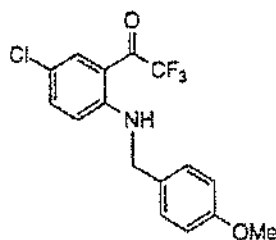


який включає стадії  
а) одержання суміші надлишку (1 R, 2S)-N -  
піролідиніл норефедрину структури



з надлишком циклопропілацетилену і надлишком  
н-бутиллітію при температурі приблизно -15°C  
в апротонному розчиннику,

б) змішування із сумішшю стадії (а) приблизно  
одного еквівалента реагенту N -(4-метоксибензил)-  
6-хлор-2- (2-трифтор-1-оксо-етил) -аніліну структури



і зберігання отриманої реакційної суміші при  
температурі приблизно -40°C,

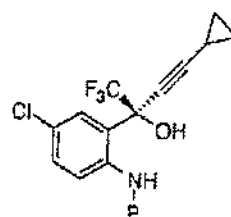
с) гасіння реакції за допомогою додавання  
джерела протонів,

д) одержання бажаної сполуки, з виходом  
≥85% енантімерний надлишок ≥95%

Будь-який із вказаних вище способів може бу-  
ти модифікований для покращання енантімерно-  
го надлишку за допомогою додаткової стадії нагрі-  
вання (з наступним охолодженням) між стадією (а)  
і стадією (б), тобто, суміш стадії (а) нагрівають до  
температури від приблизно -10°C до приблизно  
10°C, щонайменше, протягом 5 хвилин, потім охо-  
лоджують до температури від приблизно -78°C до  
-20°C перед додаванням трифторкетону. Якщо  
температура суміші стадії (а) вже знаходиться на  
рівні від приблизно -10°C до приблизно 10°C, під-  
йом температури може не покращити енантімер-  
ний надлишок.

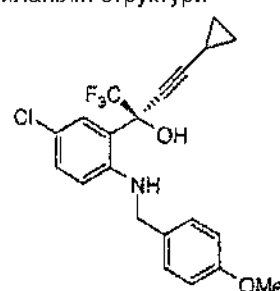
Однією кращою модифікацією для поліпшення  
енантімерного надлишку є додаткова стадія на-  
грівання (з наступним охолодженням) між стадією  
(а) і стадією (б), тобто, суміш стадії (а) нагрівають  
до температури від приблизно -10°C до приблизно  
0°C протягом від приблизно 10 хвилин до приби-  
лизно 60 хвилин, потім охолоджують - до температу-  
ри від приблизно -40°C перед додаванням три-  
фторкетону.

Цей винахід також охоплює сполуки структури



в якій Р є амінозахисна група

Інша сполука, охоплювана цим винаходом, є N  
-(4-метоксибензил)-6-хлор-2-[(P)-  
циклопропілетиніл-гідрокси-трифторметил ] -  
метиланілін структури



Спочатку надлишок (1 R, 2S)-N-заміщеного  
норефедрину змішується в апротонному розчин-  
нику з надлишком циклопропілацетилену, і кисло-  
тні протони видаляються за допомогою лігування  
з надлишком н-бутиллітію або втор-бутиллітію,  
або трет-бутиллітію. Отримана реакційна суміш  
витримується при температурі в діапазоні від при-  
близно -78°C до приблизно 10°C, краще при при-  
близно -15°C.

Якщо отримана суміш нагрівається до темпе-  
ратури від приблизно -10°C до приблизно 10°C,  
продукт 6 в остаточному підсумку виходить з вели-  
ким енантімерним надлишком, звичайно приби-  
лизно 95% замість приблизно 85% або менше. Деякі  
аспекти цього винаходу виключають цей етап на-  
грівання, інші включають його.

У способах даного винаходу Р є будь-яка під-  
хожа амінозахисна група і включає, але не обме-  
жується цим, бензил, незаміщений або заміщений  
C<sub>14</sub>-алкілом, параметоксибензил, парантробен-  
зил, парахлорбензил, 2,4-дихлорбензил, 2,4-  
диметоксибензил, 4-метилсульфінілбензил, 9-  
антрипметил, дифеніл метил або N-  
триалкілсилильні групи по T. W. Greene et al. Pro-  
tective groups in Organic Synthesis 2nd Ed. John  
Wiley 1991, pp. 309-405. Кращою амінозахисною  
групою є параметоксибензил. Як тільки реакція  
починається додаванням приблизно одного екві-  
валента кетону 5 трифторкетону, отримана реак-  
ційна суміш витримується при температурі в діа-  
пазоні від приблизно -78°C до приблизно -20°C,  
краще при приблизно -40°C. Реакція здійснюється  
в апротонному розчиннику або ефірному розчин-  
нику. Приклади апротонних розчинників включа-  
ють тетрагідрофуран, діоксан, E<sub>2</sub>O, бензол, ДМЕ,  
фенілметил, н-октан, н-гексан і циклогексан або їх  
суміші. Кращим розчинником є тетрагідрофуран.  
Час інкубації цієї реакції становить щонайменше 2-  
3 хвилини після додавання кетону.

