

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490257 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.23

(22) Дата подачи заявки
2022.08.17

(51) Int. Cl. C07C 201/14 (2006.01)
C07C 205/58 (2006.01)
C07C 319/14 (2006.01)
C07C 319/20 (2006.01)
C07C 323/62 (2006.01)
C07C 323/63 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, НЕ ПРЕДУСМАТРИВАЮЩИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАЛЛАДИЯ

(31) 63/234,927

(32) 2021.08.19

(33) US

(86) PCT/US2022/040665

(87) WO 2023/023201 2023.02.23

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

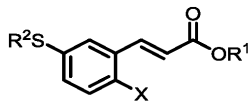
(72) Изобретатель:

Ортиз Адриан, Дёрфлер Джайка,
Вэйда Карина Р. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к не предусматривающим использования благородных металлов (Pd/Pt/Rh/Ru), предпочтительно не предусматривающим использования Pd способам получения соединения, характеризующегося формулой (1),



где R¹, R² и X определены в описании, или его соли. Предпочтительно соединение представляет собой йодакрилатное соединение.

A1

202490257

202490257

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

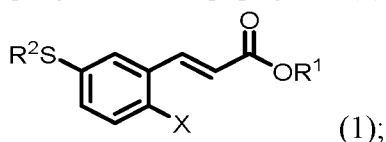
2420-580475EA/022

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, НЕ ПРЕДУСМАТРИВАЮЩИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАЛЛАДИЯ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к новым способам не предусматривающего использования палладия получения акрилатных соединений, включая йодакрилатные соединения, которые характеризуются высоким соотношением стереоизомеров.

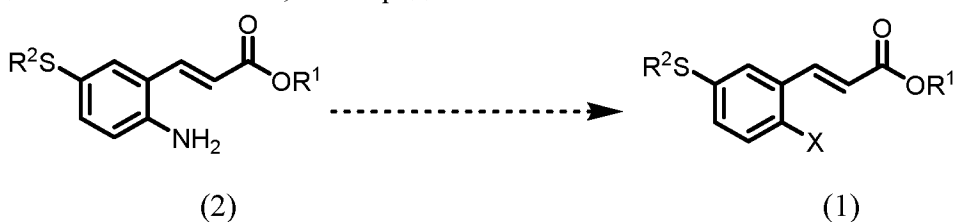
ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящая заявка относится к не предусматривающим использования благородных металлов, включающих Pd, Pt, Rh или Ru, предпочтительно не предусматривающим использования Pd способам получения соединения, характеризующегося формулой (1),



где R¹, R² и X определены ниже, или его солей. Предпочтительно соединение представляет собой йодакрилатное соединение, включая этил-(E)-3-(5-(бензилтио)-2-йодфенил)акрилат (соединение 1a).

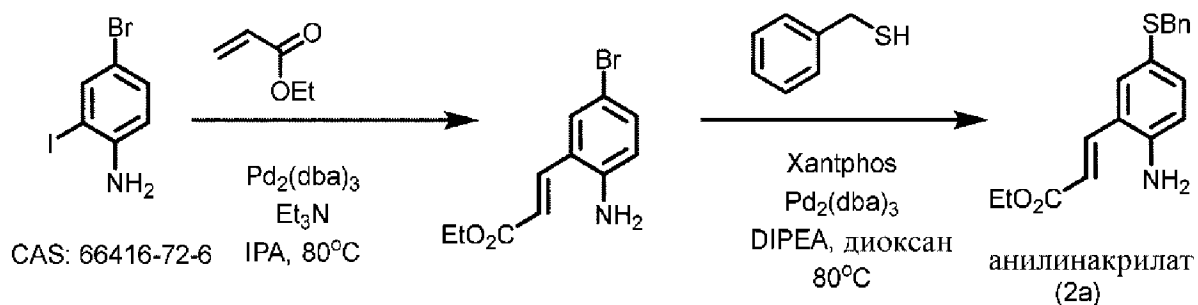
[0003] В рамках известного способа соединение (1) получали из исходного материала, представляющего собой соединение (2). В частности, соединение (1a), которое представляет собой соединение (1), где R¹ представляет собой этил; R² представляет собой бензил; и X представляет собой I; получали из исходного материала, представляющего собой анилинакрилатное соединение (2a), которое представляет собой соединение (2), где R¹ представляет собой этил, и R² представляет собой бензил:



соединение (2a): R¹ представляет собой этил и соединение (1a): R¹ представляет собой этил; R² представляет собой бензил; и

R² представляет собой бензил X представляет собой I.

[0004] При существующем на данный момент получении соединения (2a) используют последовательные опосредованные палладием (Pd) реакции перекрестного сочетания:



Более чем 50% себестоимости изготовления материалов (COGM) приходится на использование Pd. В результате, несмотря на быстрый синтез, этот способ получения соединения (2a) является очень дорогостоящим при стоимости приблизительно 8000 долларов США/кг.

[0005] Кроме того, использование последовательных преобразований с использованием Pd приводит к проблемам с эксплуатационной надежностью, таким как необходимость в высоком уровне загрузки Pd (6 мол. % и 5 мол. %), и сложностям с дальнейшим удалением Pd.

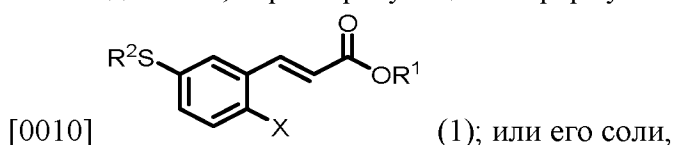
[0006] Для снижения стоимости и для улучшения общей эксплуатационной надежности способа существует потребность в разработке улучшенной новой технологии синтеза для получения соединения (2a), которое будет служить в качестве основного промежуточного соединения для получения соединения (1a) или его аналогов.

[0007] Авторы настоящего изобретения разработали новый путь синтеза, который исключает все использование дорогих благородных металлов, включая Pd, для решения этих проблем, связанных со стоимостью и эксплуатационной надежностью. В улучшенном способе получения соединения (2) и (2a) по настоящему изобретению аминогруппу получают путем восстановления нитрогруппы железом, недорогим основным металлом. Авторы настоящего изобретения также разработали альтернативное новое биокаталитическое нитровосстановление с помощью фермента-нитроредуктазы, которое улучшает выход соединения (2a).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение обеспечивает улучшенный, безопасный, рентабельный и простой в эксплуатации на промышленном уровне способ синтеза акрилатных соединений, включая галогенакрилатные соединения, не предусматривающий использования катализатора на основе благородного металла, предпочтительно не предусматривающий использования катализатора на основе металла, представляющего собой палладий.

[0009] В варианте осуществления 1 настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, характеризующегося формулой (1),



[0011] где

[0012] X представляет собой галоген, CN, CF₃ или OH;

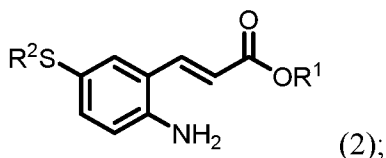
[0013] R¹ представляет собой (C₁-C₆)алкил; 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-членный арил или гетероарил или 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-членную циклоалкильную или гетероциклоалкильную группу;

[0014] при этом гетероарильная или гетероциклоалкильная группа может содержать от 1 до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N или S;

[0015] или атом углерода в циклоалкильной или гетероциклоалкильной группе может являться частью группы C=O;

[0016] R² выбран из (C₁-C₆)алкила или бензила;

[0017] (a) приведение соединения формулы (2),



[0018] где указанные R¹ и R² определены выше для соединения (1); в контакт с кислотой HA в растворителе-1 и в присутствии соли азотистой кислоты;

[0019] (b) введение галогенирующего средства (включая фторирующее, хлорирующее, бромирующее или йодирующее средство), цианирующего средства, трифторметилирующего средства или гидроксиллирующего средства необязательно в присутствии растворителя-2 с образованием указанного соединения (1); где указанные растворитель-1 и растворитель-2 могут быть идентичными или различными; и

[0020] где указанное соединение (2) получают в ходе осуществления способа, не предусматривающего использования палладиевого катализатора.

[0021] В подварианте осуществления варианта осуществления 1 применительно к (a) указанная кислота HA представляет собой HCl, HBr, HI, p-TsOH или H₂SO₄. Предпочтительно кислотой HA является HCl.

[0022] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 1 применительно к (a) указанный растворитель-1 представляет собой воду, THF, метил-THF, CH₃CN или (C₁-C₆)алкилацетатный растворитель или их смеси. Предпочтительно указанный растворитель-1 представляет собой этилацетат или изопропилацетат.

[0023] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 1 применительно к (a) указанная соль азотистой кислоты представляет собой NaNO₂.

[0024] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 1 применительно к (a) указанная низкая температура составляет от -10°C до 10°C или от 0°C до 5°C. Предпочтительно от 0°C до 5°C.

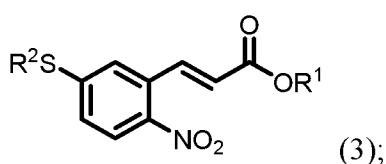
[0025] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 1 применительно к (b) указанное галогенирующее средство представляет собой соль галогенида металла; указанное цианирующее средство представляет собой CuCN; указанное трифторметилирующее средство представляет собой CuCF₃; и указанное гидроксиллирующее средство представляет собой Cu₂O/Cu(II). Предпочтительно

применительно к (b) используют галогенирующее средство, более предпочтительно указанное галогенирующее средство представляет собой KI или CuI.

[0026] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 1 применительно к (b) указанный растворитель-2 представляет собой воду, THF, метил-THF, CH₃CN или (C₁-C₆)алкилацетатный растворитель или их смеси. Предпочтительно применительно к (b) указанный растворитель-2 представляет собой (C₁-C₆)алкил; более предпочтительно изопропилацетат.

[0027] В варианте осуществления 2 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно варианту осуществления 1, дополнительно включающий получение указанного соединения (2), включающий

[0028] (c1) активацию металла в присутствии кислой соли HA¹ в полярном растворителе и приведение соединения формулы (3),



[0029] где указанные R¹ и R² определены выше для соединения (1);

[0030] в контакт с указанным активированным металлом при повышенной температуре в полярном растворителе с образованием указанного соединения (2) или его соли;

[0031] или в качестве альтернативы способ дополнительно включает получение указанного соединения (2), включающее

[0032] (c2) обеспечение реакции указанного соединения формулы (3) необязательно в присутствии соразтворителя с ферментативным восстанавливающим средством в водном буферном растворе и в присутствии по меньшей мере одного катализатора и кофактора с образованием указанного соединения формулы (2) или его соли.

[0033] В варианте осуществления 3 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно варианту осуществления 2, дополнительно включающий получение указанного соединения (2), включающий

[0034] (c1) обеспечение активации металла в присутствии кислой соли HA¹ в полярном растворителе и приведение указанного соединения формулы (3) в контакт с указанным активированным металлом при повышенной температуре в полярном растворителе с образованием указанного соединения (2) или его соли.

[0035] В варианте осуществления 4 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно варианту осуществления 2, дополнительно включающий получение соединения (2), включающий

[0036] (c2) приведение указанного соединения формулы (3) в присутствии соразтворителя в контакт с ферментативным восстанавливающим средством в водном буфере и в присутствии катализатора на основе металла, сокатализатора и кофактора с образованием указанного соединения формулы (2) или его соли.

[0037] В подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 3 применительно к (с1) указанный металл выбран из Fe^o, Zn^o, Pd^o, Pt^o, Ru^o или Rh^o. Предпочтительно указанный металл представляет собой Fe^o.

[0038] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 3 применительно к (с1) указанная кислая соль HA¹ представлена хлоридом аммония, образована уксусной кислотой или HCl. Предпочтительно указанная кислая соль HA¹ представляет собой хлорид аммония.

[0039] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 3 применительно к (с1) указанный полярный растворитель представляет собой воду, (C₁-C₆)алкиловый спирт или их смесь. Предпочтительно указанный полярный растворитель представляет собой смесь воды и этанола.

[0040] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 3 применительно к (с1) указанная повышенная температура составляет от 50°C до 90°C или от 75°C до 80°C. Предпочтительно указанная температура составляет от 75°C до 80°C.

[0041] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) указанный соразтворитель выбран из DMSO или смеси вода/DMSO. Предпочтительно соразтворитель представлен от 20 об. % до 30 об. % DMSO. Более предпочтительно соразтворитель представлен 30 об. % DMSO.

[0042] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) указанный буфер выбран из буфера на основе фосфата, PIPES, TRICINE, BICINE, HEPES, трис, TES, CAPS, Kpi или CHES. Предпочтительно буфер представляет собой буфер на основе TRICINE.

[0043] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) указанное ферментативное восстанавливающее средство представляет собой фермент нитроредуктазу (NR). Предпочтительно ферментом является NR-55.

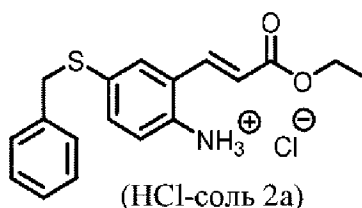
[0044] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) указанный катализатор представлен катализатором на основе металла и сокатализатором; при этом указанный катализатор на основе металла представляет собой ванадиевый катализатор, выбранный из V₂O₅, NH₃VO₄, фталоцианина оксида V(IV), бис(2,4-пентандионата) оксида V(IV), гидрата сульфата ванадила, окситриэтоксид V(V), 3% V/C или 2,4-пентандионата V(III).

[0045] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) указанный катализатор представлен катализатором на основе металла и сокатализатором; при этом указанный катализатор на основе металла представляет собой V₂O₅ или NH₃VO₄, а указанный сокатализатор представляет собой GDH-101 и сахар, и при этом указанный кофактор представляет собой NADP⁺. Предпочтительно сахар представляет собой декстрозу или глюкозу.

[0046] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) указанную реакцию проводят при рН в диапазоне от рН 7 до 8.

[0047] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) указанное соединение формулы (3), которое растворяют в указанном соразтворителе, медленно добавляют к ферментативному восстанавливающему средству в указанном водном буферном растворителе и в присутствии катализатора на основе металла, сокатализатора и кофактора. Предпочтительно указанный катализатор на основе металла представлен металлическим ванадием, более предпочтительно V_2O_5 или NH_3VO_4 . Предпочтительно указанный сокатализатор представлен GDH-101 и сахаром. Предпочтительно сахар представляет собой декстрозу или глюкозу. Предпочтительно указанный кофактор представляет собой $NADP^+$.

