

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 890**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 19/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016** **PCT/GB2016/053875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017** **WO17098252**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016** **E 16812797 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021** **EP 3386998**

54 Título: **Síntesis diastereoselectiva de derivados de fosfato y del profármaco de gemcitabina NUC-1031**

30 Prioridad:

11.12.2015 IN 6635CH2015

08.02.2016 GB 201602185

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.03.2022

73 Titular/es:

NUCANA PLC (50.0%)

3 Lochside Way

Edinburgh EH12 9DT, GB y

LAURUS LABS LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

KOTALA, MANI BUSHAN y

DAMMALAPATI, VENKATA LAKSHMI

NARASIMHA RAO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 898 890 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Síntesis diastereoselectiva de derivados de fosfato y del profármaco de gemcitabina NUC-1031

Antecedentes de la Invención

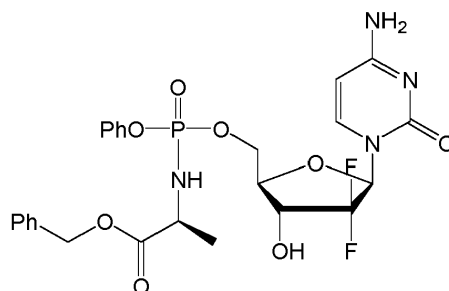
Varios análogos de nucleósidos tales como citarabina, fludarabina, cladribina, capecitabina, gemcitabina y pentostatina se usan clínicamente como agentes antineoplásicos de gran eficacia. Entre estos, la gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina; que se comercializa como GemzarTM) es de particular interés debido a su actividad única contra los tumores sólidos. Actualmente se ha aprobado para tratar cánceres de mama, de pulmón de células no pequeñas, de ovario y de páncreas y se usa ampliamente para tratar una variedad de otros cánceres, que incluyen el de vejiga, el biliar, el colorrectal y el linfoma.

Se cree que varios mecanismos de autopotenciación exclusivos de este análogo de nucleósido son responsables de la actividad de la gemcitabina contra los tumores sólidos. El metabolito difosfato de la gemcitabina inhibe la ribonucleótido reductasa, lo que da como resultado concentraciones más bajas de desoxicitidina trifosfato intracelular (dCTP) y, por lo tanto, a un aumento de la incorporación del metabolito trifosfato de gemcitabina en el ADN, lo que da como resultado la inhibición de la síntesis de ADN y bloquea la terminación del ciclo de división celular. Adicionalmente, la reducción en la concentración de dCTP regula en alza la enzima citidina quinasa, que es responsable de la fosforilación inicial de gemcitabina, una etapa necesaria en la inhibición de la síntesis de ADN por el fármaco. Finalmente, el metabolito trifosfato de la gemcitabina es un inhibidor de la citidina desaminasa, que es responsable de la inactivación de la gemcitabina por conversión en el metabolito uridina. En consecuencia, la naturaleza aditiva de los factores anteriores puede explicar la eficacia de la gemcitabina en el tratamiento de tumores sólidos.

Debido a la naturaleza lipofílica de las ProTides, estas moléculas pueden suministrar monofosfatos de nucleósidos directamente a la célula tumoral intacta. Estudios previos han caracterizado múltiples mecanismos de transporte celular para fármacos análogos de nucleósidos y sus derivados (para una revisión, véase Balimane y otros, Adv. Drug Delivery Rev. 1999, 39, 183-209). Un compuesto relativamente hidrófilo, la gemcitabina tiene una capacidad limitada para penetrar las membranas plasmáticas a través de la difusión pasiva y varios estudios han demostrado que la gemcitabina es un sustrato para los transportadores de nucleósidos de equilibrativos y concentrativos (ENT y CNT, respectivamente). Específicamente, la gemcitabina es transportada por ENT1, ENT2, CNT1 y CNT3 humanas, pero no por el transportador concentrativo selectivo de purina CNT2 (véase Mackey y otros, Cancer Res. 1998, 58, 4349-4357; Mackey y otros, J. Natl. Cancer Inst. 1999, 91, 1876-1881; y Fang y otros, Biochem. J. 1996, 317, 457465).

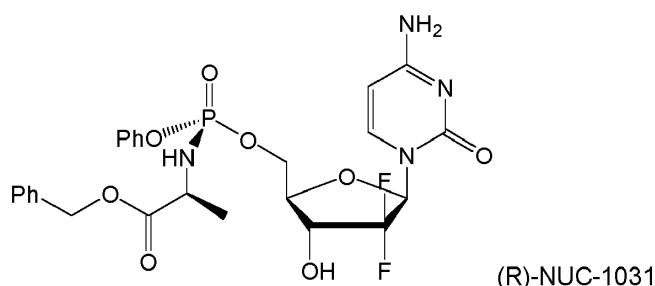
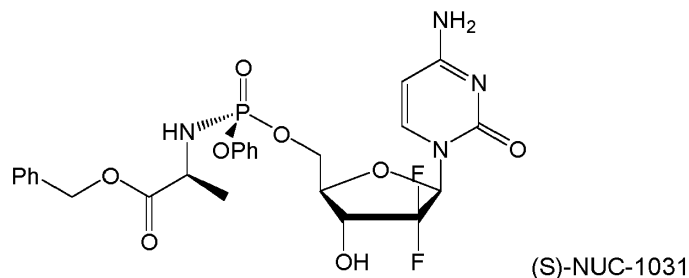
La Patente de Estados Unidos núm. 4,808,614 describe 2', 2'-difluoronucleósidos que son agentes antivirales y antitumorales conocidos, en particular 2', 2'-difluoro-2'-desoxicitidina (comúnmente conocida como gemcitabina).

La Patente de Estados Unidos núm. 7,951,787 describe derivados de fosforamido de nucleótidos tales como 2'-desoxi-2', 2'-difluoro-D-citidina-5'-O-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfato (también referido como gemcitabina-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfato o NUC-1031). Los métodos para sintetizar químicamente estos derivados se describen en esta patente mediante la reacción de gemcitabina o sus variantes estructurales con una mezcla diastereoisomérica de fosforcloridato tal como fenil-(benzoxi-L-alaninil)-fosforocloridato de Fórmula II en presencia de N-metilimidazol que sigue con la purificación del producto por cromatografía en columna, y se eluye con diclorometano/metanol 95:5 para dar un producto puro como un sólido espumoso blanco con muy bajo rendimiento del 16 %.



NUC-1031

La NUC-1031 se prepara típicamente como una mezcla de dos diastereoisómeros, epiméricos en el centro de fosfato (Slusarczyk y otros, J. of Med. Chem., 2014, 57 (4), 1531-1542). Los diastereoisómeros de la NUC-1031 tienen las siguientes estructuras:



La NUC-1031 es extremadamente lipófilo y, por tanto, poco soluble en agua (por cálculo: < 0,1 mg/ml), y las porciones ionizables tienen pKa calculados que se encuentran fuera del intervalo de pH adecuado para la administración parenteral. Es esencialmente insoluble en agua, independientemente del contenido de sal o del pH, y esto tiene implicaciones para el desarrollo de formulaciones para suministrar el compuesto en dosis suficientemente altas para un tratamiento eficaz. También tiene implicaciones para el desarrollo de procesos de fabricación eficientes que permitirán producir la NUC-1031 de manera rentable.

Recientemente se ha descubierto que el epímero (S) de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil]-fosfato tiene suficiente solubilidad en mezclas de varios solventes orgánicos polares con agua para hacerlo adecuado para la formulación y administración como un agente terapéutico. La solubilidad del epímero (R) es considerablemente menor. En determinadas mezclas de solventes, la diferencia de solubilidad entre el epímero (S) y el epímero (R) es de más de 100 veces. Por lo tanto, se espera que puedan desarrollarse métodos de administración clínicamente más eficaces, prácticos y amigables para el paciente mediante el uso del epímero (S) que los que pueden desarrollarse mediante el uso del epímero (R) o mediante el uso de la mezcla. Por tanto, es conveniente poder proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil]-(S)-fosfato en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

La baja solubilidad de la NUC-1031 en muchos solventes, particularmente los que se usan comúnmente en la separación de compuestos mediante el uso de HPLC, significa que se necesitarían grandes volúmenes de solventes para cualquier separación basada en HPLC. Esto significa que cualquier proceso de separación a escala industrial basado en HPLC sería de alto coste, consumiría grandes cantidades de energía y material y produciría grandes cantidades de desechos.

Aunque en el momento de presentar esta solicitud parece preferible administrar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil]-fosfato como el epímero (S), también pueden concebirse razones para necesitar obtener el epímero (R) en forma diastereoisoméricamente pura. Estos incluirían la realización de análisis comparativos, para convertir el epímero (R) en epímero (S) o porque el epímero (R) proporciona beneficios sobre el epímero (S) que superan su baja solubilidad.

De hecho, se ha demostrado que el epímero (R) tiene una vida media en la incubación con células hepáticas humanas aisladas que es cuatro veces mayor que la del epímero (S). La vida media más larga asociada con el isómero (R) indica un aclaramiento intrínseco más bajo y debería dar como resultado un perfil farmacocinético y farmacodinámico diferente al del isómero (S), que puede ofrecer algunos beneficios.

Ambos epímeros (S) y (R) son terapéuticamente activos.

El documento WO 2014/076490 describe un proceso para la preparación de profármacos nucleósidos tales como gemcitabina-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfato mediante la reacción de gemcitabina o sus variantes estructurales con una mezcla diastereoisomérica de fosfocloridatos en presencia de un catalizador que comprende sales metálicas

como $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, CuCl , CuBr , CuI , $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{OC}(\text{O})\text{CF}_3)_2$, $\text{Me}(\text{OTf})_3$, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, $\text{Fe}(\text{OTf})_3$, $\text{La}(\text{OTf})_3$ con un rendimiento del 45 %.

Bruce y otros describe una síntesis de fosforamidatos de nucleótidos diastereoisoméricamente puros y propone el uso de un solo isómero del reactivo fosforamidante que puede usarse para preparar el diastereómero de fosforamidato de nucleósido deseado. Los diastereoisómeros individuales de los reactivos fosforamidantes se aíslan mediante HPLC, cristalización o cromatografía de fluidos supercríticos (Bruce y otros, J. Org. Chem., 2011, 76, 9311-8319). El documento WO 2011/123645 A2 describe métodos similares para la síntesis de Sofosbuvir.

El documento WO 2016/030335 A1 también describe la separación de diastereoisómeros reactivos fosforamidantes mediante cromatografía de fluidos supercríticos.

Es un objetivo de ciertas modalidades de esta invención proporcionar un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-(benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

Es un objetivo de ciertas modalidades de esta invención proporcionar un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

Es un objetivo de ciertas modalidades de esta invención proporcionar un método para proporcionar el(los) epímero(s) (S) y/o (R) en forma(s) sustancialmente diastereoisoméricamente pura(s) que sea escalable, económico y/o eficiente, por ejemplo, más escalable, económico y/o eficiente que los métodos mediante el uso de HPLC. Por tanto, es un objetivo de ciertas modalidades de esta invención proporcionar un método para proporcionar el(los) epímero(s) (S) y/o (R) en forma(s) sustancialmente diastereoisoméricamente pura(s) que sea adecuado para la fabricación a gran escala.

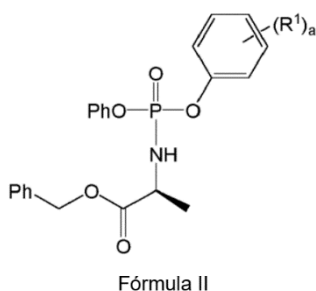
Es un objetivo de ciertas modalidades de esta invención proporcionar un método simple, es decir, un método que implica un número mínimo de etapas del proceso y/o reactivos para proporcionar el(los) epímero(s) (S) y/o (R) en forma(s) sustancialmente diastereoisoméricamente pura(s).

Otro objetivo de ciertas modalidades de esta invención es proporcionar un método que asegure que el epímero (S) o (R) separado se proporcione en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura y al mismo tiempo cumpla o exceda los criterios necesarios estipulados por organizaciones tales como la FDA de los EE. UU. con respecto a las cantidades y la naturaleza de las trazas de impurezas que surgen de la síntesis y separación.