В цей момент реакційна суміш гаситься за до-  
помогою додавання джерела протонів у водному

середовищі, зазвичай слабкою кислотою. Підходить будь-яке таке джерело протонів, наприклад, кращим джерелом протонів є 1М лимонна кислота. Іншим є 1М оцтова кислота.

Хіральний продукт 6 очищується за допомогою звичайних методик.

Сполуки даного винаходу можуть мати асиметричні центри і можуть зустрічатися, крім випадків, коли це спеціально відзначено, у вигляді рацематів, рацемічних сумішей або у вигляді окремих діастереомерів або енантіомерів, причому всі ізомерні форми включені в даний винахід. Термін (+/-) призначений охоплювати (+) оптичні ізомери або (-) оптичні ізомери або їх суміші.

Якщо будь-яка змінна величина (наприклад, R) зустрічається більше одного разу в будь-якому інгредієнті або у формулі 1, його визначення в кожному положенні незалежне від його визначення в кожному іншому положенні. Також комбінація замісників /або змінних величин припустима тільки, якщо такі комбінації призводять до одержання стійких сполук.

За винятком відзначених випадків, використовуваний тут термін "алкіл" має на увазі включення як розгалужено-, так і прямоланцюгових насичених аліфатичних вуглеводневих груп, які мають певну кількість атомів вуглецю, якщо кількість атомів вуглецю не визначена, термін "алкіл" має на увазі включення від 1 до 4 атомів вуглецю як розгалужено-, так і прямоланцюгових насичених аліфатичних вуглецеводневих груп. Використовувані тут терміни "галоген" або "гало" позначають фтор, хлор, бром і йод.

Сполука А може бути синтезована за допомогою наступного способу.

СХЕМА 1

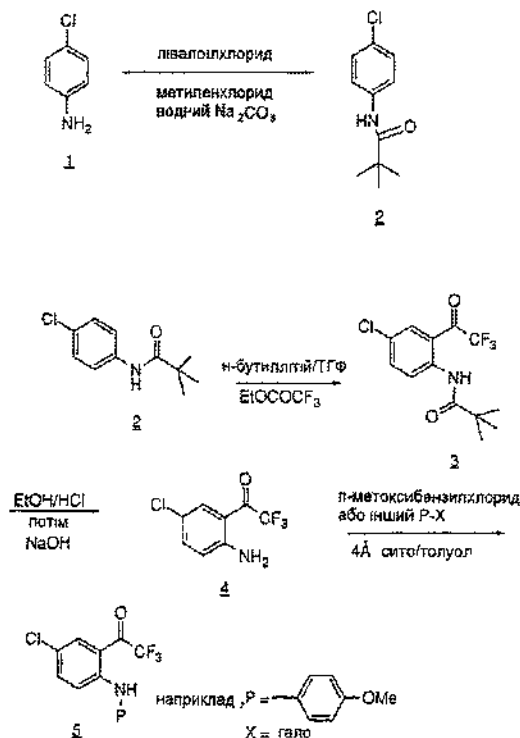
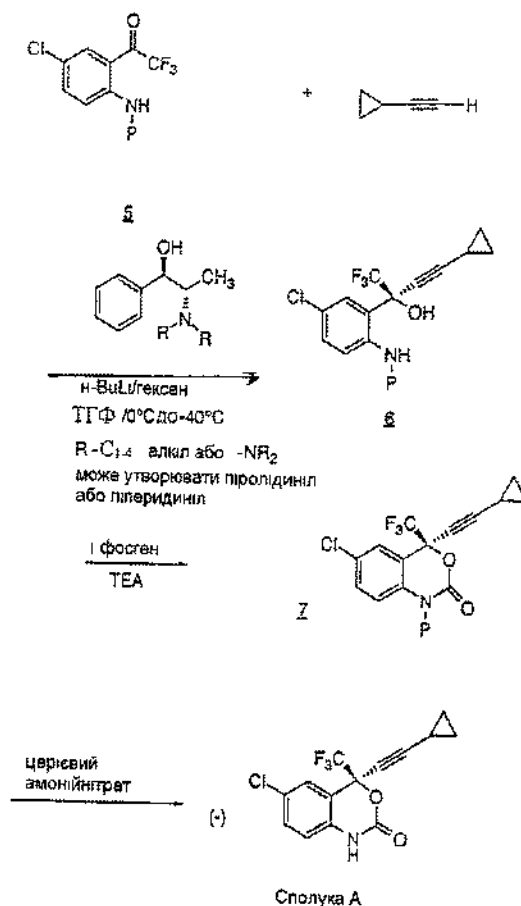
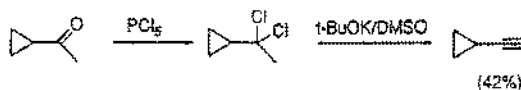


СХЕМА I (продовження)



Циклопропацетилен, який є реагентом при утворенні 6, одержують за допомогою наступних альтернативних схем,

СХЕМА 11A



як також описано в роботах C E Hudson et al, J Am Chem Soc, 94, 1158 (1972) і W Schoderth et al Synthesis, 703 (1972)

СХЕМА 11B

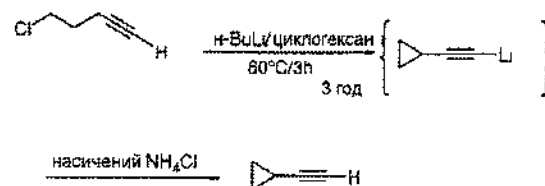


Схема 11B проілюстрована в Прикладі 3 і є кращою.