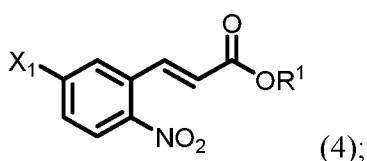
[0048] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 продукт (с2) представляет собой соль, выбранную из галогенидной соли, выбранной из соли HCl или соли HBr , или соли сульфоновой кислоты, выбранной из мезилатной соли, тозилатной соли или арилсульфонатной соли. Предпочтительно соль представляет собой галогенидную соль, более предпочтительно соль HCl . Более предпочтительный продукт (с2) представляет собой



[0049] В дополнительном подварианте осуществления любого из вариантов осуществления 2 или 4 применительно к (с2) более предпочтительно реакцию проводят при повышенной температуре. Предпочтительно температура находится в диапазоне от $40^\circ C$ до $50^\circ C$. Более предпочтительно от $43^\circ C$ до $47^\circ C$. Наиболее предпочтительно $45^\circ C$.

[0050] В варианте осуществления 5 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно варианту осуществления 2, дополнительно включающий получение указанного соединения (3), включающий

[0051] (d) приведение соединения формулы (4),



где X_1 представляет собой галоген; и указанный R^1 определен выше для соединения (3);

[0052] в контакт с тиольным средством в присутствии основания в органическом растворителе и при повышенной температуре с образованием указанного соединения (3) или его соли.

[0053] В подварианте осуществления варианта осуществления 5 применительно к (d) указанный X_1 в каждом из соединений (4) и (5) представляет собой фтор или хлор. Предпочтительно X_1 представляет собой фтор.

[0054] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 5 применительно к (d) указанное основание представляет собой карбонатную соль или фосфатную соль. Предпочтительно указанное основание представляет собой Cs_2CO_3 или K_3PO_4 .

[0055] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 5 применительно к (d) указанный органический растворитель выбран из DMF, DMAc или NMP.

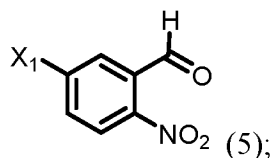
[0056] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 5 применительно к (d) указанная повышенная температура составляет от $50^\circ C$ до $85^\circ C$ или от $65^\circ C$ до $80^\circ C$. Предпочтительно указанная температура составляет $70^\circ C$.

[0057] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 5 применительно к (d) указанное тиольное средство представляет собой $C_6H_5CH_2SH$ или (C_1-C_6) алкил-SH, такой как CH_3SH . Предпочтительно указанное тиольное средство представляет собой $C_6H_5CH_2SH$.

[0058] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 5 применительно к (d) указанную реакцию проводят при условии низкого содержания воды и не используют избыток тиольного средства во избежание любого образования серы при обработке. Предпочтительно концентрацию воды поддерживают ниже 1000 ppm. Предпочтительно тиольное средство находится на уровне от 0,90 эквивалента до 1,1 эквивалента. В предпочтительном подварианте осуществления не происходит какого-либо образования серы при обработке.

[0059] В варианте осуществления 6 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно варианту осуществления 5, дополнительно включающий получение указанного соединения (4) или его соли, включающий

[0060] (e) приведение соединения формулы (5),



[0061] где X_1 представляет собой галоген, как определено для соединения (4); в контакт с алкилирующим средством в присутствии основания в органическом растворителе с образованием указанного соединения (4) или его соли.

[0062] В подварианте осуществления варианта осуществления 6 применительно к (e) указанный X_1 в каждом из соединений (4) и (5) представляет собой F или Cl.

[0063] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 6 применительно к (е) указанное алкенилирующее средство представляет собой реагент Виттига (включая трифенилфосфония илид или этил-2-(диэтоксифосфорил)ацетат) или реагент Хорнера-Уодсворта-Эммонса (HWE). Предпочтительно алкенилирующее средство представляет собой реагент Виттига. Более предпочтительно этил-2-(диэтоксифосфорил)ацетат.

[0064] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 6 применительно к (е) указанный органический растворитель выбран из DIPEA, CH_3CN , TEA, N-метилморфолина или их смесей. Предпочтительно растворитель представляет собой CH_3CN .

[0065] В дополнительном подварианте осуществления варианта осуществления 6 применительно к (е) указанная галогенидная соль выбрана из LiCl или LiBr. Предпочтительно галогенидная соль представляет собой LiCl.

[0066] В варианте осуществления 7 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или их любым подвариантам осуществления, где X в соединении (1) представляет собой йод.

[0067] В варианте осуществления 8 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 или их любым подвариантам осуществления, где X_1 в каждом из соединений (1) и (2) представляет собой фтор или хлор.

[0068] В варианте осуществления 9 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или их любым подвариантам осуществления, где R^1 в каждом из соединений (1), (2), (3) и (4) представляет собой метокси или этокси.

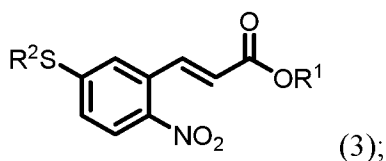
[0069] В варианте осуществления 10 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 или их любым подвариантам осуществления, где R^2 в каждом из соединений (1), (2) и (3) представляет собой бензил.

[0070] В варианте осуществления 11 настоящее изобретение обеспечивает способ согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 или их любым подвариантам осуществления, где указанное соединение (1) получают посредством следующего порядка реакций: (e), (d), (c1), а затем (a) и (b); или (e), (d), (c2), а затем (a) и (b).

[0071] В качестве альтернативы в подварианте осуществления указанное соединение (1) получают посредством следующего порядка реакций: (d), (e), (c1), а затем (a) и (b); или (d), (e), (c2), а затем (a) и (b).

[0072] Еще в качестве альтернативы в другом подварианте осуществления указанное соединение (1) получают посредством следующего порядка реакций: (d), (c1), (e), а затем (a) и (b); или (d), (c2), (e), а затем (a) и (b).

[0073] В варианте осуществления 11 настоящее изобретение обеспечивает соединение, которое представляет собой

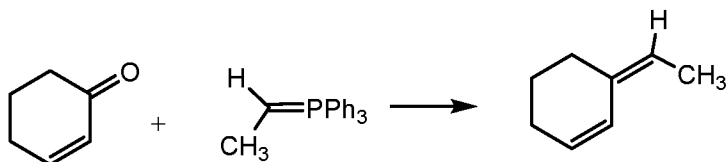


где R¹ представляет собой этил; и R² представляет собой бензил; или его соль.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0074] Если не указано иное, следующие термины, используемые в описании и формуле изобретения, определены для целей данной заявки и имеют следующее значение.

[0075] "Алкенирующее средство" означает средство, которое обеспечивает преобразование карбонильной группы в алкеновую группу. Два примера такого алкенирующего средства представляют собой "средство Хорнера-Уодсворта-Эммонса (HWE)" и "средство Виттига". Например, в реакции Виттига используются фосфораны для превращения α,β -ненасыщенного кетона в сопряженный алкен следующим образом:



Реакция Виттига обеспечивает получение *Z*-алкенов. Реакция Хорнера-Уодсворта-Эммонса (HWE) представляет собой вариант реакции Виттига, который обеспечивает получение *E*-алкенов. *Z*- и *E*-алкены относятся к относительному положению двух высокоприоритетных групп в алкеновой группе, как ясно понимается специалистами в данной области техники. Если высокоприоритетные группы находятся на одной стороне с алкеновыми группами, то алкен называется *Z*-алкеном (немецкий; *zusammen* означает вместе). Если высокоприоритетные группы находятся на сторонах, противоположных алкеновой группе, то алкен называется *E*-алкеном (немецкий; *entgegen* означает противоположный).

[0076] "(C _{α} -C _{β})алкил" означает линейный насыщенный одновалентный углеводородный радикал из одного-шести атомов углерода или разветвленный насыщенный одновалентный углеводородный радикал из трех-шести атомов углерода, например, метил, этил, пропил, 2-пропил, бутил (включая все изомерные формы), пентил (включая все изомерные формы) и т. п.

[0077] "Амино" означает -NH₂.

[0078] "(C _{α} -C _{β})алкокси" означает радикал -OR, где R представляет собой алкил, как определено выше, например, метокси, этокси, пропокси или 2-пропокси, *n*-, *изо*- или *трет*-бутокси и т. п.

[0079] "(C _{α} -C _{β})циклоалкил" означает циклический насыщенный одновалентный углеводородный радикал из трех-десяти атомов углерода, где один или два атома углерода

могут быть замещены оксогруппой, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил и т. п.

[0080] "Карбокси" означает -COOH.

[0081] "GDH-101" означает катализатор на основе фермента глюкозодегидрогеназы (GDH), который акцептирует оба кофактора NAD^+ и NADP^+ и активен при температурах до 50°C . GDH катализирует окисление D-глюкозы до D-глюколактона, тогда как, в свою очередь, восстанавливает NAD^+ или NADP^+ до NADH и NADPH соответственно. Продукт этой реакции, D-глюколактон, спонтанно и необратимо гидролизует в воде до глюконовой кислоты, таким образом способствуя образованию восстановленных NADH и NADPH . GDH-101 коммерчески доступен на Matthey.com.

[0082] "Гало" или "галоген" означает фтор, хлор, бром или йод.

[0083] Настоящее изобретение также включает защищенные производные соединений формулы (1). Например, когда соединения формулы (1) содержат группы, такие как гидроксигруппы, карбокси, тиол, или любую группу, содержащую атом(ы) азота, эти группы можно защищать с помощью подходящих защитных групп. Обширный список подходящих защитных групп можно найти в T.W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc. (1999), раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Защищенные производные соединений формулы (1) можно получать способами, хорошо известными в данной области.

[0084] "Соль" соединения означает соль, которая является фармацевтически приемлемой и которая имеет требуемую фармакологическую активность исходного соединения. Такие соли включают

[0085] соли присоединения кислоты, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т. п.; или образованные с органическими кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гексановая кислота, циклопентанпропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, молочная кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, 3-(4-гидроксифенил)бензойная кислота, коричная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 1,2-этандисульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, 4-хлорбензолсульфоновая кислота, 2-нафталинсульфоновая кислота, 4-толуолсульфоновая кислота, камфорсульфоновая кислота, глюкогептоновая кислота, 4,4'-метиленис-(3-гидрокси-2-ен-1-карбоновая кислота), 3-фенилпропионовая кислота, триметилуксусная кислота, третичная бутилуксусная кислота, лаурилсерная кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гидроксинафтойная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, муконовая кислота и т. п.; или соли, образованные, когда кислотный протон, присутствующий в исходном соединении, либо заменен ионом металла, например, ионом щелочного металла, ионом щелочноземельного металла или ионом алюминия; либо

образует координационную связь с органическим основанием, таким как этаноламин, диэтиламин, триэтиламин, триметамин, *N*-метилглюкамин и т. п. Следует понимать, что фармацевтически приемлемые соли являются нетоксичными. Дополнительную информацию относительно подходящих фармацевтически приемлемых солей можно найти в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, которая включена в данный документ посредством ссылки.

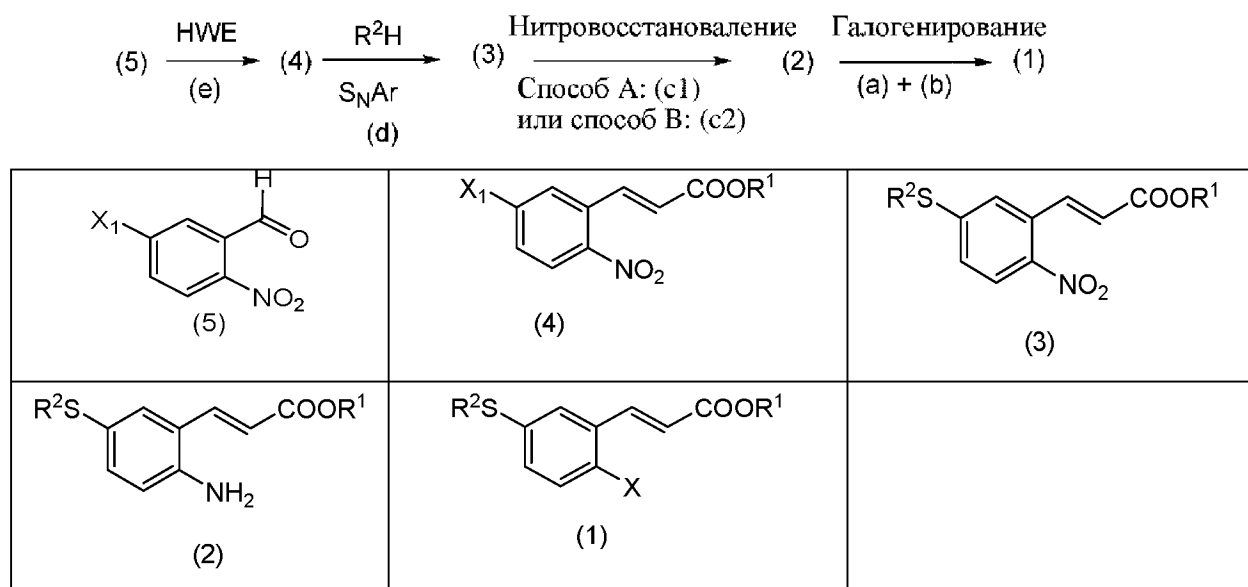
[0086] "Оксо" или "карбонил" означает группу $=\text{O}$.

[0087] "Необязательный" или "необязательно" означает, что описываемое далее событие или обстоятельство может иметь место или не иметь места, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство имеет место, и случаи, в которые оно не имеет места. Например, "гетероциклическая группа, необязательно замещенная алкильной группой" означает, что алкил необязательно может присутствовать, и описание включает ситуации, в которых гетероциклическая группа замещена алкильной группой, и ситуации, в которых гетероциклическая группа не замещена алкилом.

[0088] "Катализатор на основе благородного металла" означает благородный металл, широко используемый в химической промышленности, благодаря их способности ускорять химический процесс. Золото (Au), палладий (Pd), платина (Pt), родий (Rh), рутений (Ru) и серебро (Ag) являются некоторыми примерами благородных металлов.

[0089] ОБЩИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

[0090] Способы по настоящему изобретению можно осуществлять либо согласно способу А, либо способу В, представленным ниже, где каждый из R^1 , R^2 , X и X_1 определен выше,



[0091] Вышеуказанные способы А и В включают стадию (e): реакция Хорнера-Уодсворта-Эммонса (HWE); стадию (d): замещение арила ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$); стадию (c1): опосредованное металлом или (c2): ферментативно опосредованное нитровосстановление и стадии (a) + (b): галогенирование.