Ciertas modalidades de esta invención satisfacen algunos o todos los objetivos anteriores.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un proceso para el enriquecimiento diastereoisomérico de un compuesto de Fórmula II;



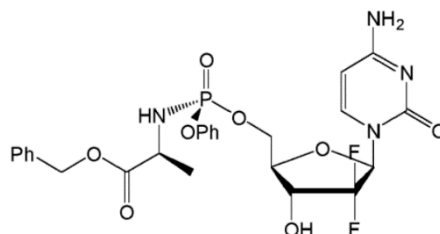
en donde R^1 representa un grupo sustractor de electrones y a es un número entero de 1 a 5, el proceso comprende:

a) suspender o disolver el diastereoisómero R del compuesto de Fórmula II; o una mezcla de los diastereoisómeros (R) y (S) del compuesto de Fórmula II en un solvente (S2);

b) tratar la solución o suspensión con una base de amina orgánica o una base inorgánica (B2) para obtener el diastereoisómero (S) en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura; y

c) aislar el diastereoisómero (S) de Fórmula II.

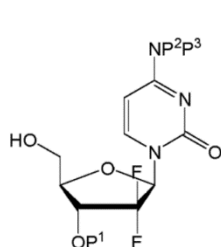
El proceso puede ser un proceso para la preparación del diastereoisómero (S) de gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfato (Fórmula I) en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura:



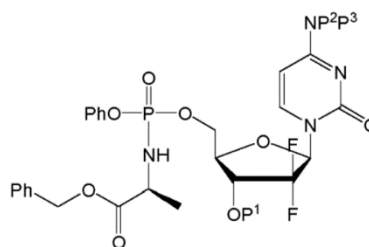
Fórmula I

el proceso comprende además la etapa d) y opcionalmente la etapa e):

d) hacer reaccionar un compuesto del diastereoisómero (S) de Fórmula II que se obtiene en la etapa c) con un compuesto de Fórmula III en presencia de una base (B1) para proporcionar un compuesto de Fórmula IV en forma sustancialmente diastereoméricamente pura; en donde P^1 , P^2 y P^3 independientemente representa hidrógeno o un grupo protector; y en donde el compuesto de Fórmula II está en forma sustancialmente diastereoméricamente pura:



Fórmula III

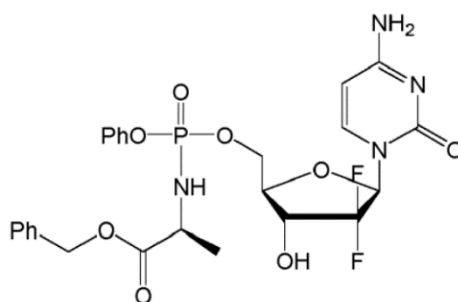


Fórmula IV

; y

e) donde cualquiera de uno o más de P^1 , P^2 y P^3 son grupos protectores, opcionalmente retirar los grupos protectores P^1 , P^2 y P^3 del compuesto de Fórmula IV para proporcionar (S)-gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfato en forma sustancialmente diastereoméricamente pura.

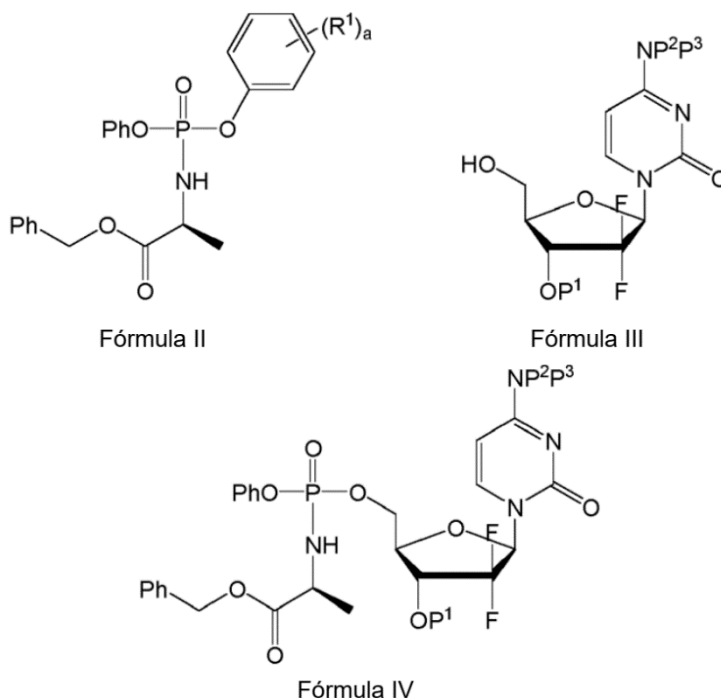
De acuerdo con la presente descripción, se proporciona un proceso para la preparación de gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfato (Fórmula I) en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura:



Fórmula I

el proceso comprende la etapa d) y opcionalmente la etapa e):

d) hacer reaccionar un compuesto de Fórmula II; en donde R^1 representa un grupo sustractor de electrones y a es un número entero de 1 a 5, con un compuesto de Fórmula III en presencia de una base (B1) para proporcionar un compuesto de Fórmula IV en forma sustancialmente diastereoméricamente pura; en donde P^1 , P^2 y P^3 independientemente representa hidrógeno o un grupo protector; y en donde el compuesto de Fórmula II está en forma sustancialmente diastereoméricamente pura:



e) en donde cualquiera de uno o más de P^1 , P^2 y P^3 son grupos protectores, opcionalmente retirar los grupos protectores P^1 , P^2 y P^3 del compuesto de Fórmula IV para proporcionar gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfato en forma sustancialmente diastereoméricamente pura.

R^1 puede seleccionarse del grupo que comprende: grupo halo (por ejemplo, se selecciona entre flúor, bromo, cloro o yodo); trifluorometilo, ciano y nitro. ha es un número entero entre 1 y 5. R^1 puede ser en cada aparición halo, por ejemplo, flúor. a puede ser 5.

El desplazamiento del grupo fenoxi sustituido tiene lugar con inversión de la estereoquímica del fosfato. Por tanto, el diastereoisómero (S) del precursor proporciona el diastereoisómero (S) de la NUC-1031 y el diastereoisómero (R) del precursor proporciona el diastereoisómero (R) de la NUC-1031.

La base (B1) puede ser una base de nitrógeno. Las bases nitrogenadas incluyen N-alquilimidazoles (por ejemplo, N-metilimidazol (NMI)), imidazol, piridinas opcionalmente sustituidas (por ejemplo, colidina, piridina, 2,6-lutidina) y trialkilaminas (por ejemplo, trietilamina, y diisopropiletilamina). Alternativamente, la base (B1) puede ser una base organometálica o una base de hidruro metálico (por ejemplo, NaH). Por tanto, la base puede ser un reactivo de Grignard (es decir, un haluro de alquilmagnesio). Los reactivos de Grignard ilustrativos incluyen haluros de *t*-butilmagnesio tales como *t*BuMgCl, *t*BuMgBr. Preferentemente, la base es *t*BuMgCl.

El proceso para la preparación de diastereoisómero (S) de gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfato (Fórmula I) en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura puede realizarse en un solvente S_1 .

Los inventores han descubierto sorprendentemente que al tratar compuestos de Fórmula II con una base, se isomerizan, y forman preferentemente el diastereoisómero (S) sobre el diastereoisómero (R). Por tanto, el diastereoisómero (R) puede convertirse en el diastereoisómero (S) o una mezcla epimérica del diastereoisómero (R) y el diastereoisómero (S) puede convertirse en el diastereoisómero (S). Esto aumenta la eficiencia neta de cualquier secuencia sintética para producir el diastereoisómero (S) de la NUC-1031 que incorpora el proceso del primer aspecto, ya que significa que todo el compuesto de Fórmula II, incluso el que originalmente se formó como diastereoisómero (R) puede usarse y no se descarta nada.

Puede ser que el proceso comprenda además:
formar el compuesto de Fórmula II como una mezcla de los diastereoisómeros (R) y (S); y

esa etapa a) comprende suspender o disolver la mezcla de los diastereoisómeros (R) y (S) del compuesto de Fórmula II en un solvente (S_2).

- La base (B2) puede seleccionarse del grupo que consiste en bases de amina orgánica (por ejemplo, aminas primarias, secundarias, terciarias, amina cíclica; las bases de amina orgánica ilustrativa incluyen bases que incluyen N-alquilimidazoles, (por ejemplo, N-metil imidazol (NMI), imidazol, piridinas opcionalmente sustituidas (por ejemplo, colidina, piridina, 2,6-lutidina) y trialquilaminas (por ejemplo, trietilamina y diisopropiletilamina)) o bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxido de metal alquilo, carbonatos de metal alquilo, alcóxidos de metal alquilo, arilóxidos de metal alcalino). Preferentemente, B2 es una amina terciaria. Por tanto, B2 puede ser una trialquilamina. Con la máxima preferencia, B2 es trietilamina.
- 5 El solvente S2 puede seleccionarse del grupo que consiste en amidas, éteres, ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos, solventes halogenados, nitrilos, sulfóxidos, sulfonas y sus mezclas. S2 puede ser un solvente orgánico. Los solventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, éteres (por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, éter dietílico); cetonas (por ejemplo, acetona y metil isobutil cetona); solventes halogenados (por ejemplo, diclorometano, cloroformo y 1,2-dicloroetano); hidrocarburos (por ejemplo, ciclohexano, pentano, hexano, heptano), solventes
- 10 aromáticos (por ejemplo, benceno y tolueno), ésteres (por ejemplo, acetato de etilo) y amidas (por ejemplo, DMF, NMP); o sus mezclas. Preferentemente, S2 es un hidrocarburo o es una mezcla que comprende un hidrocarburo. Cuando S2 es una mezcla, puede ser una mezcla que comprende más del 50 % (por ejemplo, más del 70 %) del hidrocarburo. S2 puede ser un hidrocarburo. El hidrocarburo puede ser hexano. El hidrocarburo puede ser heptano.
- 15 S2 puede ser una mezcla de hexano o heptano y un solvente orgánico polar (por ejemplo, un éter, éster, alcohol o solvente halogenado). S2 puede ser una mezcla de hexano o heptano y un solvente orgánico polar, la mezcla que comprende más del 50 % (por ejemplo, más del 70 %) en volumen de hexano o heptano. S2 puede ser una mezcla de hexano o heptano y acetato de etilo. S2 puede ser una mezcla de heptano y acetato de etilo. S2 puede ser una mezcla de hexano o heptano y acetato de etilo, la mezcla que comprende más del 50 % (por ejemplo, más del 70 %) en volumen de hexano o heptano. S2 puede ser una mezcla de heptano y acetato de etilo, la mezcla que comprende
- 20 más del 50 % (por ejemplo, más del 70 %) en volumen de heptano.
- 25 La etapa b) puede implicar agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 durante 2 h o más. La etapa b) puede implicar agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 durante 6 h o más. La etapa b) puede implicar agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 durante 10 h o más. La etapa b) puede implicar
- 30 agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 durante 16 h o más. La etapa b) puede implicar agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 durante hasta 36 h.
- La etapa b) puede implicar agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 a una temperatura de 0 a 50 °C. La etapa b) puede implicar agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 a una temperatura de
- 35 10 a 35 °C.