Сполука А може використовуватися в приготу-

ванні і проведенні скринінгових аналізів на противірусні сполуки. Наприклад, Сполука А може використовуватися для виділення ферментативних мутантів, які є чудовими інструментами скринінгу для виявлення більш потужних противірусних сполук. Крім того, Сполука А може використовуватися при встановленні або визначенні ділянки зв'язування інших противірусних засобів до оберненої транскриптази ВІЛ, наприклад, з допомогою конкурентного подавлення. Таким чином, Сполука А є комерційним продуктом, призначеним до продажу для цих цілей.

Сполука А може використовуватися в подавленні оберненої транскриптази ВІЛ, профілактиці або лікуванні інфекції вірусу імунodefіциту людини (ВІЛ) і в лікуванні викликаних ним патологічних станів, таких як СНІД. Лікування СНІДу або профілактика, або лікування інфекції ВІЛ визначене як таке, що включає, але не обмежується, лікування широкого діапазону станів ВІЛ інфекції: СНІД, ПСК (пов'язаний із СНІДом комплекс), як клінічно виражені, так і бессимптомні, і справжня або можлива схильність впливу ВІЛ. Наприклад, Сполука А може використовуватися при лікуванні інфекції ВІЛ після підозрюваної в минулому піддаванню впливу ВІЛ внаслідок, наприклад, переливання крові, обмінного переливання біологічних рідин, укусів, випадкових уколів голкою або контакт із кров'ю пацієнта під час операції.

Особливою перевагою Сполук А є її потужна подавляюча дія на обернену транскриптазу ВІЛ, яка є стійкою до інших противірусних засобів, таких як L -697 661, який є 3-[(4,7-дихлор-1,3-бензоксазол-2-іл) метил] -5-етил-6-метилпиридин-2(1H)-он, або L -696 229, який є 3-[2-(1,3-бензоксазол-2-іл) етил] -5-етил-6-метилпиридин-2(1H)-он, або АЗТ.

Для цих цілей Сполука А може вводитися всередину, парентерально (включаючи підшкірні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньогрудні ін'єкції або інфузійні методики), за допомогою інгаляційного аерозолі, або ректальне в композиціях дозованих лікарських форм, які містять звичайні нетоксичні фармацевтичне прийнятні носії, ад'юванти і розчинники.

Таким чином, відповідно до даного винаходу, крім того, дається спосіб лікування і фармакологічної композиції для лікування ВІЛ інфекції і СНІДу. Лікування включає введення потребуючому такого лікування пацієнту фармацевтичної композиції, яка включає фармацевтичний носій і терапевтичне ефективну кількість сполуки даного винаходу.

Ці фармацевтичні композиції можуть бути у формі суспензій або таблеток, які вводяться перорально, стерильних ін'єкційованих препаратів, наприклад, у вигляді стерильних ін'єкційованих водних або масляних суспензій або свічок.

При пероральному введенні у вигляді суспензії ці композиції отримуються відповідно до методик, добре відомих в області приготування фармацевтичних композицій, і можуть містити мікрокристалічну целюлозу для надання об'єму, альгінову кислоту або альгінат натрію в якості суспензуючої речовини, метилцелюлозу в якості підсилювача в'язкості і підсолоджуючої/ароматизуючої речовини, відомі в цій області. У вигляді таблеток негайного

звільнення ці композиції можуть містити мікрокристалічну целюлозу, дикальцій фосфат, крохмаль, магній стеарат і лактозу і/або інші наповнювачі, які зв'язують речовини, розбавники, розпушувачі, розчинники і змащуючі речовини, відомі в цій області.

При введенні за допомогою інтраназального аерозолі або інгаляції ці композиції отримуються відповідно до методик, добре відомих в області приготування фармацевтичних композицій, і можуть готуватися у вигляді сольових розчинів із використанням бензилового спирту або інших підходящих консервантів, промоторів всмоктування для посилення біодоступності, фторуглеців і/або інших сольобілизуючих або диспергуючих речовин, відомих в цій області.

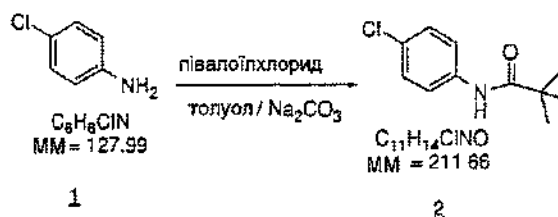
Композиції розчинів або суспензій для ін'єкцій можуть бути отримані відповідно до відомих способів із використанням нетоксичних, прийнятних для парентерального введення розбавників або розчинників, таких як манітол, 1,3-бутандіол, вода, розчин Рінгера або ізотонічний розчин хлористого натрію, або підходящих диспергуючих і суспензуючих речовин, таких як стерильні, низьков'язкі, нелетучі масла, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди, і жирні кислоти, включаючи олеїнову кислоту.