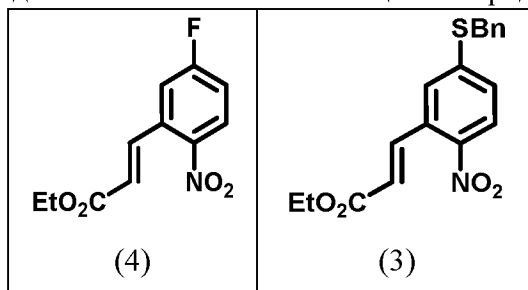
[0092] Специалисты в данной области техники поймут, что вышеуказанные способ А и способ В по настоящему изобретению можно проводить в различных порядках, и они

не ограничены порядками стадий, описанными в общих процедурах выше. Авторами настоящего изобретения предусматривается, что порядок стадий реакции по настоящему изобретению может варьироваться. Например, специалисты в данной области поймут, что вышеуказанные способы А и В можно проводить следующим образом: стадия (d): стадия, предусматривающая S_NAr; стадия(e): стадия, предусматривающая HWE; стадия (c1) или (c2): опосредованное металлом или ферментативно опосредованное нитровосстановление; а затем следуют стадии (a) + (b): галогенирование с образованием соединения (1).

[0093] В качестве альтернативы специалисты в данной области техники поймут, что вышеуказанные способы А и В можно проводить следующим образом: стадия (d): S_NAr; стадия (c1) или (c2): опосредованное металлом или ферментативно опосредованное нитровосстановление; стадия (e): HWE; а затем следуют стадии (a) + (b): галогенирование с образованием соединения (1).

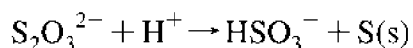
[0094] **Стадия (e): HWE.** Стадия HWE (e) является быстрой стадией и может завершаться за менее чем 1 ч. Это также чистая стадия, которая обычно обеспечивает получение продукта, представляющего собой соединение (4), с высоким выходом.

[0095] **Стадия (d): S_NAr.** Содержание воды, загрузка Cs₂CO₃ и загрузка Bn-SH являются очень важными параметрами на стадии, предусматривающей S_NAr. Высокая температура и длительное время реакции (10-12 ч) требуются для приведения в действие наблюдаемого промежуточного соединения и наблюдаемого образуемого в результате бис-добавления примесного соединения с образованием продукта, представляющего собой соединение (3). Как промежуточное соединение, так и образуемое в результате бис-добавления примесное соединение можно легко очищать посредством кристаллизации.



[0096] **Стадия (c1).** Fe⁰ представляет собой предпочтительный металл, используемый на опосредованной металлом стадии нитровосстановления с получением соединения (2). Это опасный материал, и активация является сильно экзотермической. Таким образом предпочтительно, чтобы стадию активации железа проводили перед добавлением соединения (3) в реакционную смесь.

[0097] **Стадии (a) + (b).** На стадии галогенирования тиосульфатное гашение обеспечивало образование элементарной серы (S₈), которая загрязняла выделенное соединение (1), следующим образом:

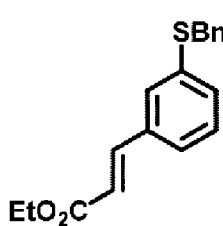
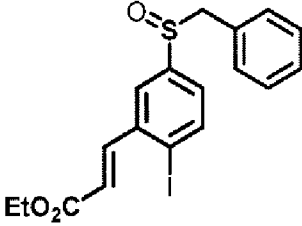


[0098] Варьирование в отношении присутствия серы наблюдали в различных партиях, получаемых на стадии галогенирования. Автор настоящего изобретения

обнаружил, что замена Na-тиосульфата ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) на Na-бисульфит (NaHSO_3) или аскорбиновую кислоту исключала образование серы и обеспечивает восстановление воспроизводимости и быстрой кинетики при образовании связи C-N.

[0099] Авторы настоящего изобретения обнаружили стратегию подавления образования примесей, образуемых в ходе осуществления основных способов, путем контроля температуры реакции (не выше 5°C), контроля инертности реакции и использования смеси растворитель/AQ, определенной выше (THF, CH_3CN , EtOAc, iPrAc). Путем использования этих параметров образование примесей, образуемых в ходе осуществления основных способов, указанное ниже, сводилось к минимуму и они подвергались легкой очистке при выделении. Основные примеси и побочные продукты сведены в таблицу 1.

[00100] Таблица 1. Примеси и побочные продукты на стадии (c1)

	 Дезаминирование	 Сульфоксид	Сера
	Дезамино-примесь	Сульфоксидная примесь	Элементарная сера
Причина	Восстановление H^+ диазония	[O] из сульфида	Гашение I_2 с помощью тиосульфата
Стратегия контроля	Темп., от 0°C до 5°C	Темп., от 0°C до 5°C	Не использовали тиосульфат
В ходе осуществления способа	2-6 AP	0-10 AP	н/п
Выделенные твердые вещества	0-0,2 AP	0-0,2 AP	0-0,78 AP
% очистки	85-92%	> 90%	н/п
Критическое значение (выход/качество)	НИЗКОЕ (выход)	НИЗКОЕ (выход)	ВЫСОКОЕ (качество)

[00101] **Стадия (c2). Стадия биокаталитического нитровосстановления**

Механизм реакции стадии биокаталитического нитровосстановления по настоящему изобретению в обобщенном виде показан следующим образом:



[00102] **Катализатор на основе металлического ванадия и время реакции**

[00103] Автор настоящего изобретения обнаружил, что в отсутствие катализатора на основе металлического ванадия образовывалось большее количество гидроксиламинового (НА) побочного продукта (*масса/заряд* составляет 329) с нижеследующей структурой:



, что подтверждается результатами LCMS и спектрами ЯМР применительно к реакционной смеси. В таблице 2 перечислены условия для 19 реакций, которые проводили с различными ферментативными катализаторами с образованием соединения (2a) с добавкой катализатора на основе металлического ванадия или без нее при норме загрузки фермента 2 мг/мл.

[00104] Протокол реакции для записей №№ 1-10: различные ферменты, представленные нитроредуктазами (NR), которые получали из набора нитроредуктаз Johnson Matthey, включая NR-55 (5 мг), взвешивали в 2 мл пробирках Эппендорф. Получали исходный раствор буфера: KPi (250 мМ, pH 7, глюкоза (100 мМ), NADP⁺ (1 мМ), GDH (1 мг м л⁻¹), который добавляли к каждому ферменту (400 мкл) вместе с 50 мкл исходного раствора субстрата (25 мМ на реакцию) и 50 мкл исходного V₂O₅ (2 мМ на реакцию). Реакционные смеси перемешивали при 35°C, 350 об/мин. в течение ночи.

[00105] Протокол реакции для записей №№ 11-14: NR-55 (10 мг), глюкозу (90 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) взвешивали в пробирках в карусели Radleys, оборудованных мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). 4,0 мл фосфатного буфера (pH 7, 250 мМ) и 1 мл DMSO (20 об. %), содержащего 46 мг соединения (3a) и 500 мкл исходного V₂O₅ (2 мМ конечная концентрация), добавляли в пробирки. Реакционные смеси перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys, нагревали до 45°C и отбирали образцы через 5 ч. (записи №№ 11-12) и 24 ч. (записи №№ 13-14).

[00106] Протокол реакции для записей №№ 15-18: NR-55 (10 мг), глюкозу (180 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) взвешивали в пробирках в карусели Radleys, оборудованных мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). 4,0 мл фосфатного буфера (pH 7, 250 мМ) и 1 мл DMSO (20 об. % или 30 об. %), содержащего 92 мг соединения (3a) и 500 мкл исходного V₂O₅ (2 мМ конечная концентрация), добавляли в пробирки. Реакционные смеси перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys, нагревали до 45°C и отбирали образцы через 5 ч. (записи №№ 15-18) и 24 ч. (записи №№ 15A-18A).

[00107] **Таблица 2. Тестирование различных условий реакции с катализатором на**

основе металлического ванадия на стадии (с2)

№	Катализатор на основе фермента	Катализатор на основе металла	DMSO, об. %	[(3a)], мМ	(3a) (%)	(2a) (%)	Другое (%)	НА (%)
1	NR-4	V ₂ O ₅	10	25	54	36	10	0
2	NR-5	V ₂ O ₅	10	25	57	34	9	0
3	NR-14	V ₂ O ₅	10	25	54	41	5	0
4	NR-17	V ₂ O ₅	10	25	71	28	1	0
5	NR-55	V ₂ O ₅	10	25	57	34	9	0
6	NR-4	Отсутствует	10	25	30	15	2	53
7	NR-5	Отсутствует	10	25	32	14	3	51
8	NR-14	Отсутствует	10	25	50	12	0	38
9	NR-17	Отсутствует	10	25	44	19	0	37
10	NR-55	Отсутствует	10	25	30	12	3	55
11	NR-55	V ₂ O ₅	20	25	12	39	13	37
12	NR-55	Отсутствует	30	25	5	7	6	82
13	NR-55	V ₂ O ₅	40	25	4	59	36	1
14	NR-55	Отсутствует	50	25	5	35	60	0
15	NR-55	Отсутствует	20	50	11	10	2	77
16	NR-55	Отсутствует	30	50	3	8	8	81
17	NR-55	V ₂ O ₅	20	50	7	27	18	48
18	NR-55	V ₂ O ₅	30	50	3	29	17	51
15A	NR-55	Добавленный V ₂ O ₅	20	50	9	53	38	0
16A	NR-55	Добавленный V ₂ O ₅	30	50	5	50	45	0
17A	NR-55	V ₂ O ₅	20	50	16	41	42	1
18A	NR-55	V ₂ O ₅	30	50	4	49	46	1
19	NR-55	NH ₄ VO ₃	30	100	17	66	15	1

НА представляет собой гидросиламиновый побочный продукт; [(3a)] представляет собой концентрацию соединения (3a).

[00108] Разрабатывали улучшенный способ HPLC, и последующие реакции анализировали посредством этого способа. NR-5 тестировали с V₂O₅ и без него и анализировали в различные моменты времени для проверки, подходит ли способ для

обнаружения короткоживущих промежуточных соединений, образуемых в ходе реакции. Отбирали образцы реакционной смеси через 1 ч., 5 ч. и 72 ч.

[00109] Через 1 ч. реакция с ванадием не показывала каких-либо дополнительных пиков, тогда как без ванадия возникал новый пик на 3,98 мин. (гидроксиламин). Через 5 ч. наблюдали новые пики как в присутствии ванадия, так и без него. Наблюдали несколько промежуточных соединений, образуемых в ходе реакции. Интересно отметить, что через 72 часа обе реакции показали повышенную конверсию в анилиновое соединение (2a) со снижением пиков на 3,99 мин. (гидроксиламин). Пик на 3,99 мин. представлен гидроксиламином, а пик на 5,06 мин. представлен нитрозосоединениями. LCMS, по-видимому, обеспечивает получение значений масса/заряд, составляющих 328 и 330, что соответствует нитрозопродукту и гидроксиламину. Последний пик элюирования на 8,18 мин. обеспечивает получение значения масса/заряд, составляющего 661 = $[M+Na]^+$, что соответствует массе побочного азоксипродукта.

[00110] Авторы настоящего изобретения дополнительно протестировали фермент NR-55 с ванадиевым катализатором и без него при масштабе 5 мл с нормой загрузки 2 мг/мл (см. записи №№ 11-14) и обнаружили, что, как наблюдалось ранее, ванадий влияет на распределение исходного продукта. В частности, через 5 часов в отсутствие V_2O_5 имело место значительное накопление гидроксиламина (82%) и только 7% анилина, тогда как с ванадием образовывалось 37% гидроксиламина и 39% анилина (см. записи №№ 11-12).

[00111] Через 24 ч. количество оставшегося гидроксиламина было незначительным как с ванадием, так и без него, что подтверждало то, что имела место спонтанная конверсия гидроксиламина в анилин и промежуточные нитросоединения (также называемая диспропорционированием или DP).

[00112] Однако было обнаружено, что количество другого побочного продукта, который определяли как азоксисоединение, образовавшегося в реакции без ванадия, было намного выше, находясь на уровне 42%. При более низких значениях загрузки катализатора роль ванадия была намного более заметной. Считается, что это вызвано снижением как скорости диспропорционирования, так и восстановления нитрозосоединений, а также накоплением этих совместно конденсированных промежуточных соединений с образованием азоксисоединения.

[00113] Авторы настоящего изобретения дополнительно тестировали фермент NR-55 с ванадиевым катализатором и без него путем удвоения концентрации субстрата до масштаба 50 мМ (18 г/л), в то же время сохраняя норму загрузки 2 мг/мл (см. записи №№ 15-18). Как 20 объемных %, так и 30 объемных % DMSO тестировали для сравнения при этой более высокой концентрации субстрата.

[00114] Через 5 часов без ванадия (см. записи №№ 15 и 16), как было обнаружено, образовывалось 77% и 81% гидроксиламина соответственно. Реакционные смеси, содержащие ванадий, обеспечивали получение более низких количеств гидроксиламина, но все еще довольно значительные количества, составляющие от 48% до 51%. Это было на приблизительно 10% выше по сравнению с предыдущей реакцией, которая происходила

при более низкой концентрации субстрата, составляющей 25 мМ. С ванадием образовалось на приблизительно 20% больше анилинового соединения (2а) через 5 ч. (см. записи 17 и 18). Количество ванадия, как обнаружили, являлось слишком низким, чтобы диспропорционирование являлось эффективным.

[00115] В отношении реакционных смесей под записями №№ 17 и 18 снова осуществляли отбор образцов через 24 ч. (см. записи №№ 17А и 18А), и 2 мМ ванадия добавляли в реакционные смеси под записями №№ 15 и 16 для установления того, насколько быстро происходит диспропорционирование (см. записи №№ 15А и 16А).

[00116] Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что через 24 ч. результаты для записей №№ 15А, 16 А, 17А и 18А были довольно сравнимыми после добавления ванадия через 5 ч. в случае записей №№ 15А и 16 А, т. е. получали от 41% до 53% анилина (2а). Результаты HPLC показывают, что азоксисоединения присутствовали в концентрации от 26% до 35%.

[00117] Обнаружили, что более высокие концентрации субстрата обеспечивали получение на приблизительно 10% более высокой конверсии в азоксисоединение через 24 ч., и через 24 ч. все еще оставался материал исходного нитросоединения (3а). Большие уровни накопления гидроксиламинового соединения, по-видимому, обеспечивают получение большего количества азоксисоединения в конце реакции. Результаты HPLC показали сильный эффект, обуславливаемый добавлением ванадия. Основная масса гидроксиламинового соединения превращалась в анилин (2а) и нитрозосоединение, которые затем вводили в реакцию с гидроксиламином с образованием азоксисоединения. Данные относительно второй процедуры отслеживания посредством HPLC собирали через 30 минут после добавления ванадия.