En ciertas modalidades específicas, el compuesto de Fórmula II es un compuesto seleccionado de:

5

10

15

20

25

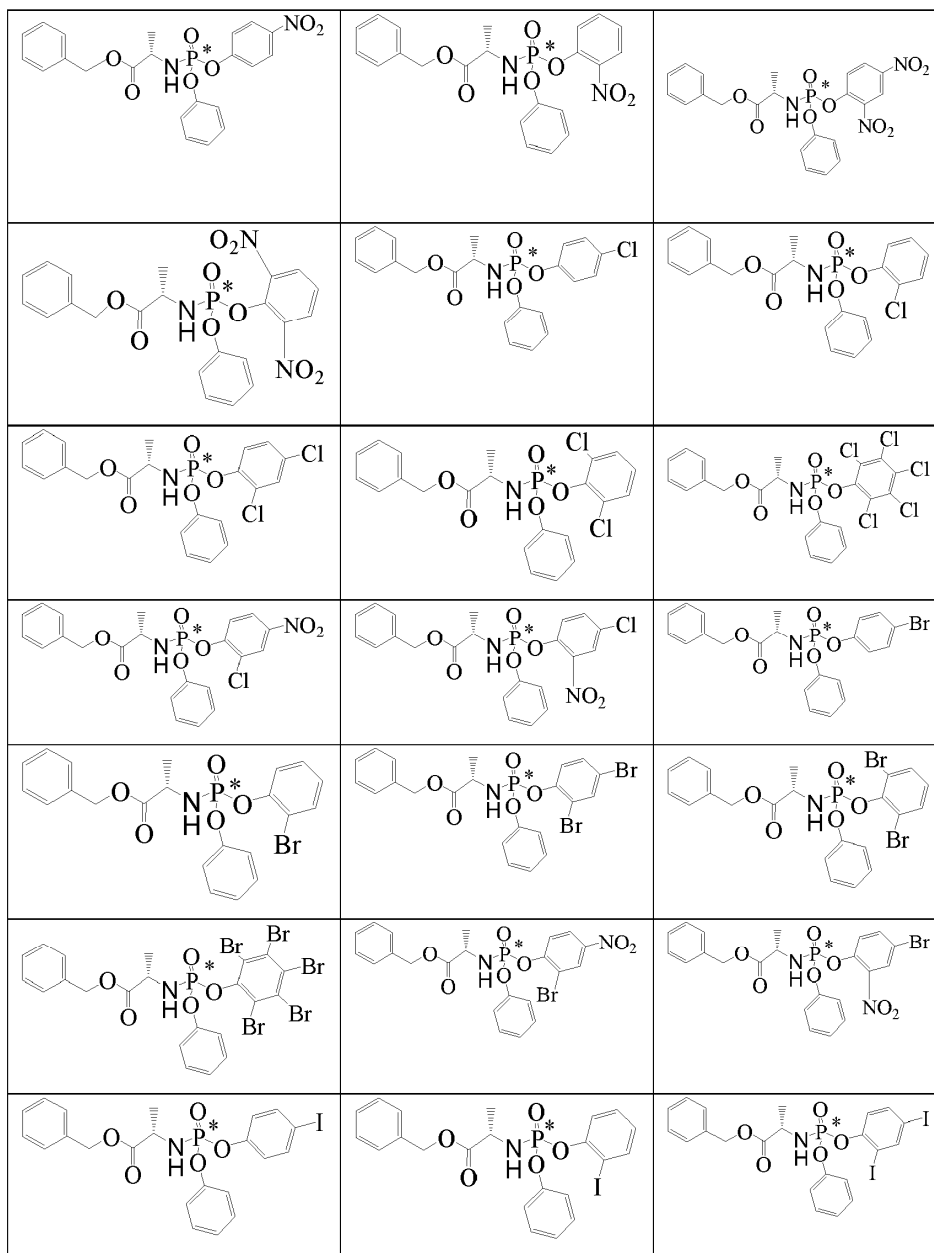
30

35

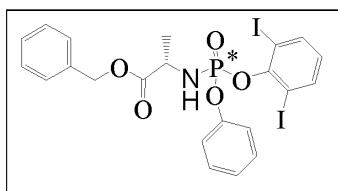
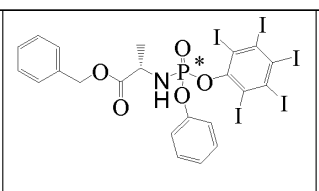
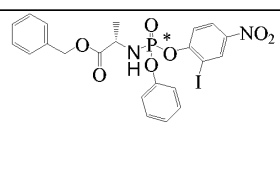
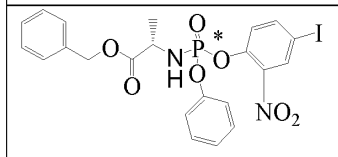
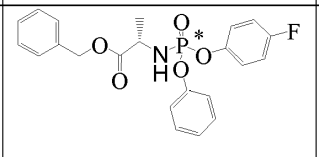
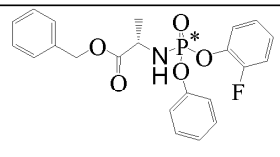
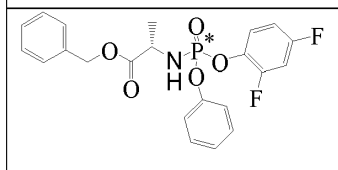
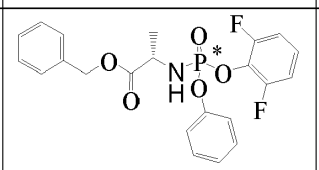
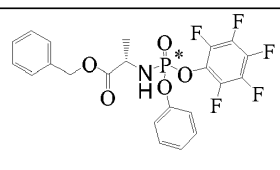
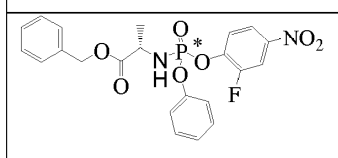
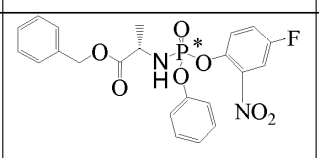
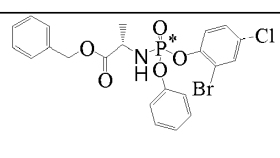
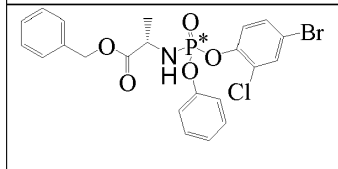
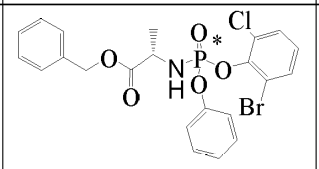
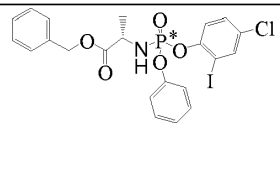
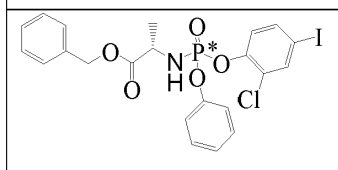
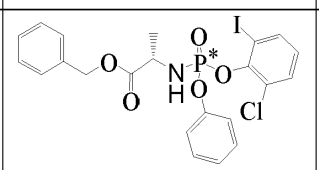
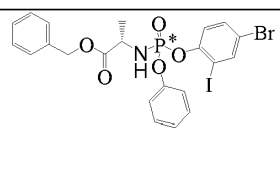
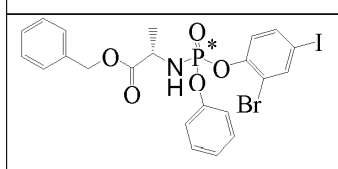
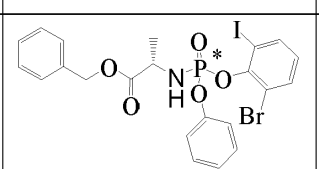
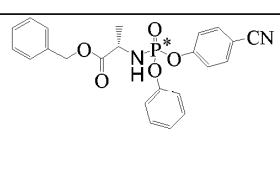
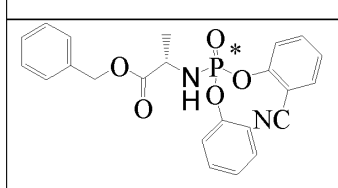
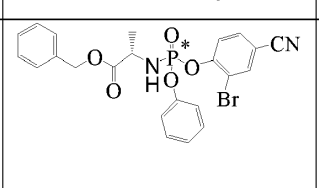
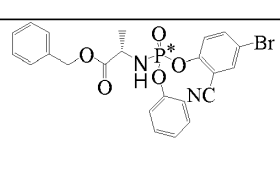
40

45

50



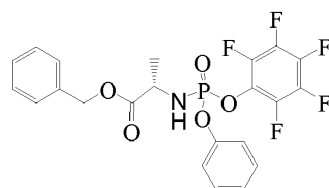
5

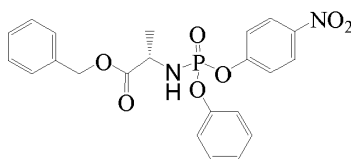
50

* representa el centro quiral

El compuesto de Fórmula II puede ser:



El compuesto de Fórmula II puede ser:



Un grupo protector para un grupo hidroxilo (por ejemplo, P¹) puede seleccionarse independientemente de entre -Si(alquilo C₁₋₆)₃ opcionalmente sustituido, -C(O)-alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, -C(O)-arilo opcionalmente sustituido, -C(O)-O-alquilo C₁₋₆, -C(O)-O-alilo, -C(O)-O-CH₂-fluorenilo opcionalmente sustituido, -CH(arilo)₃ opcionalmente sustituido, -(alquileo C₁₋₃)-arilo opcionalmente sustituido, -C(O)OCH₂-arilo y -alquilo C₁₋₄-O-alquilo C₁₋₄.

Un grupo protector para un grupo amino (por ejemplo, P² y o P³) puede, en cada caso, seleccionarse independientemente de entre -C(O)O-alquilo C₁₋₆, -C(O)OCH₂-arilo opcionalmente sustituido, -C(O)-O-alilo, -C(O)-O-CH₂-fluorenilo, -CH(arilo)₃ opcionalmente sustituido, -(alquileo C₁₋₃)-arilo opcionalmente sustituido, -C(O)-alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, -C(O)-arilo, -S(O)₂-alquilo C₁₋₆, -S(O)₂-arilo opcionalmente sustituido y -Si(alquilo C₁₋₆)₃ opcionalmente sustituido.

Muchos de los compuestos de partida protegidos de Fórmula III son conocidos en la técnica y/o pueden prepararse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos de partida de Fórmula III pueden sintetizarse a partir de gemcitabina mediante la protección de los grupos 3'-hidroxilo y 4-amino con grupos protectores adecuados. Los grupos protectores pueden añadirse y eliminarse típicamente mediante el uso de la metodología de grupos protectores convencionales, por ejemplo, como se describe en "Protective Groups in Organic Chemistry", editado por JWF McOmie (1973); "Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª edición, TW Greene (1991); y "Protecting Groups", 3ra edición P. J Koscienski (1995).

Típicamente será necesario preparar los compuestos protegidos con grupos 3'-hidroxilo y 4-amino mediante la protección primero del grupo 5'-hidroxilo de la gemcitabina con un grupo protector que sea ortogonal los que se usarán para proteger los grupos 3'-hidroxilo y 4-amino (es decir, un grupo que pueda eliminarse sin retirar también los grupos 3'-hidroxilo y 4-amino deseados). Simultáneamente o subsecuentemente, los grupos 3'-hidroxilo y 4-amino se protegen con el grupo o grupos protectores deseados y el grupo protector 5'-hidroxilo puede eliminarse para generar el compuesto de Fórmula III. Ciertos grupos protectores pueden introducirse simultáneamente en los grupos 3'-hidroxilo y 5'-hidroxilo y, opcionalmente, 4-amino y luego eliminarse selectivamente del grupo hidroxilo 5' sin eliminarlos de los grupos 3'-hidroxilo y 4-amino.

De acuerdo con algunas modalidades, P¹ se selecciona independientemente de entre -Si(alquilo C₁₋₆)₃ opcionalmente sustituido, -C(O)-alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, -C(O)-arilo opcionalmente sustituido, -C(O)-O-alquilo C₁₋₆, -C(O)-O-alilo, -C(O)-O-CH₂-fluorenilo, opcionalmente sustituido, -CH(arilo)₃ opcionalmente sustituido, -(alquileo C₁₋₃)-arilo opcionalmente sustituido, -C(O)OCH₂-arilo y -alquilo C₁₋₄-O-alquilo C₁₋₄.

P¹ puede seleccionarse independientemente entre -Si(alquilo C₁₋₆)₃ opcionalmente sustituido, -C(O)-O-alquilo C₁₋₆ y -C(O)OCH₂-arilo, -C(O)-O-alilo opcionalmente sustituido. Preferentemente, P¹ se selecciona entre -C(O)O-tBu, -C(O)O-bencilo y -C(O)OCH₂-alilo. Por lo tanto, P¹ puede ser -C(O)OCH₂-arilo. P¹ puede ser -C(O)O-tBu.

Alternativamente, P¹ puede seleccionarse independientemente de entre -C(O)-alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido y -C(O)-arilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, P¹ puede seleccionarse independientemente entre benzoilo y acetilo.