При ректальному введенні у формі свічок ці композиції можуть бути отримані за допомогою змішування лікарського препарату з підходящим не подразнюючим наповнювачем, таким як олія какао, синтетичні гліцеридні ефіри або поліетилентерфталат, які є твердими при звичайних температурах, але стають текучими і/або розчиняються в порожнині прямої кишки для звільнення лікарського препарату.

Сполуку А можна вводити перорально людям у діапазоні доз від 1 до 100 мг/кг маси тіла дробними дозами. Одним із кращих діапазонів доз є від 0,1 до 20 мг/кг маси тіла дробними дозами. Для комбінованої терапії з нуклеозидними аналогами кращим діапазоном доз є від 0,1 до 20 мг/кг маси тіла для сполук цього винаходу, які вводяться перорально дробними дозами, і від 50 мг до 5 г/кг маси тіла для нуклеозидних аналогів, які вводяться перорально дробними дозами. Проте варто розуміти, що визначений рівень дози і частота введення для будь-якого конкретного пацієнта може варіюватися і буде залежати від багатьох факторів, включаючи активність конкретної застосовуваної сполуки, метаболічної стійкості і тривалості дії цієї сполуки, віку, маси тіла, загального стану здоров'я, статі, харчового раціону, способу і часу введення, швидкості виведення, комбінації лікарських препаратів, важкості стану в конкретному випадку носія вірусу, який піддається лікуванню.

#### Приклад 1

##### Одержання 4-хлорфеніпіваламіді



1

2

Матеріали	Кількість	Мілімоль	Молекулярна маса
4-хлоранілін	76г	596	127,57
Півалоіл хлорид (d=0,979)	74мл	600	120,58
толуол	600мл		
насичений Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	95мл		
деіонізована вода	225мл		

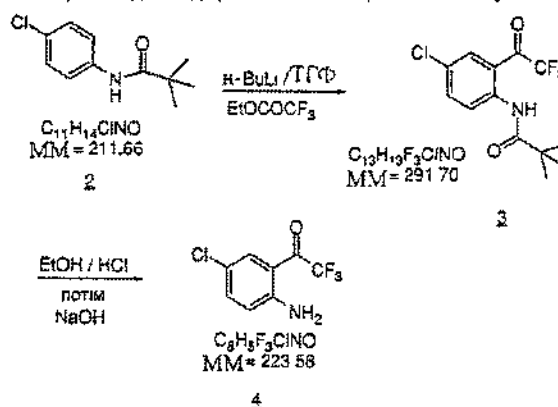
В розчин 4-хлораніліну (76г) у толуолі (600мл) додають насичений Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (95мл) Порцію охолоджують до 10°C і краплинами протягом 45 хвилин додають півалоіл хлорид (74мл) Порцію перемішують при 5-10°C протягом 60 хвилин, спідкуючи за розвитком реакції за допомогою ВЕЖХ Додавання півалоіл хлориду в анілін дає екзотермічну реакцію

Умови ВЕЖХ колонка C-8, CH<sub>3</sub>СМ, вода, фосфорна кислота, градієнт елюювання 40 60 0,1 до 80 20 0,1 протягом 20 хвилин, потік =1,0мл/хв, потік =1,0 мл/хв, УФ детекція при 245нм, t<sub>R</sub> вихідного матеріалу =7,2хв, t<sub>R</sub> піваламиду =12,6хв

Продукт виділяють за допомогою фільтрації і промивають деіонізованою водою (3х75мл) і висушують повітрям в умовах відсмоктування протягом 10хвилин Продукт висушують у вакуумній печі при 40°C продуванням N<sub>2</sub> протягом 16 годин для

одержання 108,5г продукту у вигляді тонких білих голок (86%)

#### Приклад 2 Одержання 4-хлоркетоаніліну 4



Матеріали	Кількість	Мілімоль	Молекулярна маса
4-хлорфенілпіваламід	10г	47,2	211,69
n-BuLi/гексан(2,5моль)	38мл	95	
етил трифторацетат (d=1,194)	6,7мл	56,6	142,08
ТГФ	75мл		
Етанол	90мл		
6N HCl	50мл	240	
гексан	90мл		
2 N NaOH	15мл		
Деіонізована вода	350мл		

У 3 колбах із горловиною ємністю 500мл розчиняють піваламід (10г) в сухому ТГФ (75мл) і суміш охолоджують до 0°C В цей розчин краплинами додають n-BuLi/гексан (2,5моль, 38мл), в той же час дозволяючи внутрішній температурі піднятися до +15°C Порцію витримують при 0°C протягом 2г Додавання першого еквівалента n-BuLi у піваламід дає виражену екзотермічну реакцію Екзотермію контролюють за допомогою швидкості додавання В отриману в результаті світло-жовту суспензію додають чистий етил трифторацетат (6,7мл), в той же час дозволяючи внутрішній температурі піднятися до +10°C Розвиток реакції контролюють за допомогою ВЕЖХ