[00118] Реакцию интенсифицировали путем тестирования концентрации субстрата, составляющей 100 мМ (37 г/л), что равняется 184 мг в 5 мл. Исходный материал добавляли посредством шприцевого насоса со скоростью 1,5 мл/час (см. запись № 19). Использовали мешалку большего размера, поскольку таковые с меньшим размером не очень хорошо обеспечивали перемешивание при этой концентрации. Однако это приводило к накоплению липкой смолы на мешалке в конце реакции. Через 4 часа получали 63% анилина (3а), и, неожиданно, не происходило образование гидроксиламина. Через 24 ч. образовывалось 66% анилина (3а) и 7% азоксисоединения, но оставалось 17% исходного нитроматериала (2а). Хотя реакция протекала при этих более высоких концентрациях субстрата, реакционный сосуд, тип перемешивания и массоперенос следует принимать во внимание, чтобы избежать накопления липкой смолы на мешалке.

[00119] **Эффект рН в отношении условий реакции**

[00120] Авторы настоящего изобретения протестировали реакцию восстановления по настоящему изобретению при рН 7 и 8. рН 6 дополнительно тестировали, чтобы изучить любой эффект, который рН может оказывать на образование азоксисоединения.

[00121] Протокол реакции: NR-55 (10 мг), глюкозу (90 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) и V₂O₅ (0,1 экв.) взвешивали в пробирках в карусели Radleys, оборудованных

мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). 4,0 мл буфера на основе фосфата (рН 6, 250 мМ) и 1 мл (20%) DMSO, содержащего 46 мг соединения (3а), добавляли в пробирки. Реакционные смеси перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys, нагревали до 45°C и отбирали образцы через 24 ч. Различные условия реакции при различных значениях рН перечислены в таблице 3.

[00122] Таблица 3. Тестирование различных условий реакции с определением оптимального рН на стадии (с2)

№	рН	Время	(3а) (%)	(2а) (%)	Азокси (%)	Другое (%)	НА (%)
1	6	1 ч.	4	27	14	7	48
2	6	3 ч.	10	43	27	8	12
3	6	24 ч.	7	45	33	15	0

[00123] При рН 6 очень высокие уровни азоксисоединения, как было обнаружено, образовывались при только 25 мМ (33%) через 24 ч. времени реакции. Таким образом, рН 7 и 8 являются предпочтительными.

[00124] Добавление с помощью шприцевого насоса

[00125] Избегание накопления промежуточных соединений, образуемых в ходе реакции, по-видимому, являлось основным фактором для снижения образующегося количества азоксисоединений. Одним путем избегания накопления, является подход, предусматривающий добавление исходного материала партиями.

[00126] Субстрат, представленный соединением (3а), растворяли в DMSO и добавляли в течение 1 ч. при скорости потока 1 мл/ч. посредством шприцевого насоса. Использовали концентрацию субстрата, составляющую 50 мМ, уровень загрузки катализатора, составляющий 2 мг/мл, 20 об. % DMSO и NH_4VO_3 (0,1 экв.), поскольку эта соль ванадия показывала лучшую растворимость и незначительно лучшие уровни конверсии. По окончании 1 ч. образец отбирали после завершения добавления субстрата, и авторы настоящего изобретения обнаружили, что не имело места накопление промежуточных соединений, образуемых в ходе реакции. По прошествии дополнительного часа достигалась 80% конверсия в анилиновое соединение (2а) и по результатам HPLC наблюдалось только 8% азоксисоединения. Подход, предусматривающий добавление партиями, и более растворимый источник ванадия показали положительный эффект в отношении исхода реакции.

[00127] Тестировали более медленную скорость потока при добавлении субстрата посредством шприцевого насоса, составляющую 0,25 мл/ч., и через 2 ч. времени протекания реакции добавляли половину количества субстрата, и при этом реакция, как было видно, характеризовалась довольно чистыми продуктами с образованием главным образом соединения (3а) (58%) и анилинового соединения (2) (39%) и очень малым количеством промежуточных соединений, образуемых в ходе реакции. Однако после добавления оставшегося количества субстрата и по прошествии 24 ч. реакция не доходила до полной

конверсии. Могут иметь место проблемы со стабильностью применительно к реагентам NR или GDH, при этом, возможно, один из ферментов становится неактивным по прошествии этого времени при 45°C в 20% DMSO. Предпочтительной являлась более высокая скорость добавления.

[00128] **Катализатор на основе металла: количество и тестирование других металлов**

[00129] Железо и медь тестировали вместо металлического ванадия в качестве катализатора. Однако ванадий, как было обнаружено, являлся предпочтительным катализатором. Ванадий и золото дополнительно тестировали согласно следующему протоколу реакции: NR-55 (10 мг), глюкозу (90 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) и V/Au (0,5 экв.) взвешивали в пробирках в карусели Radleys, оборудованных мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). 4,0 мл буфера на основе фосфата (pH 6, 250 мМ) и 1 мл (20%) DMSO, содержащего 46 мг соединения (3а), добавляли в пробирки. Реакционные смеси перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys, нагревали до 45°C и отбирали образцы через 30 мин.

[00130] **Таблица 4. Тестирование различных условий реакции с различными катализаторами на основе металла на стадии (с2)**

№	Катализатор на основе металла	(3а) (%)	(2а) (%)	Азокси (%)	Другое (%)	НА (%)
1	Фталоцианин оксида V(IV)	4	17	7	3	69
2	Бис(2,4-пентандионат) оксида V(IV)	17	38	15	6	23
3	Гидрат ванадилсульфата	14	18	4	1	63
4	Окситриэтоксид V(V)	17	27	7	3	46
5	3% V (отменено)	9	25	13	7	46
6	Хлорид золота(III)	100	0	0	0	0
7	2,4-Пентандионат V(III)	7	61	17	9	6

[00131] По прошествии 30 мин. 2,4-пентандионат V(III) показал хороший уровень конверсии в анилин (2а) (61%) и наличие только 6% гидроксиламинового соединения (см. таблицу 4, запись 7). Хлорид золота(III), как обнаружили, полностью ингибировал реакцию при вышеуказанном протоколе, не показывая даже наличия следовых количеств каких-либо из промежуточных соединений, образуемых в ходе реакции (запись 6).

[00132] Реакции продолжали проводить и образцы отбирали снова через 5 ч. и 24 ч. Результаты показаны в таблицах 5 и 6 ниже.

Таблица 5. Результаты скрининга в отношении ванадия (и золота) по прошествии 5 ч.

№	Катализатор на основе металла	(3а) (%)	(2а) (%)	Азокси (%)	Другое (%)	НА (%)
1	Фталоцианин оксида V(IV)	4	27	15	6	48
2	Бис(2,4-пентандионат) оксида V(IV)	5	53	21	19	0
3	Гидрат ванадилсульфата	4	42	11	7	36
4	Окситриэтоксид V(V)	6	64	18	9	3
5	3% V (отменено)	6	43	27	19	5
6	Хлорид золота(III)	100	0	0	0	0
7	2,4-Пентандионат V(III)	5	64	18	13	1

[00133] По прошествии 5 ч. 2,4-пентандионат V(III) обеспечивал 66% конверсию в анилиновое соединение (2а) (запись 7). По прошествии 5 ч. результат в случае окситриэтоксида ванадия оказался сравнимым с таковым для ацетилацетоната ванадия(III). Имело место значительное накопление (19%) промежуточного нитрозосоединения в случае ацетилацетоната ванадия(IV) (запись 2) и в случае ванадия на углеводе (запись 5).

Таблица 6. Результаты скрининга в отношении ванадия (и золота) по прошествии 24 ч.

№	Катализатор на основе металла	(3а) (%)	(2а) (%)	Азокси (%)	Другое (%)	НА (%)
1	Фталоцианин оксида V(IV)	5	40	7	18	2
2	Бис(2,4-пентандионат) оксида V(IV)	6	55	15	18	0
3	Гидрат ванадилсульфата	4	59	4	15	1
4	Окситриэтоксид V(V)	5	68	7	9	2
5	3% V (отменено)	7	43	13	16	1
6	Хлорид золота(III)	99	0	0	1	0
7	2,4-Пентандионат V(III)	2	66	17	13	1

[00134] По прошествии 24 ч. пентандионат ванадия(III) и окситриэтоксид ванадия(V) показали самую высокую конверсию в анилиновое соединение (2а).

[00135] Авторы настоящего изобретения увеличили количество катализатора на основе металлического ванадия от 0,1 экв. до 1,0 экв., чтобы изучить, влияет ли количество катализатора на основе металла на величину диспропорционирования. Дополнительно тестировали альтернативный источник ванадия, представляющий собой NH_3VO_4 . NH_3VO_4 , как обнаружили, имеет более высокую растворимость по сравнению с V_2O_5 .

[00136] Протокол реакции: NR-55 (10 мг), глюкозу (90 мг), GDH-101 (5 мг), NADP+ (3,7 мг) и V_2O_5 (0,1-1,0 экв.) или NH_3VO_4 (0,1-1,0 экв.) взвешивали в пробирках в карусели

Radleys, оборудованных мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). 4,0 мл фосфатного буфера (pH 7, 250 мМ) и 1 мл DMSO (20 об. %), содержащего 46 мг соединения (3а), добавляли в пробирки. Реакционные смеси перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys, нагревали до 45°C и отбирали образцы через 24 ч.

[00137] Таблица 7. Тестирование различных условий реакции с оптимальным количеством катализатора на основе V₂O₅ и NH₃VO₄ на стадии (с2)

№	Катализатор на основе металла	Катализатор на основе металла Количество (экв.)	(3а) (%)	(2а) (%)	Азокси (%)	Другое (%)	НА (%)
1	V ₂ O ₅	0,1	2	63	22	10	3
2	V ₂ O ₅	0,2	2	66	21	9	2
3	V ₂ O ₅	0,5	2	68	20	9	1
4	V ₂ O ₅	1	3	73	20	4	0
5	NH ₃ VO ₄	0,1	2	63	21	11	3
6	NH ₃ VO ₄	0,2	6	66	16	9	3
7	NH ₃ VO ₄	0,5	3	71	15	9	2
8	NH ₃ VO ₄	1	2	75	15	5	3

[00138] Ферментативный катализатор: нитроредуктаза (NR) и соразтворитель

[00139] Автор настоящего изобретения обнаружил, что в предыдущих экспериментах 10 об. % DMSO использовали в качестве соразтворителя, однако, когда исходный раствор добавляли в водные условия реакции, раствор становился мутным, что указывает на то, что исходный материал не характеризовался высокой растворимостью в DMSO. В этих экспериментах ферменты, которые обеспечивали получение > 40% конверсии согласно результатам HPLC в случае 10% DMSO, тестировали в 10% толуола в качестве соразтворителя. На начальных стадиях реакции имелась чистая двухфазная система, и водный слой являлся прозрачным. По прошествии часа водный слой становился более мутным, а после встряхивания в течение ночи раствор являлся полностью мутным.

[00140] Протокол реакции: NR (5 мг) взвешивали в пробирках Эппендорф объемом 2 мл. Получали исходный раствор буфера: KPi (250 мМ, pH 7, глюкоза (100 мМ), NADP+ (1 мМ), GDH (1 мг мл⁻¹), который добавляли к каждому ферменту (400 мкл) вместе с 50 мкл исходного раствора субстрата в толуоле (25 мМ на реакцию) и 50 мкл исходного V₂O₅ (2 мМ на реакцию). Реакционные смеси перемешивали при 35°C в течение 24 ч. Реакционные смеси разбавляли с помощью 1 мл MeCN, перемешивали на вортексе и центрифугировали и аликвоту объемом 1 мл удаляли и анализировали посредством HPLC. Показатели конверсии были основаны на нескорректированном LCAP при 254 нм. Условия для 17 реакций предусматривали их проведение с различными нитроредуктазными

ферментативными катализаторами с образованием соединения (2a). Растворимость и массоперенос исходного материала оказывались лимитирующими факторами реакции.

[00141] При вышеуказанных условиях реакции авторы настоящего изобретения обнаружили, что другие ферменты, представленные нитроредуктазами, обеспечивали получение по меньшей мере или более чем 30% конверсию в анилиновое соединение (2a).

[00142] **Скрининг в отношении соразворителя при более высокой температуре реакции, составляющей 45°C**

[00143] Одним путем повышения растворимости является проведение реакции при более высокой температуре. NR-55 представляет собой фермент из набора, происходящий из термофильного организма. Обычно эти ферменты могут выдерживать более высокие температуры и являются более устойчивыми к более высоким объемам соразворителя. NR-55 тестировали в DMSO и толуоле (10-30 об. %) при pH 7 и при более высокой температуре, составляющей 45°C. Реакции проводили в масштабе 5 мл, используя карусель Radley с использованием высокой скорости перемешивания, составляющей 1000 об/мин., для способствования смешиванию.

[00144] Протокол реакции: NR-55 (50 мг), глюкозу (90 мг), GDH-101 (5 мг), NADP+ (3,7 мг) взвешивали в 6 пробирках в карусели Radleys, оборудованных мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). Для получения 10 об. % соразворителя в пробирку добавляли 4,5 мл фосфатного буфера (pH 7, 250 мМ) и 0,5 мл DMSO, содержащего 46 мг соединения (3a) и 500 мкл V₂O₅ (конечная концентрация 2 мМ). Реакционную смесь перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys и нагревали до 45°C в течение 24 ч. Смесь затем разбавляли с помощью 5 мл ацетонитрила, перемешивали, и центрифугировали, и анализировали посредством HPLC. Для получения 20 и 30 об. % объемы регулировали соответствующим образом.

[00145] В таблице 8 перечислены условия 6 реакций, которые проводили для тестирования толуола и DMSO в качестве соразворителя при 45°C с образованием соединения (2a).

[00146] **Таблица 8. Результаты тестирования соразворителей, представленных толуолом и DMSO, при температуре реакции 45°C**

№	Соразворитель	Объемный %	(3a) (%)	(2a) (%)	Азокси (%)	Другое (%)
1	Толуол	10	96	4	0	0
2	Толуол	20	93	6	1	0
3	Толуол	30	92	7	0	0
4	DMSO	10	17	68	6	9
5	DMSO	20	0	82	5	13
6	DMSO	30	0	84	6	10

[00147] NR-55, как обнаружили, обеспечивал очень низкие уровни конверсии в требуемый анилин (2a) в случае толуола в качестве соразворителя (таблица 8, записи 1-3).