P² puede seleccionarse independientemente de entre -C(O)O-alquilo C₁₋₆, -C(O)OCH₂-arilo, -C(O)-O-alilo, -C(O)-O-CH₂-fluorenilo opcionalmente sustituido, -CH(arilo)₃ opcionalmente sustituido, -(alquileo C₁₋₃)-arilo opcionalmente sustituido, -C(O)-alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, -C(O)-arilo opcionalmente sustituido, -S(O)₂-alquilo C₁₋₆, -S(O)₂-arilo opcionalmente sustituido y -Si(alquilo C₁₋₆)₃ opcionalmente sustituido.

P² puede seleccionarse independientemente entre -C(O)O-alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido -C(O)OCH₂-arilo, -C(O)-O-alilo, opcionalmente sustituido -CH(arilo)₃ y -Si(alquilo C₁₋₆)₃ opcionalmente sustituido. Preferentemente, P² se selecciona de entre -C(O)O-tBu, -C(O)O-bencilo y -C(O)OCH₂-alilo. Por lo tanto, P² puede ser -C(O)OCH₂-arilo.

Alternativamente, P² puede seleccionarse independientemente de entre -C(O)-alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido y -C(O)-arilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, P² puede seleccionarse independientemente entre benzoilo y acetilo.

En otra alternativa, P² es H.

Igualmente, P^3 puede seleccionarse independientemente de entre H, $-C(O)O$ -alquilo C_1-C_6 , $-C(O)OCH_2$ -arilo opcionalmente sustituido, $-C(O)-O$ -alilo, $-C(O)-O-CH_2$ -fluorenilo, CH (arilo)₃ opcionalmente sustituido, $-(alquilenos C_1-C_3)$ -arilo opcionalmente sustituido, $-C(O)$ -alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, $-C(O)$ -arilo opcionalmente sustituido, $-S(O)_2$ -alquilo C_1-C_6 , $-S(O)_2$ -arilo opcionalmente sustituido y $-Si$ (alquilo C_{1-6})₃ opcionalmente sustituido.

Preferentemente, P^3 es H.

El grupo opcionalmente sustituido $-Si$ (alquilo C_{1-6})₃ puede ser un grupo $-Si$ (alquilo C_{1-4})₃. El grupo está (es decir, los grupos alquilo están) preferentemente sin sustituir. Los ejemplos ilustrativos incluyen trietilsililo y *t*-Butil-dimetilsililo.

El grupo opcionalmente sustituido $-C(O)$ -alquilo C_1-C_6 puede ser un grupo $-C(O)$ -alquilo C_1-C_6 . El grupo (es decir, el grupo alquilo) preferentemente no está sustituido. Los ejemplos ilustrativos incluyen acetilo y propionilo.

El grupo opcionalmente sustituido $-C(O)$ -arilo puede ser un grupo $-C(O)$ -fenilo. El grupo (es decir, el grupo fenilo) preferentemente no está sustituido. Los ejemplos ilustrativos incluyen benzoilo.

El grupo opcionalmente sustituido $-C(O)-O$ -alquilo C_1-C_6 puede ser un grupo $-C(O)-O$ -alquilo C_1-C_4 . El grupo (es decir, el grupo alquilo) preferentemente no está sustituido. Los ejemplos ilustrativos incluyen $-C(O)-O$ -metilo y $-C(O)-O$ -etilo. Un ejemplo particularmente preferido es $C(O)OtBu$.

El grupo opcionalmente sustituido $-(alquilenos C_1-C_3)$ -arilo es preferentemente un grupo bencilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos ilustrativos incluyen bencilo, fenetilo, 4-metoxibencilo, 4-nitrobencilo, 4-bromobencilo, 2,3-dimetoxibencilo y 2,4-dimetoxibencilo.

El grupo opcionalmente sustituido $-C(O)OCH_2$ -arilo es preferentemente un grupo $-C(O)Obencilo$ opcionalmente sustituido. Los ejemplos ilustrativos incluyen $-C(O)Obencilo$ y $-C(O)O$ -(4-metoxibencilo).

El grupo $-alquilo C_1-C_4-O$ -alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido puede ser un grupo $-alquilo C_1-C_2-O$ -alquilo C_1-C_2 . El grupo está (es decir, los grupos alquilo están) preferentemente sin sustituir. Los ejemplos ilustrativos incluyen metoxi-metilo (MOM) y 2-metoxi-etoxi-metilo (MEM).

El grupo $-S(O)_2$ -alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido puede ser un grupo $-S(O)_2$ -alquilo C_1-C_4 . El grupo (es decir, el grupo alquilo) preferentemente no está sustituido. Los ejemplos ilustrativos incluyen metanosulfonato.

El grupo $-S(O)_2$ -arilo opcionalmente sustituido puede ser un grupo $-S(O)_2$ -fenilo. Los ejemplos ilustrativos incluyen fenilsulfonato, 4-metilfenilsulfonato y 4-nitrofenilsulfonato.

El grupo $-CH$ (arilo) opcionalmente sustituido₃ puede ser un grupo $-CH$ (fenilo)₃. Los ejemplos ilustrativos incluyen tritilo.

En donde dos o más de P^1, P^2 y P^3 son grupos protectores, la etapa de desprotección puede comprender dos o tres reacciones de desprotección individuales. Este es el caso cuando se usan dos o tres grupos protectores diferentes y donde esos dos o tres grupos protectores no pueden eliminarse en las mismas condiciones.

Sin embargo, puede ser que la etapa de desprotección comprenda una única reacción de desprotección en la que se eliminan todos los grupos protectores. Por tanto, puede ser que P^1 y P^2 son grupos protectores que pueden eliminarse bajo las mismas condiciones. Puede ser que P^1 y P^2 son lo mismo.

Puede ser que tanto P^1 y P^2 son un grupo seleccionado de entre $-C(O)O$ -alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, $-C(O)-O$ -alilo y $-C(O)OCH_2$ -arilo opcionalmente sustituido. Por tanto, tanto P^1 y P^2 puede ser un grupo seleccionado de $C(O)OtBu$, $-C(O)-O$ -alilo y $C(O)O$ -bencilo. En algunas modalidades, P^1 y P^2 son ambos grupos $C(O)OtBu$.

Preferentemente P^3 es hidrógeno. Por tanto, en una modalidad particular, P^1 y P^2 son los mismos grupos y P^3 es hidrógeno. Por tanto, en una modalidad particular, P^1 y P^2 son ambos grupos $C(O)OtBu$ y P^3 es hidrógeno.

Puede ser que P^2 y P^3 son cada uno H y P^1 es un grupo protector. Puede ser que P^2 y P^3 son cada uno H y P^1 es un grupo protector seleccionado entre $-C(O)O$ -*t*Bu, $-C(O)O$ -bencilo y $-C(O)OCH_2$ -alilo. Puede ser que P^2 y P^3 son cada uno H y P^1 es $-C(O)O$ -*t*Bu.

A lo largo de esta especificación, "forma diastereoisomérica enriquecida" y "forma sustancialmente diastereoisomérica pura" significa una pureza diastereoisomérica superior al 95 %. "Forma diastereoisomérica enriquecida" y "forma sustancialmente diastereoisomérica pura" pueden significar una pureza diastereoisomérica superior al 98 %, superior al 99 % o superior al 99,5 %.

Cualquiera de los grupos alquilo y arilo antes mencionados (por ejemplo, fenilo, que incluyen los grupos fenilo en grupos bencilo), está opcionalmente sustituido, cuando sea químicamente posible, con 1 a 3 sustituyentes que se

seleccionan cada uno independientemente en cada caso del grupo que consiste en: oxo, =NR^a, =NOR^a, halo, nitro, ciano, NR^aR^a, NR^aS(O)₂R^a, NR^aCONR^aR^a, NR^aCO₂R^a, O^a; SR^a, SOR^a, SO₃R^a, SO₂R^a, SO₂NR^aR^a, CO₂R^a C(O)R^a, CONR^aR^a, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄, alquenilo C₂-C₄ y haloalquilo C₁-C₄; en donde R^a se selecciona independientemente en cada aparición de H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄.

- 5 Puede ser que cualquiera de los grupos alquilo mencionados anteriormente no esté sustituido.
- 10 Puede ser que cualquiera de los grupos arilo antes mencionados (por ejemplo, el fenilo, que incluye los grupos fenilo de los grupos bencílico) esté opcionalmente sustituido, cuando sea químicamente posible, por 1 a 3 sustituyentes que se seleccionan independientemente en cada ocurrencia del grupo que consiste en: halo, nitro, ciano, NR^aR^a, NR^aS(O)₂R^a, NR^aCONR^aR^a, NR^aCO₂R^a, O^a; SR^a, SOR^a, SO₃R^a, SO₂R^a, SO₂NR^aR^a, CO₂R^a C(O)R^a, CONR^aR^a, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄, alquenilo C₂-C₄ y haloalquilo C₁-C₄; en donde R^a se selecciona independientemente en cada aparición de H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄.
- 15 Puede ser que cualquiera de los grupos arilo antes mencionados (por ejemplo, fenilo, que incluyen los grupos fenilo en grupos bencilo) esté opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes que se seleccionan cada uno independientemente en cada caso del grupo que consiste en: halo, nitro, OR^a; alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄; en donde R^a se selecciona independientemente en cada aparición de H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄.
- 20 Los grupos arilos tienen de 6 a 20 átomos de carbono según sea apropiado para satisfacer los requisitos de valencia. Los grupos arilo son grupos carbocíclicos que satisfacen la regla de Huckel (es decir, contienen un sistema de anillo carbocíclico que contiene 2(2n+1) electrones π). Los grupos arilos pueden ser grupos fenilo opcionalmente sustituidos, grupos bifenilo opcionalmente sustituidos, grupos naftalenilo opcionalmente sustituidos o grupos antracenilo opcionalmente sustituidos. Igualmente, los grupos arilos pueden incluir porciones carbocíclicas no aromáticas. Preferentemente, un grupo arilo es un grupo fenilo opcionalmente sustituido.
- 25 Los grupos alquilos pueden ser de cadena lineal o ramificada. Así, por ejemplo, una C₄ grupo alquilo podría ser *n*-butilo, *i*-butilo o *t*-butilo.
- 30 La etapa d) puede llevarse a cabo en un solvente orgánico (S1). Los solventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, éteres (por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, éter dietílico); cetonas (por ejemplo, acetona y metil isobutil cetona); solventes halogenados (por ejemplo, diclorometano, cloroformo y 1,2-dicloroetano); y amidas (por ejemplo, DMF, NMP); o mezclas de los mismos. Cuando la etapa d) se lleva a cabo en presencia de un reactivo de Grignard, el solvente orgánico es preferentemente un éter. Con la máxima preferencia, el solvente es tetrahidrofurano.
- 35 Cuando la etapa d) se lleva a cabo en presencia de una base de nitrógeno, el solvente orgánico con la mayor preferencia es un solvente halogenado o una amida.
- 40 La reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura adecuada, por ejemplo, de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 40 °C. preferentemente, la temperatura de reacción es de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C. Puede dejarse agitar la reacción durante un período de tiempo de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 16 h y preferentemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente -60 minutos.
- 45 La capa orgánica resultante que contiene fosforamidato protegido de Fórmula II puede procesarse directamente en el mismo recipiente de reacción para formar gemcitabina- [fenil (benzoxi-L-Alaninil)] fosfato de Fórmula I. Alternativamente, el solvente de la capa orgánica puede concentrarse para obtener un residuo de producto crudo mediante cualquier método conocido en la técnica, al final de la reacción, por ejemplo, destilación, evaporación, secado rotacional (tales como con el evaporador rotatorio Buchi), secado por congelación, secado en lecho fluidizado, secado instantáneo, secado instantáneo por centrifugación. Preferentemente, el solvente se elimina mediante la destilación al vacío.
- 50 Los procesos de la invención también pueden implicar la desprotección de los grupos protectores de hidroxilo y amino.
- 55 Puede ser que la etapa de desprotección (etapa e)) se realice sin purificar el producto de la etapa d).
- 60 Cuando un grupo protector es sensible a los ácidos, por ejemplo, tritilo, C(O)OtBu, MOM, MEM, 2,4-dimetoxibencilo, 2,3-dimetoxibencilo, la etapa de desprotección puede llevarse a cabo mediante el uso de un ácido adecuado. El ácido puede ser un ácido de Bronsted (por ejemplo, TFA, ácido fosfórico, HCl o ácido fórmico) o un ácido de Lewis (por ejemplo, ZnBr₂, CeCl₃). Ácidos de Lewis (por ejemplo, ZnBr₂) son menos preferidos. Igualmente, el HCl es menos preferido. Preferentemente, el ácido es TFA.
- 65 Cuando un grupo protector es sensible a una base, por ejemplo, acetilo, benzoilo, la etapa de desprotección puede llevarse a cabo mediante el uso de una base adecuada, por ejemplo, NH₃ acuoso o NaOH acuoso. Los grupos sensibles a las bases pueden ser menos preferidos.