Умови ВЕЖХ колонка C-8, CH<sub>3</sub>СМ, вода фосфорна кислота, градієнт елюювання 40 60 0,1 до 80 20 0,1 протягом 20 хвилин, потік 1,0мл/хв, УФ детекція при 245нм, t<sub>R</sub> вихідного матеріалу =12,6хв, t<sub>R</sub> кетопіваламиду =11,6хв Звичайно вихід становить 85A% продукту і 10-15A% не вступившого в реакцію піваламиду

Реакцію гасять за допомогою додавання 6 N HCl (10мл) і деіонізованої води (20мл)

ВЕЖХ у цей момент показує вихід 13,1г (90%) продукту Розчин концентрують у вакуумі до обсягу 50мл і промивають етанолом (50мл) для видалення гексану і ТГФ У порцію додають 6N HCl

(40мл) і суміш нагрівають до дефлегмації (80°C) протягом 1г

Кількісний аналіз за допомогою ВЕЖХ показує вихід 85-90A% кетоаніліну і 10A% не вступившого в реакцію піваламиду Таким чином, ацильований матеріал піддається гідролізу, тоді як не вступивший в реакцію піваламід залишається незмінним В цей момент вихід кількісного аналізу склав 7,78г (74%) Порцію концентрують у вакуумі до об'єму 50мл, під час чого утворюється осадок (здогадне, сіль HCl продукту) Дистильацію припиняють і порцію охолоджують до 0°C Після витримки протягом 1г порцію фільтрують і промивають гексаном (3х30мл) Промивання гексаном видаляють вступивший в реакцію піваламід із продукту Тверда речовина контролюється за допомогою ВЕЖХ для гарантії його повного видалення в цей момент Фільтрат і промивна рідина звичайно містять 1,2-1,5г продукту (8-12%) Більша частина втрати продукту відбувається у водному фільтраті

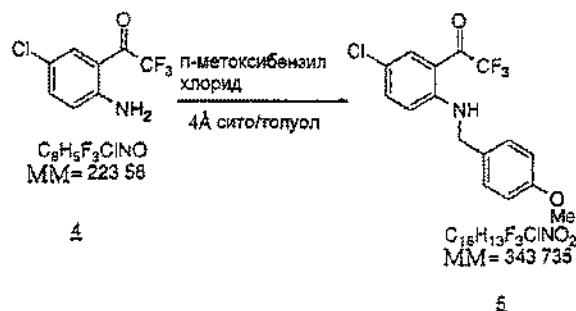
Сіль висушують у вакуумній печі при 40°C протягом 16г для одержання 10,4г твердої речовини, яка має чистоту 71,4% за масою (70% вихід) Сіль суспензують у деіонізованій воді (260мл) і нейтралізують 2N NaOH (15мл) до pH приблизно 6-7

Через розкладання продукту дуже важливо не доводити pH до рівня вище 9,0 Отриману в ре-



зультати світло-жовту тверду речовину виділяють за допомогою фільтрації і промивають деіонізованою водою (2x25мл). Продукт висушують у вакуумній печі при 40°C протягом 16г для одержання 8г кетоаніліну, який має чистоту 96,6% за масою (54% вихід). Подальше очищення продукту здійснюють за допомогою перекристалізації із гексану.

Приклад 3 Одержання N-4-метоксибензилкетоаніліну 5



Матеріали	Кількість	Мілімоль	Молекулярна маса
Кетоанілін	15,5г	69,5	223,58
P-метоксибензилхлорид	10,9г	69,8	
молекулярне сито 4 ангстрем	90г		
Толуол	70мл		
Ацетон	500мл		
Гексан	120мл		

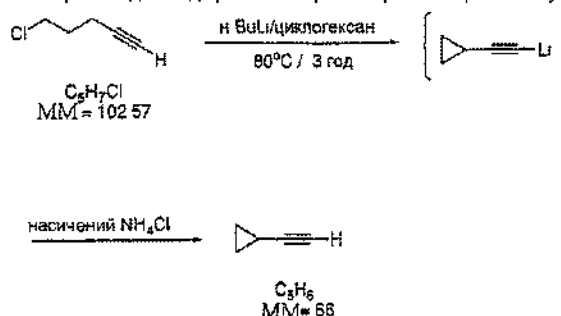
У колбу ємністю 250мл завантажують кетоанілін (15,5г), активоване молекулярне сито 4 ангстрем (50г) і толуол (75мл). Суміш перемішують при 23°C під N<sub>2</sub> протягом 24г. Кількісний аналіз за допомогою ВЕЖХ виявляє суміш продукту і вихідного матеріалу у співвідношенні приблизно 1:1.

Умови ВЕЖХ: колонка C-8, CH<sub>3</sub>CN:вода:фосфорна кислота, ізократичне елюювання при 65/35/0,1 протягом 20хвилин, потік=1,0мл/хв, УФ детекція при 260нм, t<sub>R</sub> толуолу=5,7хв, t<sub>R</sub> вихідного кетоаніліну=6,5хв, t<sub>R</sub> продукту=15,0хв. Звичайно вихід становить 25A% толуолу. У реакційну суміш завантажують свіже молекулярне сито (40г) і перемішують протягом ще 3 днів при 23°C. Реакцію вважають завершеною, коли залишається менше 2A% вихідного матеріалу.