В случае 20-30 об. % DMSO, однако, нитросоединение (3a) полностью расходовалось и наблюдались высокие уровни образования анилина (2a) (82-84% согласно LCAP при 254 нм, таблица 8, записи 5 и 6). Когда использовали только 10 об. % DMSO, все еще сохранялось 17% оставшегося исходного материала, что указывает на то, что растворимость субстрата играет важную роль в реакции. Эти уровни конверсии также намного выше, чем те, что наблюдались до сих пор, что указывает на то, что комбинация больших объемов соразтворителя, более эффективного перемешивания и более высокой температуры может быть благоприятной для протекания реакции. Реакционную смесь под записью № 5 дополнительно экстрагировали с помощью EtOAc (10 мл x 2), высушивали над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали под вакуумом и повторно анализировали посредством HPLC и ЯМР, чтобы убедиться, что отбор образцов реакционной смеси был репрезентативным для реакционной смеси.

[00148] С учетом успеха использования от 20% до 30% объема DMSO авторы настоящего изобретения протестировали NR-55 и NR-5 параллельно со сниженными уровнями загрузки катализатора (1000 об/мин.) и при pH 7 и 8, а также поддерживая температуру реакции на уровне 45°C. Образцы реакционной смеси отбирали через 5 ч., затем снова через 24 ч.

[00149] Протокол реакции: NR-5 или NR-55 (10-50 мг), глюкозу (90 мг), GDH-101 (5 мг) и NADP⁺ (3,7 мг) взвешивали в 12 пробирках в карусели Radleys, оборудованных мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). В пробирку добавляли 4 мл фосфатного буфера (pH 7 или 8, 250 мМ) и 1 мл DMSO, содержащего 46 мг соединения (3a) и 500 мкл V₂O₅ (конечная концентрация 2 мМ). Реакционные смеси перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys, нагревали до 45°C в течение 5 ч. и 24 ч.. Образцы реакционной смеси предусматривали отбор образца аликвоты реакционной смеси объемом 100 мкл, добавляли 500 мкл MeCN, перемешивали на вортексе, центрифугировали и анализировали с помощью HPLC. Некоторое количество нитросоединения (3a), как обнаружили, оставалось, но это был плечевой пик.

[00150] Через 5 ч. NR-55, по-видимому, потреблял исходное соединение (3a) по сравнению с NR-5, предпочтительно при норме загрузки субстрата 2 мг/мл.

[00151] Более низкую температуру 35°C дополнительно тестировали согласно следующему протоколу реакции: NR-55 (10 мг), глюкозу (90 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) и NH₄VO₃ (1 экв.) взвешивали в пробирках в карусели Radleys, оборудованных мешалкой (Fisher PTFE, цилиндрическая, 10×6 мм). 3,5 мл фосфатного буфера (pH 7, 250 мМ) и 1,5 мл (20%) DMSO, содержащего 46 мг соединения (3a), добавляли в пробирки посредством добавления шприцевым насосом при скорости 1,5 мл/ч. Реакционные смеси перемешивали при 1000 об/мин. в карусели Radleys, нагревали до 45°C и отбирали образцы через 1, 2, 4 и 24 ч.

[00152] Обнаружили, что реакция протекала при температуре реакции 35°C. 6% соединения (3a), как обнаружили, оставалось, и 15% азоксисоединения обнаруживалось в конце 24 ч. реакции.

[00153] **Тестирование буфера**

[00154] Ранее реакцию проводили только в фосфатном буфере, который является одним из наиболее используемых буферов и рентабельным для масштабирования. Проводили выбор буфера, чтобы увидеть, будут ли какие-либо альтернативы обеспечивать лучший профиль реакции. Проверили 10 буферов параллельно при концентрации 100 мМ с использованием концентрации субстрата, составляющей 25 мМ, и различных условий pH.

[00155] Протокол реакции: NR-55 (10 мг), глюкозу (96 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) и NH₄VO₃ (15 мг, 1 экв.) взвешивали в пробирках в карусели Radleys, оборудованных мешалкой. 3,5 мл буфера (pH 5-10, 100 мМ) и 1,5 мл (30%) DMSO, содержащего 46 мг соединения (3a). Реакционные смеси нагревали до 45°C и отбирали образцы через 2 ч. и 24 ч.

[00156] Реакционные образцы отбирали через 2 ч. и 24 ч. Результаты показаны в таблицах 9 и 10 ниже.

Таблица 9. Результаты скрининга буферов на стадии (с2) через 2 ч.

№	Буфер	(3a) (%)	(2a) (%)	НА (%)	Нитрозо	Азокси (%)	Другое (%)
1	Ацетат, pH 5	95	4	0	0	1	0
2	PIPES, pH 6	55	35	0	0	8	2
3	Бицин, pH 8	9	72	1	0	13	6
4	TES, pH 8	7	69	0	4	14	6
5	HEPES, pH 8	7	69	0	4	14	6
6	Трицин, pH 8	10	78	0	0	9	3
7	Трис, pH 8	16	68	0	3	8	5
8	CHES, pH 8	5	73	0	4	10	8
9	CAPS, pH 10	15	67	0	4	7	7
10	KPi, pH 7	10	53	1	6	16	14

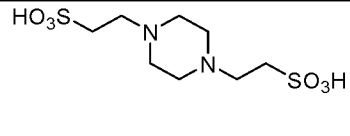
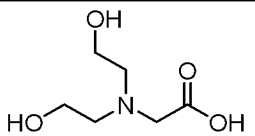
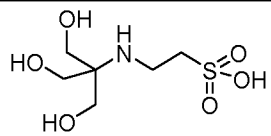
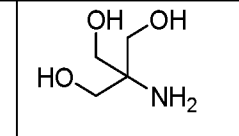
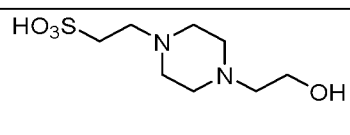
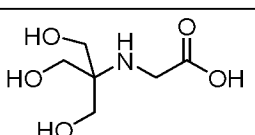
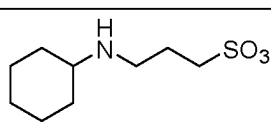
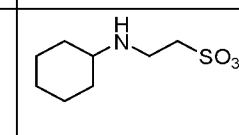
Таблица 10. Результаты скрининга буферов на стадии (с2) через 24 ч.

№	Буфер	(3a) (%)	(2a) (%)	НА (%)	Нитрозо	Азокси (%)	Другое (%)
1	Ацетат, pH 5	97	1	0	0	1	1
2	PIPES, pH 6	44	31	0	0	8	17
3	Бицин, pH 8	6	74	2	0	10	8
4	TES, pH 8	2	69	1	1	15	12
5	HEPES, pH 8	3	77	1	1	10	8
6	Трицин, pH 8	4	89	0	0	8	0
7	Трис, pH 8	2	74	2	0	12	10

8	CHES, pH 8	3	77	2	0	11	7
9	CAPS, pH 10	16	67	2	0	7	8
10	KPi, pH 7	10	59	2	0	19	10

[00157] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что через 24 ч. буфер на основе TRICINE обеспечивал получение 89% продукта, представляющего собой соединение (2a), 8% азокси и только 4% исходного материала (3a) (таблица 10, запись 6). Буферы на основе ацетата и PIPES обеспечивали самую низкую конверсию в соединение (2a) (записи 1 и 2). BICINE, HEPES, трис и CHES также показали хорошие результаты при конверсии более чем 70% в соединение (2a) через 24 ч.

[00158] Далее представлены химические структуры буферов, которые использовали в реакциях по настоящему изобретению.

 PIPES	 BICINE	 TES	 Трис
 HEPES	 TRICINE	 CHES	 CAPS

[00159] Авторы настоящего изобретения проводили реакции в буфере на основе TRICINE (100 мМ) с добавлением партиями исходного материала, представляющего собой соединение (3a). В этой реакции не использовали контроль pH, чтобы увидеть, как сильно уменьшается pH с ходом реакции и какой эффект это может иметь.

[00160] Протокол реакции: NR-55 (10 мг), глюкозу (386 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) и NH₄VO₃ (1 экв.) взвешивали в пробирке в карусели Radleys, оборудованной мешалкой. 3,5 мл буфера на основе TRICINE (pH 8, 100 мМ) и 1,5 мл (30%) DMSO, содержащего 184 мг соединения (3a), добавляли в пробирку посредством добавления шприцевым насосом со скоростью 1,5 мл/ч. Реакционную смесь перемешивали при 500 об/мин., нагревали до 45°C и отбирали образцы через 2, 4 и 24 ч.

[00161] Таблица 11. Тестирование различных условий реакции с оптимальным количеством катализатора на основе V₂O₅ и NH₃VO₄ на стадии (с2)

№	Буфер	(3a) (%)	(2a) (%)	НА (%)	Нитрозо	Азокси (%)	Другое (%)
1	Трицин-2 ч.	40	59	0	0	1	0
2	Трицин-4 ч.	5	91	0	3	2	0
3	Трицин-24 ч.	11	85	0	0	2	2

[00162] Обнаружили, что 100 мМ буфера на основе TRICINE обеспечивали более низкие уровни образования азокси (2%). pH измеряли в конце реакции, и он падал до pH

5,7. Реакционная смесь не была однородной, на стержне мешалки из раствора осаждалась маслянистая смола и некоторое количество желтого твердого вещества на стенках пробирки. После реакции реакционную смесь переносили во флакон и центрифугировали, и как водный слой, так и осадок анализировали для понимания состава. Кроме того, смолу на мешалке и желтый осадок растворяли в ацетонитриле и анализировали с помощью HPLC. Обнаружили, что твердое вещество в суспензии представляло собой 90% анилиновое соединение (2a). Как мешалка, так и стеклянная стенка содержали больше исходного нитроматериала (3a), а смола также улавливала некоторое количество промежуточного нитрозосоединения.

[00163] Реакцию повторяли в буфере на основе TRICINE с концентрацией 250 мМ и добавляли вручную NaOH (10 М), если pH падал в ходе реакции, поддерживая pH на уровне 8 на протяжении всей реакции.

[00164] Протокол реакции: NR-55 (10 мг), глюкозу (386 мг), GDH-101 (5 мг), NADP⁺ (3,7 мг) и NH₄VO₃ (1 экв.) взвешивали в пробирке в карусели Radleys, оборудованной мешалкой. 3,5 мл буфера на основе TRICINE (pH 8, 250 мМ) и 1,5 мл (30%) DMSO, содержащего 184 мг соединения (3a), добавляли в пробирку посредством добавления шприцевым насосом со скоростью 1,5 мл/ч. pH поддерживали на уровне 8, используя 10 М NaOH (~70 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 500 об/мин., нагревали до 45°C и отбирали образцы через 1, 3, 5 и 24 ч.

[00165] Через 24 часа по данным анализа HPLC состав реакционной смеси представлял собой 84% анилинового соединения 2a, 3% азокси и 4% нитро. На стенках обнаруживали осадок, и на мешалке образовалась маслянистая смола.

[00166] Таблица 12. Тестирование различных условий реакции для буфера и времени реакции на стадии (с2)

№	Буфер	(3a) (%)	(2a) (%)	НА (%)	Нитрозо	Азокси (%)	Другое (%)
1	Трицин-1 ч.	30	69	0	0	1	0
2	Трицин-3 ч.	35	62	0	0	1	2
3	Трицин-5 ч.	6	85	0	6	2	1
4	Трицин-24 ч.	4	84	0	3	3	6

[00167] На основе вышеуказанных условий реакции авторы настоящего изобретения показали, что каталитические реакции нитровосстановления можно проводить при множестве различных условий для превращения ароматического нитросоединения (3a) в анилиновое соединение (2a). Переменные условия реакции, которые можно использовать, включают без ограничения (1) фермент нитроредуктазу, предпочтительно NR-55; (2) температуру реакции предпочтительно 45°C; (3) растворитель и концентрацию растворителя, предпочтительно 30 об. % DMSO; (5) норму загрузки катализатора 2 мг/мл и (6) катализатор на основе металла, предпочтительно металлического ванадия, такой как V₂O₅ или NH₃VO₄. Подход добавления субстрата партиями, совмещенный с повышенной

концентрацией растворимого источника металлического ванадия, минимизировало накопление гидроксилamina и промежуточных нитрозосоединений, что приводило к снижению образования азокси. Эти соединения, представляющие собой побочные продукты, дополнительно восстанавливали с помощью (7) буфера, предпочтительно буфера на основе TRICINE. Реакция была показана в масштабе 1 г при концентрации 40 г/л субстрата с нормой загрузки катализатора 2 г/л.

[00168] Авторы настоящего изобретения понимали, что обеспечение реакции нитровосстановления можно интенсифицировать дополнительно путем использования подходящего типа реактора, предусматривающего механизм перемешивания, поскольку лимитирующий фактор, как оказалось, представлял собой низкую растворимость исходного материала, что приводит к образованию липкой смолы на мешалке. Использование различных типов реактора, чтобы избежать накопления липкой смолы на мешалке, таким образом, входит в объем настоящего изобретения. Кроме того, использование второго соразтворителя, поверхностно-активных веществ или глубоких эвтектических растворителей/ионных жидкостей для улучшения растворимости исходного материала, таким образом, входит в пределы объема настоящего изобретения.

[00169] Авторам настоящего изобретения также понятно, что скорость диспропорционирования гидроксиламинового соединения является основным фактором для минимизации образования побочного азоксипродукта в отсутствие фермента. Использование различных путей для оптимизации скорости диспропорционирования гидроксиламинового соединения, таким образом, входит в объем настоящего изобретения.

[00170] Авторам настоящего изобретения также понятно, что диспропорционирование в буфере на основе TRICINE происходит быстро. Таким образом, использование сниженного количества катализатора на основе металлического ванадия, составляющего менее чем 1 эквивалент, входит в объем настоящего изобретения.

[00171] Авторы настоящего изобретения также поняли, что одnoreакторная реакция может представлять интерес в долгосрочной перспективе. Таким образом, иммобилизация фермента нитроредуктазы входит в объем настоящего изобретения.

[00172] Настоящее изобретение далее будет описано со ссылкой на следующие конкретные примеры. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения, они будут служить только в качестве иллюстрации.

[00173] Следующие сокращения используются во всем описании и приложенной формуле изобретения, и они имеют следующие значения:

[00174] "AP" означает процент площади, что относится к площади под пиком, измеренным с помощью жидкостной или газовой хроматограмм. AP является функцией концентрации соединения в образце. Ниже представлен пример отчета GC, где % площади представляет AP каждого из названных соединений:

	Название	Время удерживания	Площадь	% площади	Высота
1	Анилин	1,919	1094751	89,13	1431757
2	Гидроксиамин	1,954	6693	0,54	7281
3	Неизвестно	2,005	15391	1,25	21542
4	Нитро	2,046	83190	6,77	115442
5	Азокси	2,434	28231	2,30	33356

[00175] "Ar" означает арил.