Cuando un grupo protector es un grupo sililo (por ejemplo, trietilsililo o t-butildimetilsililo, la etapa de desprotección puede llevarse a cabo mediante el uso de un ácido adecuado (por ejemplo, TFA) o mediante el uso de una fuente de flúor adecuada (por ejemplo, fluoruro de tetrabutilamonio, ácido fluorosilícico, HF).

5 Cuando un grupo protector es un grupo bencilo o un grupo C(O)Obencilo, la etapa de desprotección puede llevarse a cabo mediante el uso de H₂ y un catalizador adecuado (por ejemplo, Pd/C). Estos grupos protectores pueden ser menos preferidos.

10 Cuando un grupo protector es un 4-metoxibencilo, 2,3-dimetoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo o C(O)O-(4-metoxibencilo), la etapa de desprotección puede ejecutarse mediante el uso de un agente oxidante adecuado (por ejemplo, ácido meta-cloroperbenzoico).

15 Cuando un grupo protector es -C(O)-O-alilo, la etapa de desprotección puede ejecutarse mediante el uso de (PPh₃)₄Pd.

Donde un grupo protector es -C(O)-O-CH₂-fluorenilo, la etapa de desprotección puede ejecutarse mediante el uso de la piperidina.

20 Donde P¹ es C(O)OtBu, la desprotección puede lograrse mediante el uso de un alcohol C₁-C₄ y/o agua. Donde P¹ es C(O)OtBu, la desprotección puede lograrse mediante el uso de una mezcla de un alcohol C₁-C₄ y agua. La desprotección puede lograrse mediante el uso de una mezcla de alcohol isopropílico (IPA) y agua.

25 La etapa de desprotección puede llevarse a cabo en un solvente orgánico o una mezcla de los mismos. Los solventes orgánicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, solventes halogenados (por ejemplo, diclorometano, cloroformo, dicloroetano); alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol) y éteres (por ejemplo, tetrahidrofurano, éter dietílico).

30 Cuando la etapa de desprotección se realiza en presencia de un ácido (por ejemplo, TFA, el solvente orgánico es preferentemente un solvente halogenado, por ejemplo, diclorometano.

35 La reacción de desprotección puede realizarse a una temperatura en el intervalo de, por ejemplo, -10 °C a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, a aproximadamente 10 °C. Una temperatura conveniente para realizar la reacción es de -5 °C a 5 °C. La reacción puede agitarse durante un período de tiempo de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 16 h y preferentemente de aproximadamente 1 h a aproximadamente 4 h, y con mayor preferencia de aproximadamente 2 h a aproximadamente 3 h.

40 Donde la etapa e) se logra mediante el uso de un alcohol C₁-C₄ y/o agua (por ejemplo, una mezcla de alcohol isopropílico (IPA) y agua), la mezcla de reacción puede calentarse, por ejemplo, a una temperatura de 30 °C a 90 °C o a una temperatura de 60 °C a 85 °C.

45 Cuando la desprotección se ejecuta en presencia de un ácido (por ejemplo, TFA), el aislamiento del producto obtenido después de la desprotección se hace típicamente mediante la neutralización del exceso de ácido usado en la etapa de desprotección, y se extrae el producto con un solvente orgánico inmiscible en agua y se recupera el producto por evaporación del solvente orgánico.

50 Los ejemplos de solventes orgánicos inmiscibles en agua útiles en la extracción incluyen ésteres tales como acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de isopropilo y similares; solventes clorados tales como diclorometano, cloroformo y similares; solventes de hidrocarburos aromáticos tales como tolueno, xileno y similares; preferentemente acetato de etilo.

Puede ser que P¹ y P² son ambos grupos C(O)OtBu y P³ es hidrógeno, la etapa d) se realiza en presencia de tBuMgCl (por ejemplo, en THF), y la etapa e) se realiza mediante el uso de TFA (por ejemplo, en DCM).

55 Puede ser que P¹ es un grupo C(O)OtBu, P² y P³ área de cada hidrógeno, la etapa d) se realiza en presencia de tBuMgCl (por ejemplo, en THF). Puede ser que la etapa e) se realiza sin aislar el producto de la etapa d), por ejemplo, mediante la adición de una mezcla de IPA y agua a la mezcla de reacción de la etapa d) una vez finalizada la reacción de la etapa d).

60 En determinadas modalidades, puede ser conveniente purificar la gemcitabina-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfato que se obtiene del proceso del primer aspecto de la invención. Igualmente, puede ser conveniente purificar el compuesto de Fórmula II obtenido del proceso del segundo aspecto de la invención. Los métodos de purificación se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna), recristalización y destilación. En otras modalidades, no es necesaria ninguna purificación.

65 Las siguientes abreviaturas se usan en a lo largo de esta descripción:

DCM - diclorometano
DMF - *N,N*-dimetilformamida
IPA - alcohol isopropílico
NMP - *N*-metilpirrolidina
TEA - trietilamina
THF - tetrahidrofurano

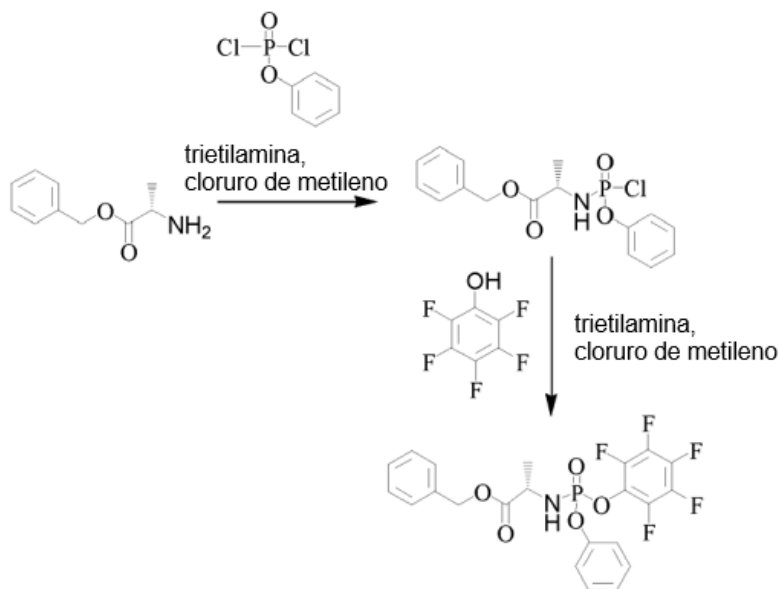
DIPE - éter diisopropílico
DMSO -dimetilsulfóxido
MTBE - metil-*t*-butiléter
TBDMS - *tert*-butildimetilsililo
TFA - ácido trifluoroacético

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos 3, 8 y 10, que se proporcionan únicamente a modo de ilustración y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo de referencia 1:

Preparación de una mezcla diastereoisomérica de éster bencílico del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propiónico (Fórmula IIa)



Fórmula IIa (mezcla de Sp y Rp)

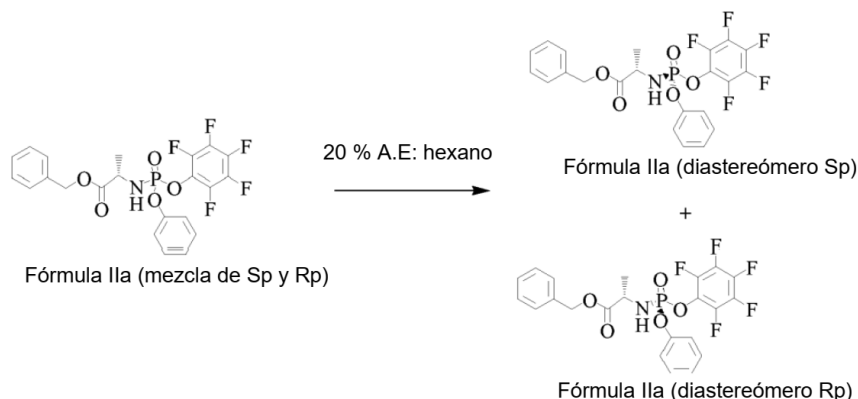
A una mezcla agitada de hidrocloreto de éster bencílico de L-alanina (100 g) en cloruro de metileno (1 l) se le añadió diclorofosfato de fenilo (77 ml) a 25-35 °C y la mezcla resultante se enfrió de -70 °C a -78 °C, se añadió trietilamina (130,5 ml) y se agitó durante 1 h a la misma temperatura. La temperatura de la masa de reacción se elevó a 25-35 °C y se dejó agitar durante 2 h. Una vez terminada la reacción, se concentró la masa de reacción al vacío por debajo de 35 °C para obtener un residuo. Al residuo obtenido se le añadió éter diisopropílico (2 l) a 25-35 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Se filtró la masa de reacción y se lavó con éter diisopropílico (500 ml) y se concentró el filtrado al vacío a menos de 35 °C para obtener fenil-(benzoxi-L-alaninil)-fosforocloridato. El compuesto obtenido se disolvió en cloruro de metileno (1 l) a 25-35 °C y se enfrió de -5 °C a -10 °C. A la masa de reacción se le añadió pentafluorofenol (85,5 g), trietilamina (65,2 ml) a la misma temperatura y se agitó durante 2 h. Una vez terminada la reacción, se concentró la masa de reacción al vacío por debajo de 35 °C y se añadió acetato de etilo (1 l) a 25-35 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Se filtraron los sólidos y se lavaron con acetato de etilo (1 l). Al filtrado se le dio agua (1 l), carbonato de sodio al 10 % (2x1 l), lavados con salmuera (1 l) y se secó la capa orgánica con sulfato de sodio anhidro, se concentró al vacío a 35-45 °C para obtener una mezcla diastereoisomérica de compuesto del título como un semisólido de color blanco.

Rendimiento: 210 g

Pureza quiral por HPLC (% de área): 33,74:66,26 % (Rp: Sp)

Ejemplo de referencia 2:

Separación de diaestereoisómero S_p del éster bencílico del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propiónico (Fórmula IIa)



A la mezcla diastereoisomérica obtenida anteriormente de Fórmula IIa (R_p : S_p -33,74:66,26 %) se añadió acetato de etilo al 20 % en hexano (1,2 l) a 25-35 °C y se agitó durante 1 h. Se filtraron los sólidos y se lavaron con acetato de etilo al 20 % en hexano (300 ml) para obtener una mezcla del compuesto de Fórmula IIa.

Rendimiento: 112 g

Pureza quiral por HPLC (% de área): 22,13:77,87 % (R_p : S_p)

El filtrado se concentró al vacío para obtener una mezcla diastereoisomérica de Fórmula IIa (75 g; R_p : S_p -65,43:34,57 %).

A la mezcla diastereoisomérica obtenida anteriormente de Fórmula IIa (R_p : S_p -22,13:77,87 %) se añadió acetato de etilo al 20 % en hexano (1,2 l) a 25-35 °C y se agitó durante 1 h. Se filtraron los sólidos y se lavaron con acetato de etilo al 20 % en hexano (300 ml) para obtener un diaestereoisómero S_p puro del compuesto de Fórmula IIa.

Rendimiento: 80 g

Pureza quiral por HPLC (% de área): 0,20:99,80 % (R_p : S_p)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 7,18-7,41(m, 10H), 6,91-6,99(d, 1H), 5,10(s, 2H), 4,01-4,11(m, 1H), 1,30-1,32(d, 3H)

ESI-MS (m/z): 524 (M+1)

El filtrado se concentró al vacío para obtener una mezcla diastereoisomérica de Fórmula IIa (28 g; R_p : S_p -80,77:19,23 %).