Альтернативно, замість сита для видалення HCl із системи може використовуватися основний окис алюмінію або силікагель. Суміш фільтрують через целг і промивають ацетоном (7x75мл) доти, поки з целгу не змиється жовтий колір. Фільтрат концентрують для одержання 27г жовто-померанчевого масла, яке при стоянні затверді-

ває. Тверду речовину очищають за допомогою розчинення в гарячих гексанах (100мл). Порцію охолоджують до кімнатної температури, потім до 0°C у водно-крижаній лазні. Після витримки протягом 1,5г порцію фільтрують і промивають холодними гексанами (2x10мл). Порцію висушують повітрям з відсмоктуванням протягом 10хвилин, потім висушують у вакуумній печі при 40°C протягом 2г. Це дає 20,5г (86%) яскраво-жовтого порошку.

Приклад 4 Одержання циклопропілацетилену



Матеріали	Кількість	Мілімоль	Молекулярна маса
5-хлор-1-пентин	10г	98	102,57
n-BuLi / циклогексан (2,0 моль)	122мл	244	
циклогексан	80мл		
насичений NH <sub>4</sub> Cl	50мл		

У розчин 5-хлор-1-пентину в циклогексані (80 мл) при 0°C під N<sub>2</sub> додавають n-бутиллітій у циклогексані (2,0 моль, 122 мл). Суміш нагрівають до 75°C протягом 5г.

Додавання n-бутиллітію в алкін дає екзотермічну реакцію, температуру підтримують нижче +5°C за допомогою водно-крижаної лазні.

Розвиток етапу циклізації контролюють за допомогою ВЕЖХ. Реакцію вважають закінченою, коли вихід кількісного аналізу становить > 90%.

Умови ВЕЖХ: Фенільна колонка, CH<sub>3</sub>CM:вода:фосфорна кислота, ізократичне елюювання при 50/50/0,1 протягом 20хвилин, потік=1,0мл/хв, УФ детекція при 195нм, t<sub>R</sub> вихідного

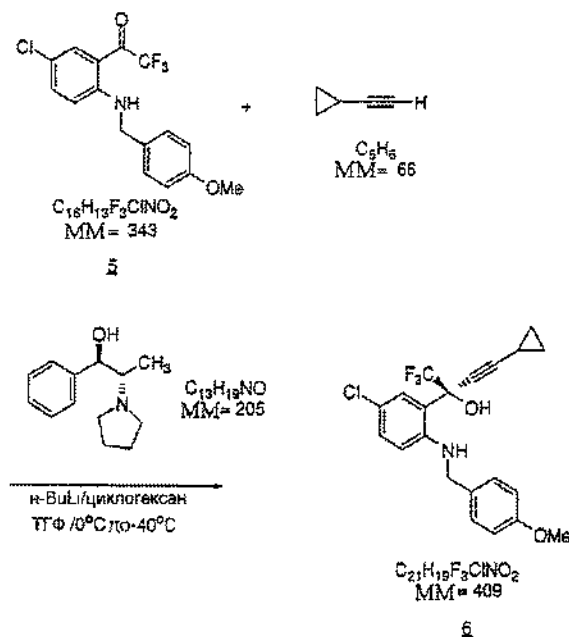
матеріалу=7,5хв, t<sub>R</sub> циклопропілацетилену=6,0хв. Продукт має фактор реакції, який у 20 разів більше, ніж вихідний матеріал.

Як тільки закінчується етап циклізації, реакційну суміш охолоджують до 0°C і гасять насиченим NH<sub>4</sub>Cl.

Кількісний аналіз органічної фази за допомогою ВЕЖХ показав 5,5г циклопропілацетилену (вихід 85%).

Продукт очищають за допомогою фракційної дистиляції через колонку 6"x0,5", упаковану 4мм скляними бусинами. Збирають фракцію з точкою кипіння від 45 до 75°C. Це дає 4,2г (65%) циклопропілацетилену у вигляді безбарвного масла.

## Приклад 5 Одержання аміноспирту



Матеріали	Кількість	Ммоль	Молекулярна маса
Кетон	10г	29,1	343
1R, 2S 1M-піролідинілнорепедрин	13,1г	64	205
циклопропілацетилен ( $d=0,8$ )	5,3мл	64	66
н-BuLi (2,6моль в циклогексані)	50мл	125	
ТГФ (KF=20мкг/мл)	80мл		
1M лимонна кислота	90мл		
Етилацетат	75мл		

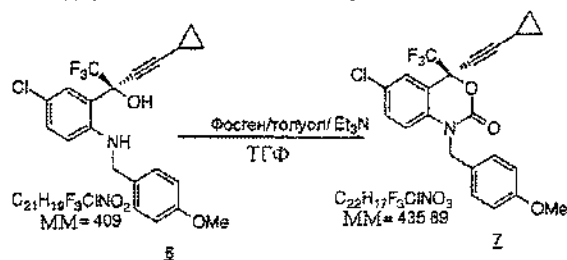
Піролідинілнорепедрин (13,1г) розчиняють у ТГФ (55мл) і суміш охолоджують до  $-15^\circ\text{C}$ . У суміш при  $-15^\circ\text{C}$  під  $\text{N}_2$  краплями додають чистий циклопропілацетилен (5,3мл) і н-бутиллітій (50мл). Суміш витримують при  $5^\circ\text{C}$  протягом 30хвилин, потім охолоджують до  $-55^\circ\text{C}$ .