[00176] "соед." означает соединение или соединения.

[00177] "CH₃CN" или "MeCN" означает ацетонитрил.

[00178] "CPME" означает циклопропилметилловый эфир.

[00179] "DMAc" или "DMA" означает диметилацетамид.

[00180] "DMF" означает диметилформамид.

[00181] "DCM" означает дихлорметан.

[00182] "DMSO" означает диметилсульфоксид.

[00183] "EtOAc" означает этилацетат.

[00184] "ч." означает час или часы.

[00185] "HPLC" означает высокоэффективную жидкостную хроматографию.

[00186] "IPA" означает изопропиловый спирт.

[00187] "IPAc" означает изопропилацетат.

[00188] "IPC" означает производственный контроль, который является обычными проверками, которые выполняются в ходе разработки способа. Функцией производственного контроля является мониторинг и, при необходимости, адаптация производственных процессов, чтобы убедиться, что продукт соответствует своим техническим характеристикам. Например, если целевая конверсия продукта составляет 98%, если IPC не выполняет свою функцию, применяется такой ресурс, как увеличение времени выдержки реакции или дополнительная загрузка реагента.

[00189] "KF" означает значение титрования по Карлу Фишеру, которое является методом титрования, в котором используется объемное или кулонометрическое титрование для определения количества воды, присутствующего в каждом анализе, как измерено с помощью прибора для титрования по Карлу Фишеру. Химические вещества, используемые в путях синтеза, отмеченных в настоящем документе, включают, например, растворители, реагенты и катализаторы. Способы, описанные выше, могут также дополнительно включать стадии, или до, или после стадий, конкретно описанных в настоящем документе, для добавления или удаления подходящих защитных групп, чтобы, в конечном итоге, обеспечить синтез соединений. Кроме того, для получения требуемых соединений различные стадии синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или порядке. Превращения в рамках синтетической химии и методики использования защитных групп (введения и удаления защитных групп), пригодные в синтезе применимых соединений, известны в данной области и включают, например, описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M.

Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); и L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), и их последующих изданиях.

[00190] "LCMS" означает жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию.

[00191] "LiCl" означает хлорид лития.

[00192] "MIBK" означает метилизобутилкетон.

[00193] "мин." означает минуты.

[00194] "MSA" означает метансульфоновую кислоту (MeSO₃H).

[00195] "MTBE" означает метил-трет-бутиловый эфир.

[00196] "NMP" означает N-метил-2-пирролидон.

[00197] "Ph" означает фенил.

[00198] "ppm" означает части на миллион, единица концентрации.

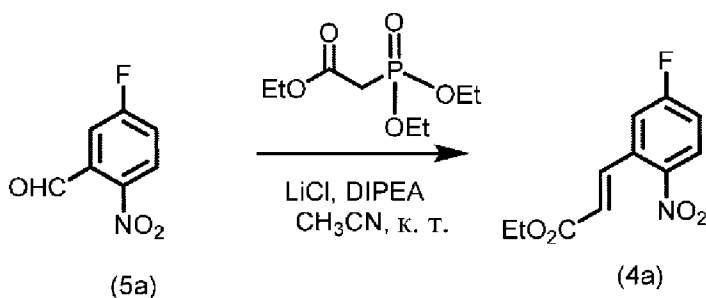
[00199] "к. т." или "RT" означает комнатную температуру.

[00200] "темп." означает температуру.

[00201] "THF" означает тетрагидрофуран.

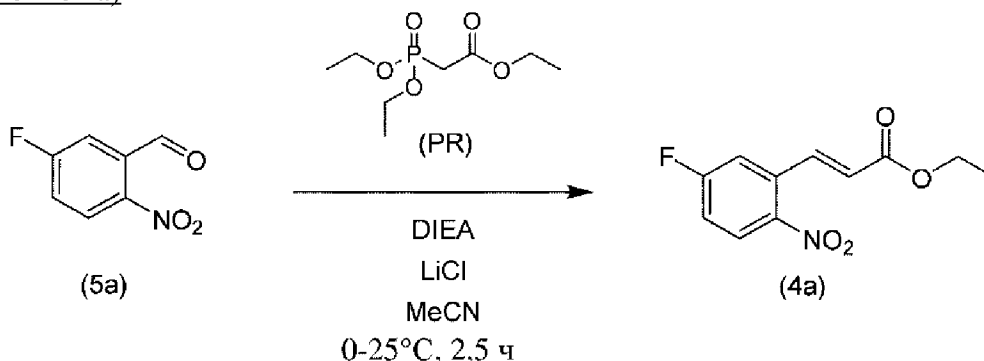
[00202] ПРИМЕРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

Стадия (e)



[00203] Пример 1.

[00204] Стадия (e). Получение этил-(E)-3-(5-фтор-2-нитрофенил)акрилата (соединение 4a)



[00205] Процедура реакции. Инертный сосуд А трижды продували газообразным азотом. Температуру рубашки реактора устанавливали на уровне $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Добавляли ацетонитрил (7,0 об., 343 кг) в сосуд А, а затем N, N-диизопропилэтиламин/основание Хюнига (DIEA) (1,1 экв., 52,1 кг), и смесь перемешивали в течение 10 минут. Затем

добавляли LiCl (2,0 экв., 31,1 кг) и смесь перемешивали снова в течение 10 минут. Температуру затем понижали до достижения внутренней температуры 0°C. Затем фосфорильный реагент (PR), этил-2-(диэтоксифосфорил)ацетат (1,05 экв., 86,2 кг) добавляли в смесь при поддержании внутренней температуры на уровне от 0°C до 5°C. Наблюдали медленное повышение температуры, и реакционная жидкость была белой и мутной. Реакционную смесь затем нагревали до достижения внутренней температуры 25°C и перемешивали при 25°C в течение 30 минут. Реакционную смесь затем охлаждали до достижения внутренней температуры 0°C. Затем медленно добавляли исходный материал, представляющий собой соединение 5-фтор-2-нитробензальдегид (соединение 5a, 1,0 экв., 62,0 кг), при поддержании внутренней температуры на уровне от 0°C до 5°C. Наблюдали медленное повышение температуры, и реакционная жидкость изменяла цвет с белого мутного на прозрачный коричневый. Реакционную смесь затем нагревали до достижения внутренней температуры 25°C и смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Наблюдали изменение цвета реакционной жидкости с коричневого на белый, и она загустевала. HPLC показала израсходование исходного материала (5a), и получали приблизительно 97,0% (220 нм) продукта, представляющего собой этил-(E)-3-(5-фтор-2-нитрофенил)акрилат (соединение 4a, 3,216 мин.). Затем в смесь добавляли воду (1,0 об., 62,0 л), и цвет реакционной жидкости изменялся с густого белого на прозрачный коричневый. Смесь перемешивали в течение 10 минут.

[00206] Таблица 13. Условие оптимизации стадии (e) с масштабом исходного материала (5a) 1 кг, 10 кг и 62 кг

Запись	Соединение (5a) (г)	Условия					Вес (г)
		PR (экв.)	LiCl/DIEA (экв.)	T(°C)	Время (ч)	Растворитель	
1	1,00 кг	1,20	LiCl (2,0 экв.), DIEA (1,1 экв.)	от 0°C до 25°C	2,5	MeCN (7,00 об.)	1,10 кг продукта и 550 г неочищенного вещества из маточной жидкости
2	10,0 кг	1,05	LiCl (2,0 экв.), DIEA (1,1 экв.)	от 0°C до 25°C	2,5	MeCN (7,00 об.)	87,6 кг, чистота 99,3%, выход 78,3%; кЯМР: 91,8%
3	62,0 кг	1,05	LiCl (2,0 экв.), DIEA (1,1 экв.)	от 0°C до 25°C	2,5	MeCN (7,00 об.)	KF=0,3-0,4% (5 точек)

PR=фосфорильный реагент, который представляет собой этил-2-(диэтоксифосфорил)ацетат

[00207] Процедура обработки. Масштаб 10 кг и масштаб 62 кг объединяли для обработки.

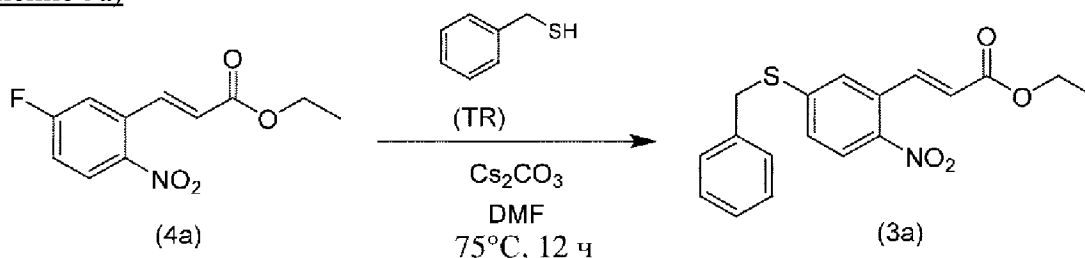
Метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ) (3,0 об., 160 кг) добавляли в смесь. Две фазы разделяли и водный слой экстрагировали один раз с помощью МТБЕ (2,0 об., 120 кг). Органические фазы затем объединяли и промывали насыщенным NH_4OAc (2,0 об., 160 кг). Органический слой затем концентрировали до приблизительно 3,0 об.

[00208] Процедура дистилляции. Изопропилацетат (iPAC) (192 кг) добавляли в смесь и концентрировали до приблизительно 3,0 об. путем дистилляции при атмосферном давлении. Это проводили дважды для обеспечения полной замены растворителя и удаления воды.

[00209] Процедура выделения. Добавляли н-гептан (10 об., 492 кг) и смесь охлаждали до достижения внутренней температуры -10°C . Затем смесь перемешивали при -10°C в течение 6 часов. Твердое вещество фильтровали и осадок на фильтре промывали н-гептаном (2,0 об., 98 кг) и охлаждали до -10°C . Твердое вещество затем высушивали в атмосфере газообразного N_2 . Белое твердое вещество; (87,6 кг, чистота 99,3%, выход 78,3%; кЯМР: 91,8%). Т. пл.: 59°C . ^1H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 8,15-8,10 (m, 2H), 7,32-7,21 (m, 2H), 6,35 (d, $J=15,8$ Гц, 1H), 4,30 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,36 (t, $J=7,1$ Гц, 3H).

[00210] Пример 2.

[00211] Стадия (d). Получение этил-(E)-3-(5-(бензилтио)-2-нитрофенил)акрилата (соединение 3a)



[00212] Процедура реакции. Инертный сосуд А трижды продували газообразным азотом. Температуру рубашки реактора устанавливали на уровне $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Загружали DMF (5,0 об., 337,5 л) в сосуд А и сосуд снова трижды продували газообразным азотом. Затем добавляли исходный материал, представляющий собой соединение этил-(E)-3-(5-фтор-2-нитрофенил)акрилат (соединение 2a, 1,0 экв., 67,5 кг), и смесь перемешивали в течение 20 минут. Медленно добавляли Cs_2CO_3 (1,0 экв., 86,5 кг) и наблюдали смену цвета реакционной жидкости с желтого на черный. Смесь перемешивали в течение 20 минут и сосуд снова трижды продували газообразным азотом. В смесь медленно добавляли тиольный реагент (TR), соединение фенилметантиол (1,0 экв., 33,6 кг), и температура медленно повышалась из-за экзотермической реакции. Смесь перемешивали в течение 10 минут и проверяли с помощью KF (KF: 0,12%). Смесь затем нагревали до достижения внутренней температуры 75°C и перемешивали при 75°C в течение 12 часов. HPLC показала, что исходный материал, представляющий собой соединение (4a) (3,216 минут), израсходовался, и образовалось приблизительно 92,6% продукта, представляющего собой

(E)-3-(5-(бензилтио)-2-нитрофенил)акрилат (соединение (3a), 4,139 минуты). Затем добавляли воду (5,0 об., 337,5 л) и наблюдали изменение цвета реакционной жидкости с густого белого на прозрачный коричневый. Смесь затем перемешивали в течение 10 минут.

[00213] Таблица 14. Условие оптимизации на стадии (d) с масштабом исходного материала (4a) 1,1 кг, 20 кг и 67,5 кг

Запись	Соед. (4a) (г)	Условия					Вес (г)
		TR (экв.)	LiCl/DIEA (экв.)	T(°C)	Время (ч)	Растворитель	
1	1,10 кг	1,00	CS ₂ CO ₃ (1,0 экв.)	70-80	12+4	DMF (5,00 об.)	1,32 кг продукта (выход 82,75%) и 180 г неочищенного вещества из маточной жидкости
2	20,0 кг	1,00	CS ₂ CO ₃ (1,0 экв.)	70-80	12	DMF (5,00 об.)	102 кг (чистота 97,2%, выход 86,0%)
3	67,5 кг	1,00	CS ₂ CO ₃ (1,0 экв.)	70-80	12	DMF (5,00 об.)	

PR=тиольный реагент, который представляет собой фенилметантиол

[00214] Процедура обработки. Масштаб 20 кг и масштаб 67,5 кг объединяли для обработки.

Метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ) (5,0 об., 675 л) добавляли в смесь. Две фазы разделяли и водный слой экстрагировали один раз с помощью МТБЕ (3,0 об., 405 л). Органические фазы затем объединяли и промывали водой (5,0 об., 675 л). Органический слой затем концентрировали до приблизительно 3,0 об.

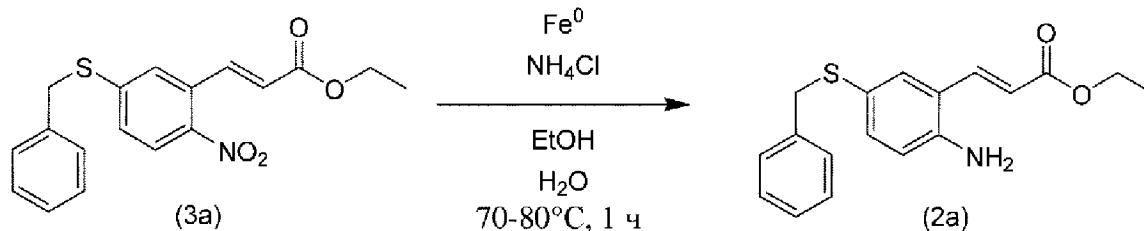
[00215] Процедура дистилляции. Изопропилацетат (IPAC) (192 кг) добавляли в смесь и концентрировали до приблизительно 3,0 об. путем нагревания.