Ejemplo 3:

Isomerización de éster bencílico del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propiónico (Fórmula IIa)

A una solución con agitación del éster bencílico del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propiónico obtenido anteriormente de Fórmula IIa (75 g; R_p : S_p -65,43:34,57 %) en acetato de etilo al 20 % en hexano (1,1 l), se añadió trietilamina (7,5 ml) a 25-35 °C y se agitó durante 6 h a la misma temperatura. Una vez terminada la reacción, la masa de reacción se inactivó en agua (750 ml) y se extrajo con acetato de etilo (750 ml). La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío para producir el compuesto del título como un sólido.

Rendimiento: 45 g

Pureza quiral por HPLC (% de área): 91,29: 8,71 % (S_p : R_p)

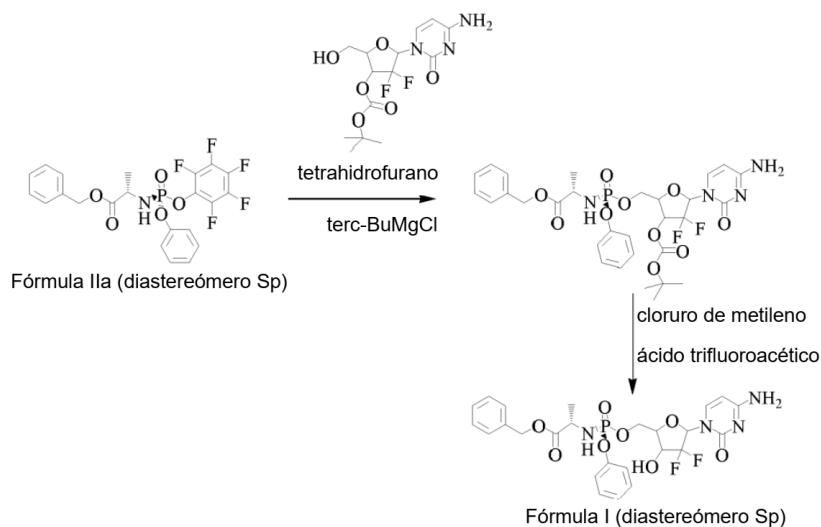
A la mezcla diastereoisomérica obtenida anteriormente de R_p y S_p del éster bencílico del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxifosforilo] de Fórmula IIa (45 g; R_p : S_p - 8,71:91,29 %) se diluyó en acetato de etilo al 20 % en hexano (1,1 l) a 25-30 °C y se agitó durante 1 h a la misma temperatura. Se filtró el sólido y se lavó con acetato de etilo al 20 % en hexano (225 ml) para obtener el diaestereoisómero S_p del compuesto del título como sólido.

Rendimiento: 19 g

Pureza quiral por HPLC (% de área): 99,92: 0,08 % (S_p : R_p)

Ejemplo de referencia 4:

Preparación de diaestereoisómero S_p de la NUC-1031 (mediante el uso de diaestereoisómero S_p de Fórmula IIa)



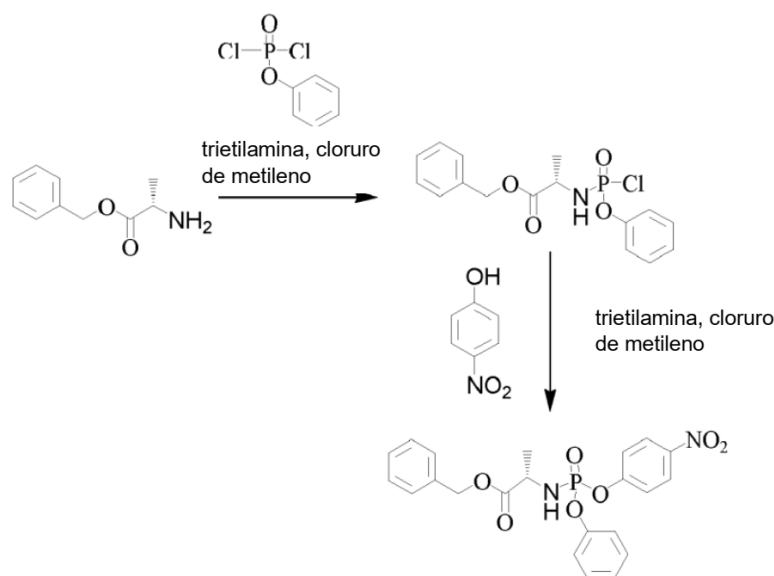
25 A una mezcla agitada de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonil) gemcitabina (5 g) en tetrahidrofurano (75 ml), se añadió *terc*-cloruro de butil magnesio (15,2 ml de 2,0 M en tetrahidrofurano) y diastereoisómero S_p del éster bencílico del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi) -fenoxi-fosforil amino] propiónico de Fórmula IIa (8,3 g diluidos en 50 ml de tetrahidrofurano)) de 0 °C a -5 °C y la temperatura se elevó a 25-30 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Una vez terminada la reacción, la masa de reacción se inactivó en ácido clorhídrico 0,5 N (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x75 ml). A la capa orgánica se le dio carbonato de sodio al 10 % (2x50 ml), lavados secuenciales de solución de salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener un residuo.

35 El residuo obtenido se recogió en cloruro de metileno (50 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (18,5 ml) de 0 °C a 5 °C. Se mantuvo la masa de reacción a 25-35 °C durante 2 h y se inactivó en una solución de carbonato de sodio al 20 % (125 ml). Se extrajo con acetato de etilo (165 ml), se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó al vacío a 40-45 °C. El residuo obtenido se suspendió en una mezcla de acetato de etilo al 50 % en heptano (150 ml) para obtener el compuesto del título.

Rendimiento: 4,8 g
Pureza quiral por HPLC (% de área): 99,4 % (diastereoisómero Sp)

40 Ejemplo de referencia 5:

Preparación de una mezcla diastereoisomérica de éster bencílico del ácido 2-[(4-nitrofenoxi) -fenoxi-fosforilamino] propiónico de Fórmula IIb



Fórmula IIb (mezcla de Sp y Rp)

A una mezcla agitada de hidrocloreto de éster bencílico de L-alanina (50 g) en cloruro de metileno (500 ml) se le añadió diclorofosfato de fenilo (54 g) a 25-35 °C y la mezcla resultante se enfrió de -70 °C a -78 °C, se añadió trietilamina (65,2 ml) y se agitó durante 1 h a la misma temperatura. La temperatura de la masa de reacción se elevó a 25-35 °C y se dejó agitar durante 2 h. Una vez terminada la reacción, se concentró la masa de reacción al vacío por debajo de 35 °C para obtener un residuo. Al residuo obtenido se le añadió éter diisopropílico (1 l) a 25-35 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Se filtró la masa de reacción y se lavó con éter diisopropílico (250 ml) seguido de concentración del filtrado al vacío por debajo de 35 °C para obtener fenil- (benzoxi-L-alaninil)-fosforocloridato. El compuesto obtenido se disolvió en cloruro de metileno (500 ml) a 25-35 °C y se enfrió de -5 °C a -10 °C. A la masa de reacción se le añadió paranitrofenol (27,5 g), trietilamina (65,2 ml) a la misma temperatura y se agitó durante 2 h. Una vez terminada la reacción, se concentró la masa de reacción al vacío por debajo de 35 °C y se añadió acetato de etilo (500 ml) a 25-35 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Se filtraron los sólidos y se lavaron con acetato de etilo (500 ml). Al filtrado se le dio agua (500 ml), carbonato de sodio al 10 % (2x500 ml), salmuera (500 ml) lavados y se secó la capa orgánica con sulfato de sodio anhidro, se concentró al vacío a 35-40 °C para obtener una mezcla diastereoisomérica de compuesto del título como un líquido aceitoso espeso.

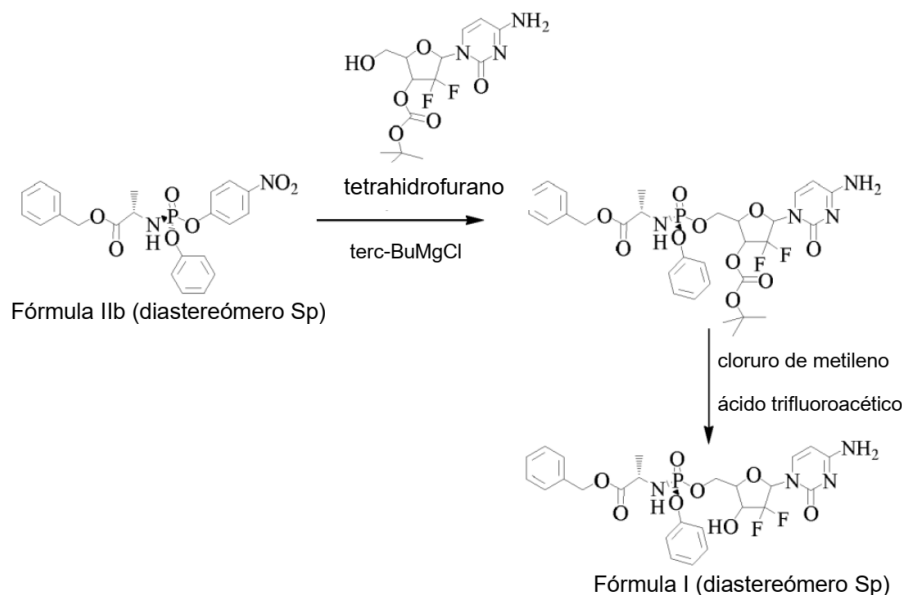
Rendimiento: 90 g
Pureza quiral por HPLC (% de área): 45,6: 54,94 % (Rp:Sp)

La mezcla diastereoisomérica obtenida anteriormente del éster bencílico del ácido 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] de Fórmula IIb (40 g; Rp: Sp- 45,6: 54,94 %) se separó en diastereoisómeros puros Sp y Rp mediante HPLC preparativa y se concentraron las fracciones puras al vacío para obtener los diastereoisómeros Sp y Rp por separado.

Rendimiento: Diastereoisómero Sp: 8 g,
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):- 8,15-8,19(d, 2H), 7,15-8,37(m, 12H), 5,12(s, 2H), 4,02-4,24(m, 2H), 1,39-1,42(d, 3H)
 ESI-MS (m/z):- 479 (M+Na)
 Diastereoisómero Rp: 6 g,
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):- 8,08-8,13(d, 2H), 7,15-7,34(m, 12H), 5,10(s, 2H), 4,48-4,56(m, 1H), 4,11-4,20(m, 1H), 1,39-1,41 (d, 3H)
 ESI-MS (m/z):-457 (M+1)⁺
 Mezcla de diastereoisómeros Sp y Rp: 20 g

Ejemplo de referencia 6:

Preparación de diaestereoisómero Sp de la NUC-1031 (mediante el uso de diaestereoisómero Sp de Fórmula IIb)



25 A una mezcla agitada de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonilo) gemcitabina (2 g) en tetrahidrofurano (30 ml), se añadió N-metilpiridina (2 ml), *tert*-butil cloruro de magnesio (5,5 ml de 2,0 M en tetrahidrofurano) y diastereoisómero S_p del ácido 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico éster bencílico de Fórmula IIb (4 g diluidos en 20 ml de tetrahidrofurano) de 0 °C a -5 °C y se elevó la temperatura a 25-30 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Una vez terminada la reacción, la masa de reacción se inactivó en ácido clorhídrico 0,5 N (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x30 ml). A la capa orgánica se le dio carbonato de sodio al 10 % (2x20 ml), lavados

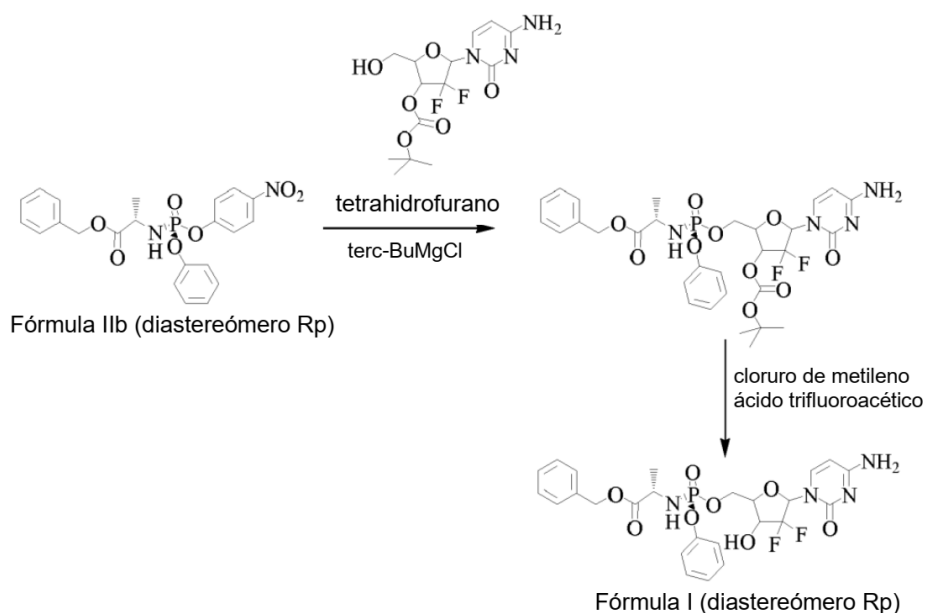
30 secuenciales de solución de salmuera (20 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener un residuo.