Додавання н-бутиллітію викликає екзотермічну реакцію, і температуру підтримують у діапазоні від  $-5$  до  $0^\circ\text{C}$  за допомогою швидкості додавання. Кетон (10г) розчиняють у ТГФ (25мл) під  $\text{N}_2$  і додають в аніонну суміш протягом 15хвилин, дозволяючи внутрішній температурі піднятися до  $-40^\circ\text{C}$  під час додавання. Отриманий в результаті світлий помаранчевий розчин витримують при  $-40^\circ\text{C}$  протягом 60хвилин і реакцію гасять за допомогою додавання 1M лимонної кислоти (45мл) і етилацетату (75мл). Реакційну суміш нагрівають до навколишньої температури і розділяють шари. Органічні шари промивають 1M лимонною кислотою (45мл). Здійснюють кількісний аналіз реакційної суміші за допомогою ВЕЖХ на процент перетворення і вмісту продукту, енантімерний надлишок.

Умови ВЕЖХ: Колонка C-8,  $\text{CH}_3\text{CN}$  вода фосфорна кислота, ізократичне елюювання 65 : 35 0,1 протягом 20хвилин, потік = 1,0 мл/хв, УФ детекція при 252нм,  $t_R$  вихідного матеріалу = 12,8 хв,  $t_R$  продукту = 10,3 хв.

Умови хіральної ВЕЖХ: колонка, яка містить в якості стаціонарної фази амлозу, гексан ізопропанол 85 : 15 ізократичне елюювання, потік = 1,0 мл/хв, УФ детекція при 252нм,  $t_R$  вихідного матеріалу = 4,9хв,  $t_R$  головного енантімеру = 5,5хв,  $t_R$  другорядного енантімеру = 25,0хв. Енантімерний надлишок становить 96,5% і реакційне перетворення становить 93% (6A% вихідного матеріалу). Вихід кількісного аналізу становить 85%. Продукт очищають за допомогою змішування в суміші гептан : толуол у співвідношенні 10 : 1 (65мл) при  $23^\circ\text{C}$  протягом 18г. Продукт виділяють за допомогою фільтрації і висушування в печі при  $35^\circ\text{C}$  для одержання 9,5г (80%) продукту у вигляді світло-жовтого порошку.

Приклад 6  
Одержання Бензоксазину



Матеріали	Кількість	Ммоль	Молекулярна маса
аміноспирт	3,2г	7,8	409
Фосген у толуолі (1,93моля)	4,6мл	8,9	
триетиламін (d=0,726)	5,4мл	39	101
ТГФ(KP≤100мкг/мл)	15мл		
Деіонізована вода	15мл		
EtOAc	45мл		
гексани	30мл		
1М лимонна кислота	40мл		
насичена ропа	25мл		

Аміноспирт розчиняють у ТГФ (15мл) і охолоджують до -10°C під N<sub>2</sub>. У суміш додавають триетиламін (5,4мл) і фосген у толуолі (4,6мл). Додавання фосгену викликає екзотермічну реакцію, і температуру підтримують нижче 20°C за допомогою швидкості додавання. Розвиток реакції контролюють за допомогою ВЕЖХ, і вона звичайно закінчується через 15хвилин.

Умови хіральної ВЕЖХ колонка C-8, CH<sub>3</sub>CN вода, фосфорна кислота, градієнтне елюювання від 50 50 0,1 до 90 10 0,1 протягом 20хвилин, потік=1,5мл/хв, УФ детекція при 252нм, t<sub>R</sub> вихідного матеріалу =14,6хв, t<sub>R</sub> продукту = 16,0хв.

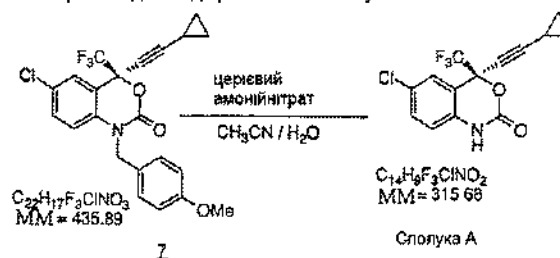
Реакційну суміш охолоджують до 0°C і реакцію гасять крижаною холодною водою (15мл) і етилацетатом (20мл). Для руйнації будь-яких емульсій використовують насичену ропу.

Органічний шар видаляють, а водний екстрагують етилацетатом (15мл). Комбіновані органічні шари промивають 1М лимонною кислотою (40мл) і насиченою ропою (25мл). Органічний шар вису-

шують (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) і концентрують у вакуумі для одержання 3,8г коричневого масла.

Продукт кристалізують із суміші гексан етилацетат у співвідношенні 5 : 1 (25мл), охолоджують до 0°C, витримують протягом 1г і фільтрують. Злежаний осадок промивають холодною сумішшю гексан-етилацетат у співвідношенні 5 : 1 (2x5мл). Злежаний осадок висушують повтрян з відсмоктуванням для одержання 2,9г (85%) світло-помаранчевої твердої речовини.