[00216] Процедура выделения. Добавляли н-гептан (9,0 об., 1215 л) и смесь перемешивали при 25°C в течение 6 часов. Твердое вещество фильтровали и осадок на фильтре промывали н-гептаном (2,0 об., 270 л). Твердое вещество затем высушивали в атмосфере газообразного N₂. Желтое твердое вещество; (102 кг, чистота 97,2%, выход 86,0%). Т. пл.: 73°C. ¹H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 8,11 (d, J=15,8 Гц, 1H), 7,97 (d, J=8,6

Гц, 1H), 7,39-7,27 (m, 7H), 6,20 (d, $J=15,8$ Гц, 1H), 4,28 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 4,25 (s, 2H), 1,35 (t, $J=7,1$ Гц, 3H).

[00217] Пример 3а.

[00218] Стадия (с1). Получение этил-(Е)-3-(5-(бензилтио)-2-нитрофенил)акрилата (соединение 2а) посредством восстановления железом и NH_4Cl



[00219] Три реакции проводили параллельно. (34,0 кг x 3)

[00220] Процедура реакции. Температуру рубашки реактора, содержащей инертный сосуд, устанавливали на уровне $25 \pm 5^\circ\text{C}$. EtOH (4,0 об., 136 л) загружали в емкость. В сосуд затем добавляли воду (2,0 об., 68,0 л), а затем NH_4Cl (5,0 экв., 26,5 кг). Смесь затем перемешивали в течение 10 минут. Затем медленно добавляли Fe^0 (3,0 экв., 16,6 кг) и смесь перемешивали в течение 10 минут. Смесь затем нагревали до достижения внутренней температуры 70°C . Исходный материал, представляющий собой этил-(Е)-3-(5-(бензилтио)-2-нитрофенил)акрилат (соединение 3а, 1,0 экв., 34,0 кг), добавляли порциями в течение периода, составляющего 3 часа, при поддержании внутренней температуры на уровне приблизительно $70-80^\circ\text{C}$. Температуру медленно повышали. Смесь перемешивали при 80°C в течение 1 часа. LCMS показала, что исходный материал, представляющий собой соединение (3а), израсходовался, и образовалось приблизительно 93,6% продукта, представляющего собой этил-(Е)-3-(5-(бензилтио)-2-нитрофенил)акрилат (соединение (2а), 3,762 минуты). Реакционную смесь затем охлаждали, пока внутренняя температура не достигала 30°C . В таблице 15 показано, что реакция обеспечивала выход 82% и 82,5% соединения (2а) с высокой чистотой.

[00221] Таблица 15. Условие оптимизации с масштабом исходного материала (3а)
1,1 кг, 20 кг и 67,5 кг

№	(3а)	Условия					(2а)
		Fe (экв.)	NH_4Cl (экв.)	T($^\circ\text{C}$)	Время (ч.)	EtOH, H ₂ O	
1	800 г	3,0	5,0	70-80	1	4 об., 2 об.	630 г (чистота 98,3%, выход 82,0%)
2	2,5 кг (2X) 2 кг	3,0	5,0	70-80	1	4 об., 2 об.	5,50 кг (чистота 97,2%, выход 82,5%)

[00222] Процедура обработки. Три реакции, которые проводили выше, объединяли для обработки. Затем добавляли EtOAc (3,0 об., 102 л) и реакционную смесь затем перемешивали в течение 30 минут. Суспензию затем фильтровали через подушку из CELITE® и осадок на фильтре промывали этилацетатом (6,0 об., 204 л). Органические фазы объединяли, промывали водой (2,0 об. X 2, 190 л X 2) и проверяли с помощью КФ. (КФ: 6,60%). Изопропилацетат также использовали в качестве растворителя, альтернативного EtOAc.

[00223] Стадия выделения. Процедура кристаллизации. Твердое вещество, полученное на стадии обработки выше, дополнительно промывали н-гептаном (9,0 об., 857 л). Смесь затем нагревали, пока внутренняя температура не достигала 60°C, и перемешивали при 60°C в течение 1 часа. Смесь затем охлаждали до внутренней температуры 25°C и перемешивали при 25°C в течение 12 часов. Твердое вещество затем фильтровали и осадок на фильтре промывали н-гептаном (2,0 об., 190 л). Твердое вещество затем высушивали в атмосфере газообразного N₂. Желтое твердое вещество; (81,0 кг, чистота 98,7%, выход 82,5%; кЯМР: 92,6%). Т. пл.: 91°C. ¹H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 7,69 (d, J=15,7 Гц, 1H), 7,30-7,11 (m, 7H), 6,58 (d, J=8,3 Гц, 1H), 6,22 (d, J=15,8 Гц, 1H), 4,26 (q, J=6,9 Гц, 2H), 3,94 (s, 2H), 1,34 (t, J=6,9 Гц, 3H).

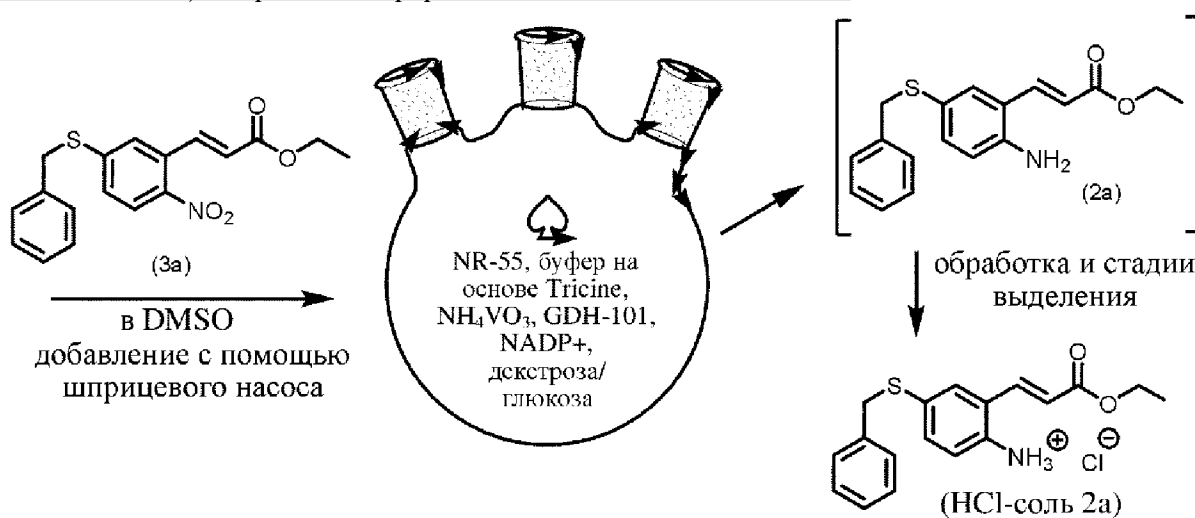
[00224] Таблица 16. Различные условия стадии кристаллизации после стадии (c1) соединения (2a)

	Неочищенный продукт	Растворитель	Объем	Температура	Продукт	Чистота	Выход
1	10,0 г	МТВЕ	3 об.	от 55°C до 0°C	5,20 г	97,3%	55,2%
2	2,00 г	IPAC	4 об.	от 60°C до 23°C	1,00 г	98,6%	53,8%
3	0,3 г	н-Гептан:IPAC =1:1	4 об.	от 60°C до 23°C	0,23 г	99,8%	83,6%
4	0,3 г	н-Гептан:IPAC =2:1	6 об.	от 60°C до 23°C	0,21 г	99,0%	75,7%
5	0,3 г	н-Гептан:IPAC =3:1	6 об.	от 60°C до 23°C	0,25 г	97,3%	88,6%
6	21,0 г	н-Гептан:IPAC =3:1	6 об.	от 60°C до 23°C	18,0 г	98,8%	92,5%
7	160 г	н-	6 об.	от 60°C до	135 г	98,3%	92,4%

		Гептан:IPAC =3:1		23°C			
8	15,0 г	н- Гептан:IPAC =3:1	6 об.	от 60°C до 23°C	12,9 г	97,4%	91,5%
9	15,0 г	н- Гептан:IPAC =3:1	6 об.	от 60°C до 23°C	12,4 г	99,2%	89,6%

[00225] Пример 3b.

[00226] Стадия (с2). Получение этил-(Е)-3-(5-(бензилтио)-2-нитрофенил)акрилата (соединение 2a) посредством ферментативного восстановления



[00227] Получение буферного раствора трицина. 330 ммоль буферного раствора трицина получали с помощью 54 г трицина и 900 мл воды. pH регулировали с помощью 10 н. NaOH до pH=8,0.

[00228] Получение соединения (2a) и (2a-HCl соли).

[00229] В колбу объемом 500 мл добавляли исходный материал, представляющий собой соединение (3a), 25,00 г, 66,08 ммоль, 95 масс. %), и DMSO (7,5 мл/г, 2640 ммоль, 100 масс. %). Смесь перемешивали в течение 30 минут для растворения всего твердого вещества.

[00230] В отдельный реактор объемом 1 л добавляли метаванадат аммония (1,00 экв., 66,08 ммоль, 100 масс. %), фермент NR-55 (0,10 г/г, 100 масс. %), декстрозу (4,5 экв., 297,4 ммоль, 100 масс. %), GDH-101 (0,025 г/г, 100 масс. %), динатриевую соль бета-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (0,040 г/г, 1,245 ммоль, 98 масс. %) и 440 мл вышеуказанного трицинового буфера (17,5 об., pH=8,0, 330 ммоль). Реактор нагревали до температуры приблизительно от 40°C до 45°C и затем медленно добавляли раствор субстрата в течение периода, составляющего 1,5 часа, с помощью шприцевого насоса. Как только добавление завершали, проверяли pH реакции и обнаружили, что он составляет

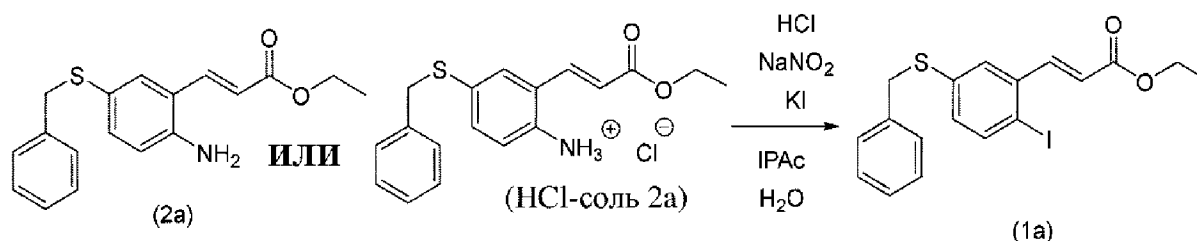
pH=6,5. pH затем доводили до 8,0 с помощью 10 н. NaOH. Образец отбирали для ИРС. Конверсия в течение ночи составляла 88%.

[00231] Дополнительное количество динатриевой соли бета-никотинамидадениндинуклеотидфосфата (0,01 г/г, 0,3112 ммоль, 98 масс. %) и GDH-101 (0,01 г/г, 100 масс. %) затем добавляли в реакционную смесь и перемешивание продолжали в течение еще 48 часов. Реакционную смесь затем фильтровали с получением неочищенного желтого твердого вещества.

[00232] Обработка и процедура выделения. Раствор фильтровали и промывали водой. Неочищенное твердое вещество суспендировали при 45°C с 15 объемами метил-ТНФ в течение ночи. Взвесь затем фильтровали через CELITE и концентрировали до получения масла. Масло затем разбавляли 20 объемами метил-ТНФ и добавляли HCl в CPME (1,5 экв., 99,12 ммоль, 3 моль/л) при комнатной температуре. Смесь затем перемешивали в течение 2 ч. и затем фильтровали и промывали с помощью метил-ТНФ, затем с помощью МТВЕ. Выделяли 21,1 г соединения (2а-HCl соль). 100 вес. %. 99,28 AP. Выход 91,5%. Т. пл.: 155°C. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d) δ 9,41 (s, 2H), 7,83 (d, J=15,7 Гц, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,36-7,20 (m, 7H), 6,61 (d, J=15,7 Гц, 1H), (m, 5H), 4,27 (s, 1H), 4,20 (q, J=7,1 Гц, 2H), (s, 1H), 1,27 (t, J=7,1 Гц, 3H).

[00233] Пример 4.

[00234] Стадии (а)+(b). Получение этил-(Е)-3-(5-(бензилтио)-2-йодфенил)акрилата (соединение 1а)



[00235] Процедура реакции. Инертный сосуд А трижды продували газообразным азотом. Температуру рубашки реактора устанавливали на уровне 25 ± 5°C. Изопропилацетат (15,0 об., 825 л) загружали в сосуд А. Затем добавляли исходный материал, представляющий собой этил-(Е)-3-(5-(бензилтио)-2-нитрофенил)акрилат (соединение (2а), 1,0 экв., 55,0 кг), а затем HCl (1,5 М, 5,0 экв., 585 л). Смесь затем перемешивали в течение 20 минут, и наблюдали, что реакционная жидкость меняла цвет с прозрачного желтого на мутный желтый. Смесь затем охлаждали до достижения внутренней температуры от 0°C до 5°C. NaNO₂ (2,0 экв., 24,2 кг) в H₂O (1,0 об., 55,0 л) медленно добавляли при внутренней температуре от 0°C до 5°C, в то же время внутренняя температура медленно повышалась (экзотермический эффект). Смесь перемешивали при температуре от 0°C до 5°C в течение 2 часов. HPLC показала, что исходный материал, представляющий собой соединение (2а), израсходовался.

[00236] Затем в смесь медленно добавляли KI (2,5 экв., 72,6 кг) в воде (1,0 об., 55,0 л) при поддержании внутренней температуры на уровне от 0°C до 5°C (незначительный

экзотермический эффект) и наблюдали, что реакционная жидкость изменяла цвет с желтого мутного на коричневый прозрачный. Реакционную смесь затем перемешивали при внутренней температуре от 0°C до 5°C в течение 5 часов. Вторая HPLC показала, что приблизительно 89,8% продукта, представляющего собой соединение (1a), образовалось за 4,368 мин. Затем добавляли раствор K_3PO_4 (50,0%, 5,0 об., 275 л) в воде для гашения реакционной смеси при внутренней температуре от 0°C до 5° для достижения примерного $pH=10$. (Медленное повышение температуры).

[00237] В альтернативной отдельной реакции продукт, представляющий собой соединение (2a-HCl соль), из примера 3b, использовали в качестве исходного материала для примера 4 и при таких же условиях реакции, что и для 2a.