35 El residuo obtenido se recogió en cloruro de metileno (20 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (7,4 ml) de 0 °C a 5 °C. Se mantuvo la masa de reacción a 25-35 °C durante 2 h y se inactivó en una solución de carbonato de sodio al 20 % (30 ml). Se extrajo con acetato de etilo (66 ml), se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó al vacío a 40-45 °C. El residuo obtenido (3 g; S_p - 85,98 %) se purificó mediante el método de cromatografía en columna mediante la elución una mezcla de isopropanol en cloruro de metileno de 2 a 10 %. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se concentraron al vacío para obtener un compuesto del título como un sólido.

40 Rendimiento: 1,1 g
Pureza quiral por HPLC (% de área): 97,88: 0,48 % (S_p : R_p)

Ejemplo comparativo 7:

45 Preparación del diastereoisómero R_p de gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfato de Fórmula I (mediante el uso del diastereoisómero R_p de Fórmula IIb)



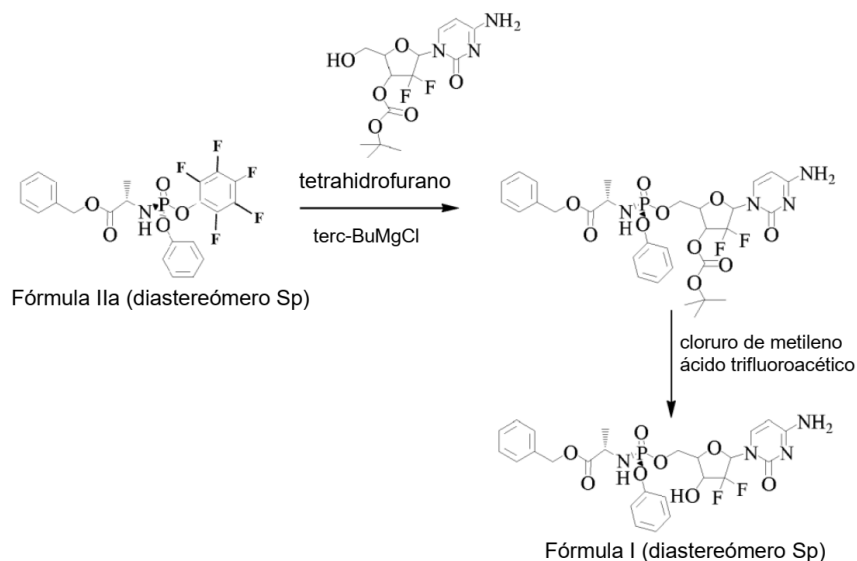
25 A una mezcla agitada de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonilo) gemcitabina (2 g) en tetrahidrofurano (30 ml), se añadió N-metilpiridina (2 ml), *tert*-butil cloruro de magnesio (5,5 ml de 2,0 M en tetrahidrofurano) y diastereoisómero R_p del ácido 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico éster bencílico de Fórmula IIb (4 g diluidos en 20 ml de tetrahidrofurano) de 0 °C a -5 °C y se elevó la temperatura a 25-30 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Una vez terminada la reacción, la masa de reacción se inactivó en ácido clorhídrico 0,5 N (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x30 ml). A la capa orgánica se le dio carbonato de sodio al 10 % (2x20 ml), lavados

35 El residuo obtenido se recogió en cloruro de metileno (20 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (7,4 ml) de 0 °C a 5 °C. Se mantuvo la masa de reacción a 25-35 °C durante 2 h y se inactivó en una solución de carbonato de sodio al 20 % (30 ml). Se extrajo con acetato de etilo (66 ml), se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó al vacío a 40-45 °C. El residuo obtenido (2,9 g; R_p-84,05 %) se purificó mediante el método de cromatografía en columna mediante la elución con una mezcla de isopropanol en cloruro de metileno de 2 a 10 %. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se concentraron al vacío para obtener un compuesto del título como un sólido.

40 Rendimiento: 1,4 g
Pureza quiral por HPLC (% de área): 97,99: 0,86 % (R_p: S_p)

45 Ejemplo 8:

Preparación del diastereoisómero S_p de gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alanil)] fosfato de Fórmula I (mediante el uso del diastereoisómero S_p isomerizado de Fórmula IIa del ejemplo-3)



25

30

A una mezcla agitada de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonilo) gemcitabina (5 g) en tetrahidrofurano (75 ml), se añadió *tert*-butil cloruro de magnesio (15,2 ml de 2,0 M en tetrahidrofurano) y diastereoisómero S_p del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxy-fosforil amino] propiónico de Fórmula IIa (8,3 g del ejemplo-3 (99,92 %); que se diluye en 50 ml de tetrahidrofurano) de 0 °C a -5 °C y se elevó la temperatura de 25-30 °C y se agitó durante 30 min a la misma temperatura. Una vez terminada la reacción, la masa de reacción se inactivó en ácido clorhídrico 0,5 N (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x75 ml). A la capa orgánica se le dio carbonato de sodio al 10 % (2x50 ml), lavados secuenciales de solución de salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener un residuo.

35

El residuo obtenido se recogió en cloruro de metileno (50 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (18,5 ml) de 0 °C a 5 °C. Se mantuvo la masa de reacción a 25-35 °C durante 2 h y se inactivó en una solución de carbonato de sodio al 20 % (125 ml). Se extrajo con acetato de etilo (165 ml), se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó al vacío a 40-45 °C. El residuo obtenido se suspendió en una mezcla de acetato de etilo al 50 % en heptano (150 ml) para obtener el compuesto del título.

40

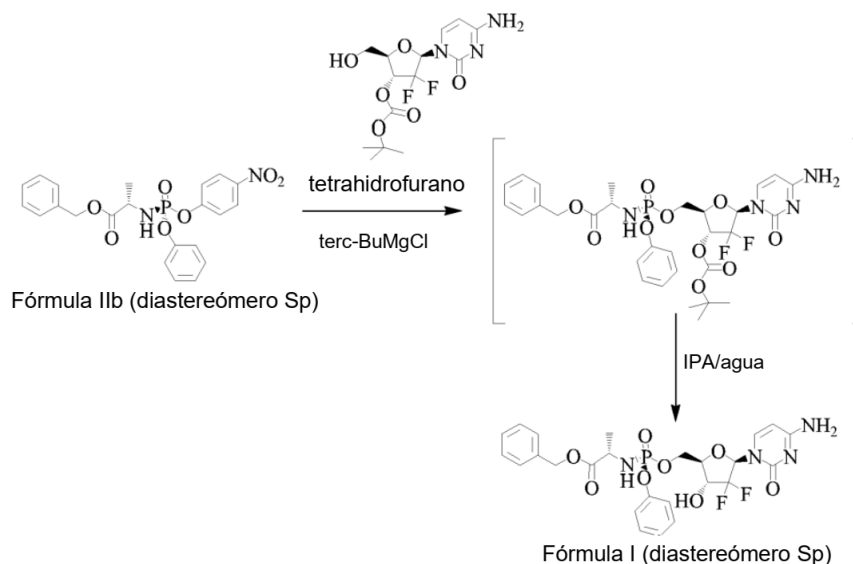
Rendimiento: 4,9 g

Pureza quiral por HPLC (% de área): 99,72 % (diastereoisómero S_p)

Ejemplo de referencia 9:

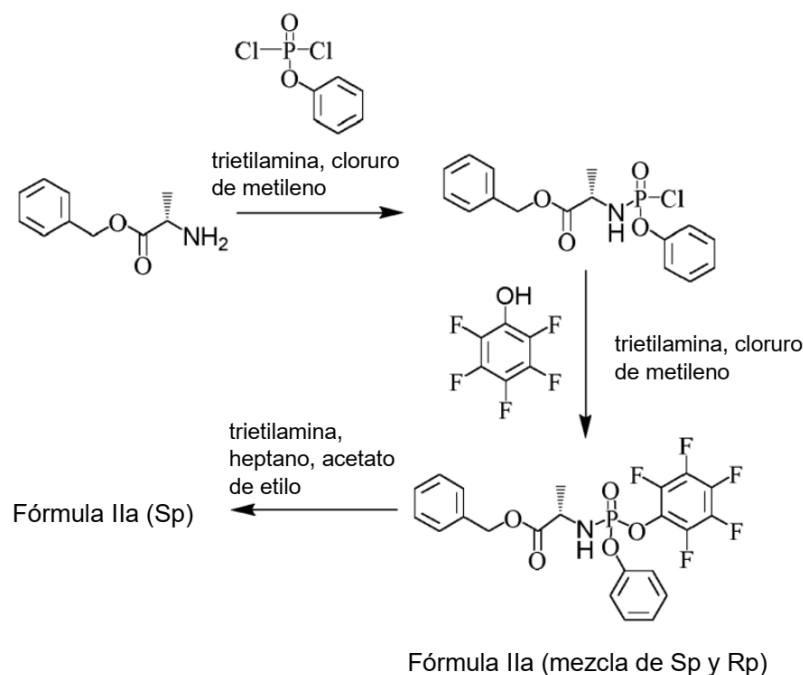
45

Preparación de diaestereoisómero S_p de la NUC-1031 (mediante el uso de diaestereoisómero S_p de Fórmula IIb) mediante el uso de IPA/agua para la desprotección



A una mezcla agitada de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonilo) gemcitabina (100 g) en tetrahidrofurano (1 l), *tert*-butil cloruro de magnesio (292 ml de 2,0 M en tetrahidrofurano) y diastereoisómero S_p del ácido 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico éster bencílico de Fórmula IIb (166 g diluidos en 700 ml de tetrahidrofurano) de -5 °C a 0 °C y se elevó la temperatura de 25-30 °C y se agitó durante 3 h a la misma temperatura. Una vez terminada la reacción, la masa de reacción se inactivó en ácido clorhídrico 0,5 N (1 l) y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó secuencialmente con carbonato sódico al 10 %, lavados secuenciales con agua y solución de salmuera. La capa orgánica se separó y se concentró al vacío para obtener un residuo. Se agregaron alcohol isopropílico (IPA; 850 ml) y agua (2,5 l) al residuo y la mezcla se calentó a 75 °C durante 3 h antes de agregar más agua (2,5 l) y la mezcla se enfrió a 25 °C y se filtró. El sólido resultante se lavó con acetato de etilo y se secó. Se obtuvieron 124 g de producto (78 %). Pureza quiral por HPLC (% de área): 99,95 % (diastereoisómero S_p)

Ejemplo 10-Preparación de éster bencílico del ácido (S_p) -2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi) -fenoxi-fosforil amino] propiónico (Fórmula IIa)



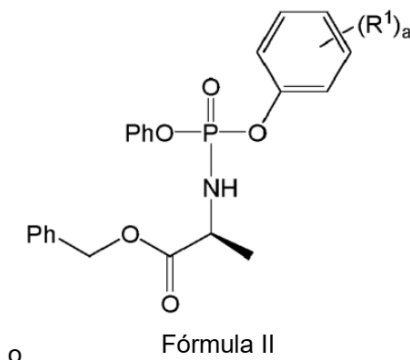
A una mezcla agitada de éster bencílico de L-alanina. Se añadió HCl (100 g) en 1000 ml de dicloruro de metileno diclorofosfato de fenilo (97,8 g) en la masa de reacción a 30 °C. La mezcla se enfrió a -20 °C y se añadió lentamente trietilamina (93,8 g), se mantuvo la temperatura a -20 °C. La reacción se agitó durante 1 h a -20 °C, luego se calentó a 10 °C (10±5) y se agitó durante 1,5 h más.