Приклад 7 Одержання Сполуки А



Матеріали	Кількість	Ммоль	Молекулярна маса
ПМБ Сполука А,1	0,8г	1,83	435
Церієвий амонійнітрат	4,4г	8,0	548,23
CH <sub>3</sub> CN	15мл		
етилацетат	30мл		
Деіонізована вода	30мл		
Насичена ропа	10мл		

Захищену п-метоксибензилом Сполуку А розчиняють у CH<sub>3</sub>CM (15мл). У цей розчин додавають розчин церієвого амонійнітрату (4,4г) у воді (5мл). Звичайно реакція закінчується через 2г при 23°C за даними ВЕЖХ.

Умови хіральної ВЕЖХ колонка C-8, CH<sub>3</sub>CM вода, фосфорна кислота, градієнтне елюювання від 50 50 0,1 до 90 10 0,1 протягом 20хвилин, потік =1,5мл/хв, УФ детекція при 252нм, t<sub>R</sub> вихідного матеріалу =16,0 хв, t<sub>R</sub> продукту =9,0хв.

Реакційну суміш розбавляють деіонізованою водою (5мл) і концентрують приблизно до 1/2 об'єму. Продукт екстрагують з отриманого в результаті водного шару етилацетатом (2x15мл). Комбінований органічний шар промивають деіонізованою водою (2x10мл) і ропою (10мл). Органічний шар концентрують у вакуумі для одержання жовтої смоли. Продукт виділяють за допомогою хроматографії: фільтрацією через силікагель.

Кількісний аналіз оберненої транскриптази

Аналіз робить кількісне визначення включення тритієвого дезоксигуанозин монофосфату рекомбінантною оберненою транскриптазою ВІЛ (ОТ-

ВІЛ) (або іншою ОТ) в осаджувану кислотою дННК при величинах константи Михаеліса дГТФ(dGTP) полі (C)<sup>x</sup> оліго d(G)<sub>12-18</sub>. Інгібітори даного винаходу подавляють це включення.

Кількісні аналізи здійснювали в розчині, що містить 55ммоль Трис (pH8.2)-30ммоль KCl-30ммоль MgCl<sub>2</sub> - 1ммоль дитіотретіолу-20мкг r(C) d(G)<sub>12-18</sub> (Pharmacia) на мл-8ммоль [<sup>3</sup>H](dGTP)(New England Nuclear)-0,01% Тритон X-100-50ммоль етиленгліколь-біс(β-аміноетил ефір)-N,N,N',N'-тетраоцтової кислоти (EGTA)-1мг бичачого сироваткового альбуміну на мл. Після 60хв інкубації при 37°C осаджуваний кислотою матеріал збирають на скловолоконні фільтри за допомогою напівавтоматичного збиральника клітин. Екстракти бактеріальних клітин, що містять ОТ, розводять до границь лінійного діапазону кількісного визначення, і активність визначають в присутності і відсутності інгібітора. Очищений гетеродимер ОТ ВІЛ-1, вироблюваний у E. coli, також служив в якості контролю. Результати визначають як концентрацію інгібітора, яка дає подавлення на 50%(I<sub>K50</sub> маси), у наномолях/лгтр. Сполука А дала I<sub>K50</sub>2 нмоля.

Для кількісного визначення подвійного мутанта (дм) при аналізі застосовують ОТ A17 ОТ A17 стійка до різних амінопіридонів, як описано в роботі Nunberg, J. H. et al., J. Virol., 65, 4887 (1991). Результати вимірюються як  $IK_{50}$  (IC50) сухої речовини в нанолях/лїтр. Сполука А дає  $IK_{50}$  сухої речовини 85 нанолях/лїтр.

Кількісне визначення клітинного поширення

Подавлення поширення ВІЛ у клітинній культурі вимірюють відповідно до методики Nunberg, J. H. et al., J. Virol., 65, 4887 (1991). При цьому кількісному визначенні Т-лімфоцитів клітини MT-4 інфікують ВІЛ-1 (дикого типу, якщо немає інших вказівок) за допомогою використання попередньо визначеного інокуляту, і культури інкубують протягом 24г. В цей час при непрямій імунофлюоресценції позитивний результат дають  $\leq 1\%$  клітин. Потім клітини інтенсивно промивають і розподіляють у

96-коміркові кульові планшети. Серійні двократні розведення інгібітора додають в комірки і культивування продовжують протягом ще 3 днів. Через 4 дні після інфекції 100% у контрольних культурах були інфіковані. Накопичення р24 ВІЛ-1 прямо корелює з поширенням вірусу. Інгібуючу концентрацію клітинної культури визначають як концентрацію інгібітора в нанолях/лїтр, яка знижує поширення інфекції щонайменше на 95% або  $IKK_{95}$  (CIC95).

Хоча наведений вище опис викладає принципи даного винаходу з прикладами, наведеними з метою ілюстрації, слід розуміти, що практичне використання винаходу охоплює всі звичайні варіанти, пристрої або модифікації як такі, що знаходяться в межах діапазону наступної формули винаходу і її еквівалентів.