Таблица 17. Условие оптимизации с различным масштабом исходного соединения (2a) с образованием (1a)

Запись	Соед. (2a) (г)	Условия				(1a) (г)
		LiCl/DIEA (экв.)	T(°C)	Время (ч.)	IPAC	
1	100 г	NaNO ₂ (2,0 экв.), KI (2,5 экв.), 1,5 М HCl (5,0 экв.)	От 0 до 5	7	15 об.	96,0 г (чистота 100%)
2	630 г	NaNO ₂ (2,0 экв.), KI (2,5 экв.), 1,5 М HCl (5,0 экв.)	От 0 до 5	7	15 об.	592 г (чистота 98,5%, выход 69,4%)
3	25 г	NaNO ₂ (2,0 экв.), KI (2,5 экв.), 1,5 М HCl (5,0 экв.)	От 0 до 5	7	15 об.	96,0 г (чистота 100%)
4	13 кг	NaNO ₂ (2,0 экв.), KI (2,5 экв.), 1,5 М HCl (5,0 экв.)	От 0 до 5	7	15 об.	56,0 кг (чистота 99,0%, выход 66,2%)
5	55 кг	NaNO ₂ (2,0 экв.), KI (2,5 экв.), 1,5 М HCl (5,0 экв.)	От 0 до 5	7	15 об.	

"Соед." означает соединение.

Таблица 18. Способ HPLC для определения элементарной серы, образовавшейся при различных условиях стадии обработки

Запись	Соед. (2a) (г)	Условие обработки	IPC (HPLC)
1	100 г	Na ₂ S ₂ O ₃ водн.	С помощью HPLC серу не обнаруживали.
2	630 г	Na ₂ S ₂ O ₃ водн.	С помощью HPLC обнаруживали на 8,262

			мин. (4680 ppm)
3	100 г	Na ₂ S ₂ O ₃ водн.	С помощью HPLC серу не обнаруживали.
4	100 г	Аскорбат натрия водн.	С помощью HPLC серу не обнаруживали.
5	1 кг	NaHSO ₃ водн.	С помощью HPLC серу не обнаруживали.

[00238] Процедура обработки. Препараты в масштабе 55,0 кг и 13,0 кг (2а) объединяли для обработки.

[00239] Реакционную смесь гасили бисульфитом натрия (2,5 экв., 3,0 об., 165 л). (Примечание: использование бисульфита Na, а не тиосульфата Na, является важным для предотвращения образования элементарной серы при обработке). Смесь затем нагревали до достижения внутренней температуры 25°C и перемешивали при 25°C в течение 30 минут. Слои разделяли и органическую фазу промывали водой (5 об., 275 л).

[00240] Процедура дистилляции. Органическую фазу дистиллировали до приблизительно 3 об. EtOAc. Смесь затем нагревали, пока внутренняя температура не достигала 50-55°C, и добавляли метанол (12 об., 816 л). Смесь затем перемешивали в течение 30 минут и охлаждали до внутренней температуры 25°C. Затем смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Смесь затем охлаждали до достижения внутренней температуры 0°C и перемешивали в течение 12 часов.

[00241] Процедура выделения. Смесь фильтровали и твердое вещество, полученное со стадии дистилляции выше, фильтровали и осадок на фильтре дополнительно промывали с помощью MeOH (2,0 об., 136 л). Твердое вещество затем высушивали в атмосфере газообразного N₂. Коричневое твердое вещество; (56,0 кг; чистота 99,0%; выход 66,2%). Т. пл.: 79°C. ¹H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 7,79 (d, J=15,8 Гц, 1H), 7,73 (d, J=8,2 Гц, 1H), 7,39 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,32-7,23 (m, 5H), 6,96 (dd, J=8,2, 2,3 Гц, 1H), 6,17 (d, J=15,7 Гц, 1H), 4,28 (q, J=7,1 Гц, 2H), 4,10 (s, 1H), 1,35 (t, J=7,1 Гц, 3H).

[00242] Стадия очистки. Неочищенный продукт (чистота 89,0%). Неочищенный продукт повторно суспендировали в 10 об. смеси MeOH/EtOAc (4:1) путем нагревания до 58°C, охлаждения до 0°C и фильтрования твердого продукта при 0°C.

[00243] Таблица 19. Тестирование различных условий реакции для растворителя на стадии очистки после стадий (а)+(b)

	Неочищенный продукт	Растворитель	Объем	Температура	Продукт	Чистота	Выход
1	0,5 g	MTBE	2 об.	от 60°C до 23°C	0,34 g	95,4%	72,8%
2	0,5 g	Изопропиловый эфир	3 об.	от 60°C до 23°C	0,38 g	91,5%	78,1%
3	0,5 g	Гептан:EtOAc=1:1	2 об.	от 60°C до 23°C	0,34 g	94,5%	72,2%

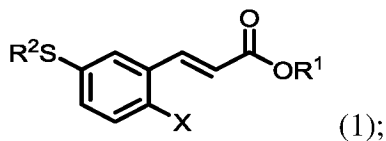
4	0,5 g	Гептан:EtOAc= 2:1	3 об.	от 60°C до 23°C	0,32 g	93,9%	67,5%
5	3,00 g	MeOH:EtOAc= 4:1	10 об.	от 58°C до 0°C	2,32 g	99,4%	86,3%
6	15,0 g	MeOH:EtOAc= 4:1	10 об.	от 58°C до 0°C	11,2 g	99,5%	83,9%

[00244] Вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров для целей ясности и понимания. Специалисты в данной области понимают, что изменения и модификации могут быть осуществлены на практике в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Следовательно, следует понимать, что приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения. Таким образом, объем настоящего изобретения следует определять не со ссылкой на приведенное выше описание, а вместо этого следует определять со ссылкой на следующую прилагаемую формулу изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения.

Все патенты, заявки на патенты и публикации, приведенные в данном документе, таким образом включены посредством ссылки в полном объеме для всех целей в той же мере, как если бы каждый отдельный патент, каждая отдельная заявка на патент или публикация были обозначены таким образом отдельно

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения соединения, характеризующегося формулой (1), или его фармацевтически приемлемой соли,



где

X представляет собой галоген, CN, CF₃ или OH;

R¹ представляет собой (C₁-C₆)алкил; 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-членный арил или гетероарил или 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-членную циклоалкильную или гетероциклоалкильную группу;

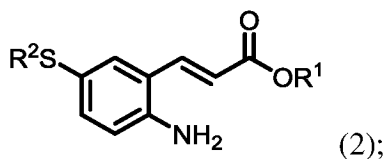
при этом гетероарильная или гетероциклоалкильная группа может содержать от 1 до 3 гетероатомов, независимо выбранных из O, N или S;

или атом углерода в циклоалкильной или гетероциклоалкильной группе может являться частью группы C=O;

R² выбран из (C₁-C₆)алкила или бензила;

включающий

(a) приведение соединения формулы (2),



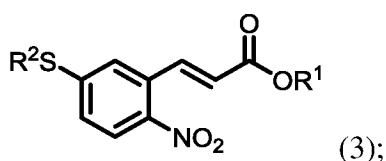
где указанные R¹ и R² определены выше для соединения (1); в контакт с кислотой НА в растворителе-1 и в присутствии соли азотистой кислоты;

(b) введение галогенирующего средства, цианирующего средства, трифторметилирующего средства или гидроксилирующего средства необязательно в присутствии растворителя-2 с образованием указанного соединения (1); где указанные растворитель-1 и растворитель-2 могут быть идентичными или различными; и

где указанное соединение (2) получают в ходе осуществления способа, не предусматривающего использования палладиевого катализатора.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий получение указанного соединения (2), включающий

(c1) обеспечение активации металла в присутствии кислой соли НА¹ в полярном растворителе и приведение соединения формулы (3),



где указанные R¹ и R² определены выше для соединения (1);

в контакт с указанным активированным металлом при повышенной температуре в

полярном растворителе с образованием указанного соединения (2) или его соли;

или в качестве альтернативы способ дополнительно включает получение указанного соединения (2), включающее

(с2) обеспечение реакции указанного соединения формулы (3) необязательно в присутствии соразтворителя с ферментативным восстанавливающим средством в водном буферном растворе и в присутствии по меньшей мере одного катализатора и кофактора с образованием указанного соединения формулы (2) или его соли.

3. Способ по п. 2, включающий

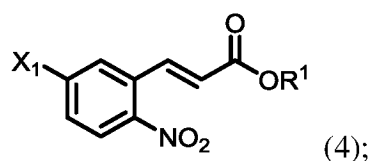
(с1) обеспечение активации металла в присутствии кислой соли HA^1 в полярном растворителе и приведение указанного соединения формулы (3) в контакт с указанным активированным металлом при повышенной температуре в полярном растворителе с образованием указанного соединения (2) или его соли.

4. Способ по п. 2, включающий

(с2) приведение указанного соединения формулы (3) в присутствии соразтворителя в контакт с ферментативным восстанавливающим средством в водном буфере и в присутствии катализатора на основе металла, сокатализатора и кофактора с образованием указанного соединения формулы (2) или его соли.

5. Способ по п. 2, дополнительно включающий получение указанного соединения (3) или его соли, включающий

(d) приведение соединения формулы (4),

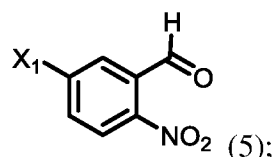


где X_1 представляет собой галоген; и указанный R^1 определен выше для соединения (3);

в контакт с тиольным средством в присутствии основания в органическом растворителе и при повышенной температуре с образованием указанного соединения (3) или его соли.

6. Способ по п. 5, дополнительно включающий получение указанного соединения (4), включающий

(e) приведение соединения формулы (5),



где X_1 представляет собой галоген, как определено для соединения (4); в контакт с алкилирующим средством в присутствии основания в органическом растворителе с образованием указанного соединения (4) или его соли.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где применительно к (а) указанная кислота НА представляет собой HCl, HBr, HI, p-TsOH или H₂SO₄.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где применительно к (а) указанный растворитель-1 представляет собой воду, THF, метил-THF, CH₃CN или (C₁-C₆)алкилацетатный растворитель или их смеси.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где применительно к (b) указанное галогенирующее средство представляет собой соль галогенида металла; указанное цианирующее средство представляет собой CuCN; указанное трифторметилирующее средство представляет собой CuCF₃; и указанное гидроксилирующее средство представляет собой Cu₂O/Cu(II).

10. Способ по любому из пп. 1-9, где применительно к (b) указанный растворитель-2 представляет собой воду, THF, метил-THF, CH₃CN или (C₁-C₆)алкилацетатный растворитель или их смеси.

11. Способ по любому из пп. 2-3 или пп. 5-10, где применительно к (c1) указанный металл выбран из Fe⁰, Zn⁰, Pd⁰, Pt⁰, Ru⁰ или Rh⁰.

12. Способ по любому из пп. 2-3 или пп. 5-11, где применительно к (c1) указанная кислая соль НА¹ представлена хлоридом аммония, образована уксусной кислотой или HCl.

13. Способ по любому из пп. 2-3 или пп. 5-12, где применительно к (c1) указанный полярный растворитель представляет собой воду, (C₁-C₆)алкиловый спирт или их смесь.

14. Способ по любому из п. 2 или пп. 4-10, где применительно к (c2) указанный соразтворитель выбран из DMSO или смеси вода/DMSO.

15. Способ по любому из п. 2, пп. 4-10 или п. 14, где применительно к (c2) указанный буфер выбран из буфера на основе фосфата, PIPES, TRICINE, VICINE, HEPES, трис, TES, CAPS, Kpi или CHES.

16. Способ по любому из п. 2, пп. 4-10 или пп. 14-15, где применительно к (c2) указанное ферментативное восстанавливающее средство представляет собой фермент нитроредуктазу.

17. Способ по любому из п. 2, пп. 4-10 или пп. 14-16, где применительно к (c2) указанный катализатор представлен катализатором на основе металла и сокатализатором; при этом указанный катализатор на основе металла представляет собой ванадиевый катализатор, выбранный из V₂O₅, NH₃VO₄, фталоцианина оксида V(IV), бис(2,4-пентандионата) оксида V(IV), гидрата сульфата ванадила, окситриэтоксид V(V), 3% V/C или 2,4-пентандионата V(III).

18. Способ по любому из п. 2, пп. 4-10 или пп. 14-17, где применительно к (c2) указанную реакцию проводят при pH в диапазоне от pH 7 до pH 8.

19. Способ по любому из п. 2, пп. 4-10 или пп. 14-18, где продукт (c2) представляет собой соль, выбранную из галогенидной соли, выбранной из соли HCl или соли HBr, или соли сульфоновой кислоты, выбранной из мезилатной соли, тозилатной соли или арилсульфонатной соли.

20. Способ по любому из пп. 5-19, где применительно к (d) указанный X_1 в каждом из соединений (4) и (5) представляет собой фтор или хлор.

21. Способ по любому из пп. 5-20, где применительно к (d) указанное основание представляет собой карбонатную соль или фосфатную соль.

22. Способ по любому из пп. 5-21, где применительно к (d) указанный органический растворитель выбран из DMF, DMAc или NMP.

23. Способ по любому из пп. 5-22, где применительно к (d) реакцию проводят при условии низкого содержания воды и не используют избыток тиольного средства.

24. Способ по любому из пп. 6-23, где применительно к (e) указанный X_1 в каждом из соединений (4) и (5) представляет собой F или Cl.

25. Способ по любому из пп. 6-24, где применительно к (e) указанный органический растворитель выбран из DIPEA, CH_3CN , TEA, N-метилморфолина или их смесей.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, где X в соединении (1) представляет собой йод.

27. Способ по любому из предыдущих пунктов, где X_1 в каждом из соединений (1) и (2) представляет собой фтор или хлор.

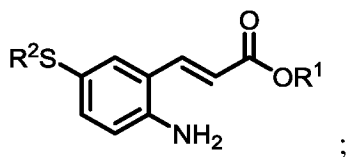
28. Способ по любому из предыдущих пунктов, где R^1 в каждом из соединений (1), (2), (3) и (4) представляет собой метокси или этокси.

29. Способ по любому из предыдущих пунктов, где R^2 в каждом из соединений (1), (2) и (3) представляет собой бензил.

30. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ осуществляют в следующем порядке с образованием указанного соединения формулы (1):

стадия (e); стадия (d); стадия (c1) или (c2); а затем следуют стадии (a) + (b);
стадия (d); стадия (e); стадия (c1) или (c2); а затем следуют стадии (a) + (b); или
стадия (d); стадия (c1) или (c2); стадия (e); а затем следуют стадии (a) + (b).

31. Соединение, которое представляет собой



где R^1 представляет собой этил; и R^2 представляет собой бензил; или его соль.

По доверенности