Se añadió lentamente una solución de pentafluorofenol (85,3 g) en 100 ml de dicloruro de metileno a 10 °C, después se añadió trimetilamina (46,8 g) lentamente, se mantuvo la temperatura a 10 °C. Se añade lentamente 46,9 g de trietilamina a la masa de reacción a 10 °C (10±5) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 2 h a 10 °C antes de inactivarse mediante la adición lenta de una solución de HCl 0,5 N, se mantuvo la temperatura a 10 °C. Después de calentar a temperatura ambiente, la mezcla se separó y los orgánicos se lavaron con una solución saturada de bicarbonato, agua destilada y salmuera antes de concentrarse *al vacío*.

La mezcla bruta se suspendió en 1500 ml de acetato de etilo al 20 % en n-heptano a 25 °C. Se añadió trietilamina (12,2 g) y la mezcla se agitó a 25 °C. La mezcla se filtró y el sólido se disolvió en 2500 ml de acetato de etilo que se lavó con agua y salmuera y se concentró al vacío. El sólido se suspendió en 1200 ml de acetato de etilo al 20 % en n-heptano, se agitó durante 45 a 60 min y se filtró. El material se secó al vacío para proporcionar el producto deseado. Los rendimientos están en el intervalo del 40 al 80 % y la pureza diastereoisomérica es superior al 99 %.

REIVINDICACIONES

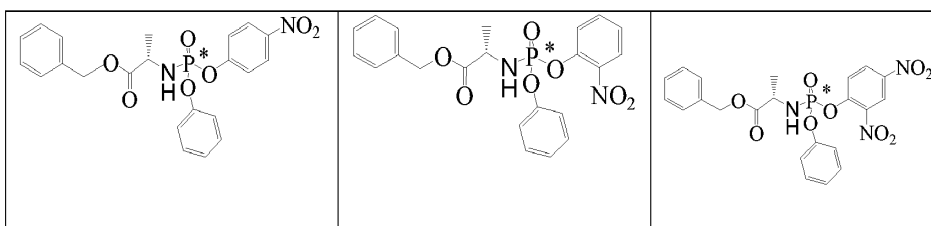
1. Un proceso para el enriquecimiento diastereoisomérico de un compuesto de Fórmula II;



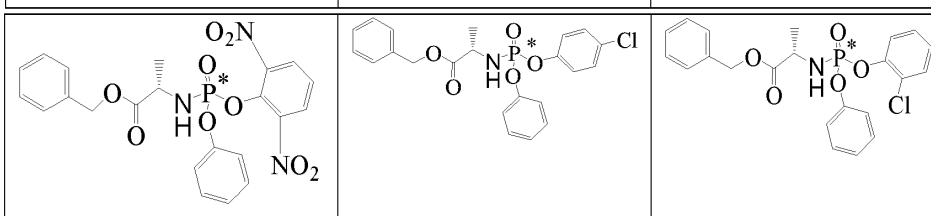
en donde R¹ representa un grupo sustractor de electrones y a es un número entero de 1 a 5, el proceso comprende:

- a) suspender o disolver el diastereoisómero R del compuesto de Fórmula II; o una mezcla de los diastereoisómeros (R) y (S) del compuesto de Fórmula II en un solvente (S2);
 - b) tratar la solución o suspensión con una base de amina orgánica o una base inorgánica (B2) para obtener el diastereoisómero (S) en forma sustancialmente diastereoméricamente pura; y
 - c) aislar el diastereoisómero (S) de Fórmula II.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el proceso comprende además formar el compuesto de Fórmula II como una mezcla de los diastereoisómeros (R) y (S); y en donde la etapa a) comprende suspender o disolver la mezcla de los diastereoisómeros (R) y (S) del compuesto de Fórmula II en un solvente (S2).
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde B2 es una base de amina orgánica.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la base de amina orgánica es una base de amina orgánica primaria, secundaria, terciaria o cíclica; preferentemente en donde la base de amina orgánica es trietilamina.
5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde una base de amina orgánica es un N-alquilimidazol, imidazol, piridina opcionalmente sustituida o triquilamina.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde B2 es una base inorgánica; en donde preferentemente la base inorgánica es un hidróxido de metal alcalino, carbonato de metal alcalino, alcóxido de metal alcalino o arilóxido de metal alcalino.
7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde S2 es un hidrocarburo o una mezcla que comprende un hidrocarburo.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde S2 es hexano o heptano; o en donde S2 es una mezcla de hexano o heptano y un solvente orgánico polar, la mezcla comprende más del 50 % en volumen de hexano o heptano; en donde preferentemente S2 es una mezcla de heptano o hexano y acetato de etilo, la mezcla comprende más del 50 % en volumen de heptano o hexano.
9. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa b) comprende agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 durante 6 h o más; y/o, en donde la etapa b) comprende agitar la mezcla del compuesto de Fórmula II y la base B2 a una temperatura de 0 a 50 °C.
10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto de Fórmula II es un compuesto seleccionado de:

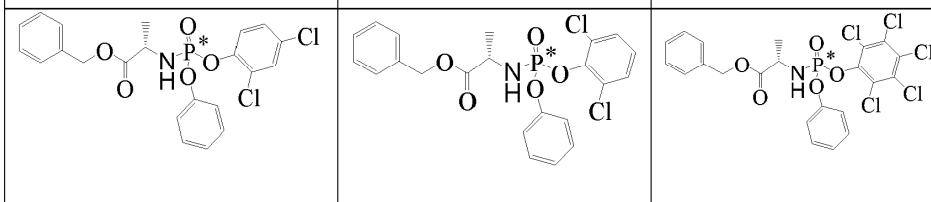
5



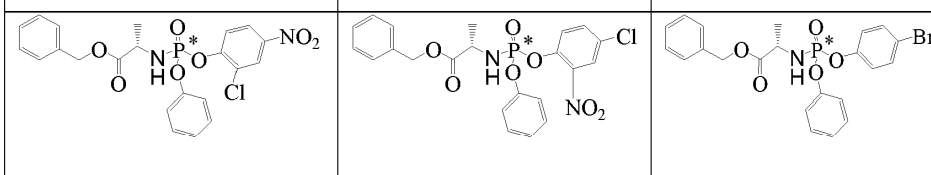
10



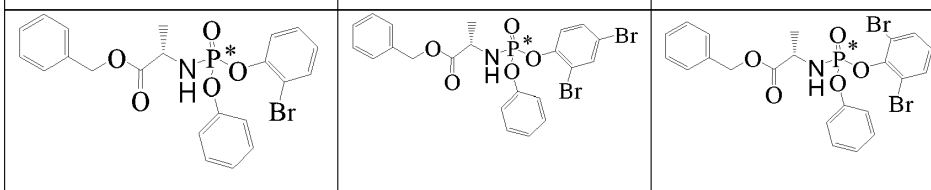
15



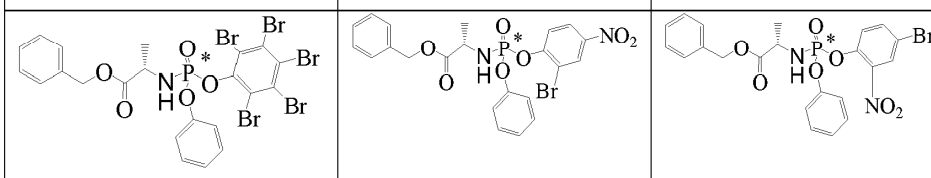
20



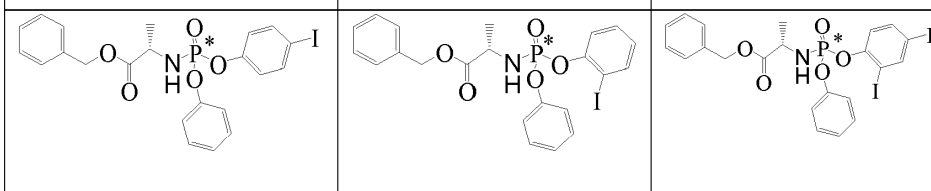
25



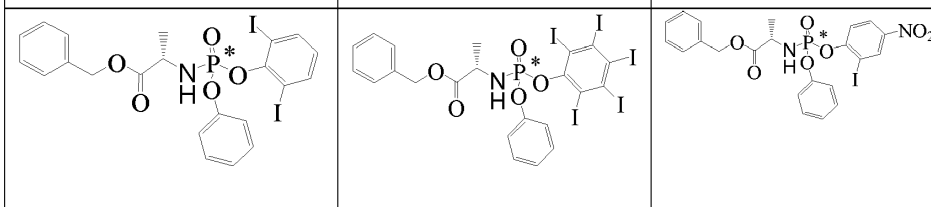
35



40



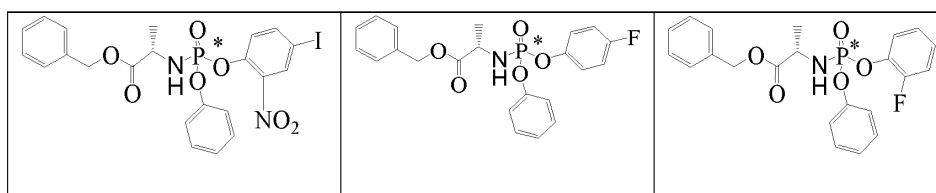
45



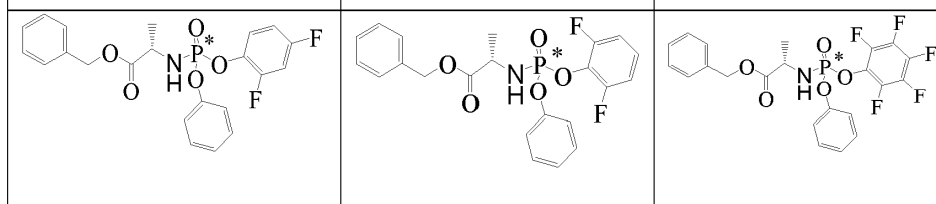
50

55

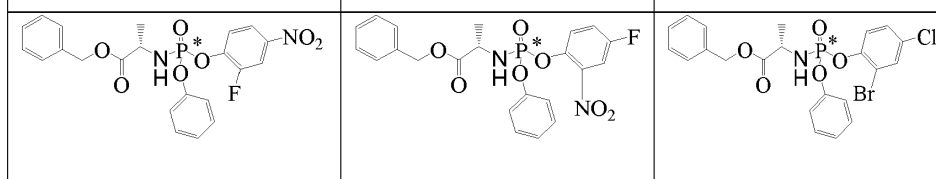
5



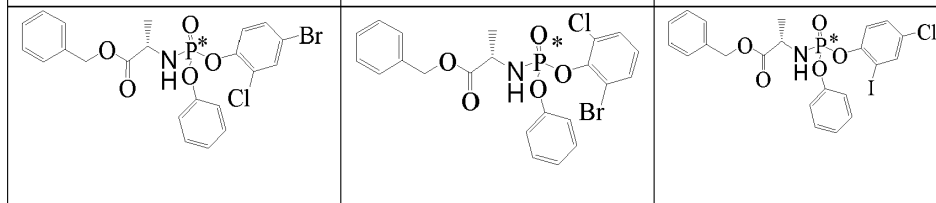
10



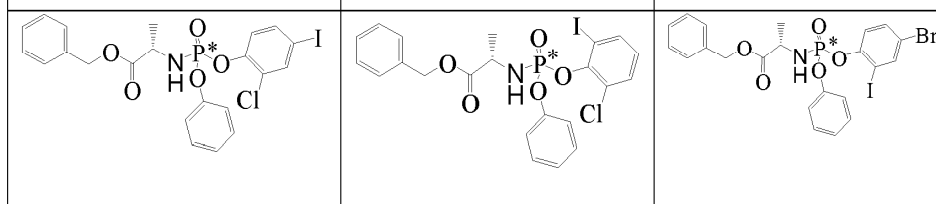
15



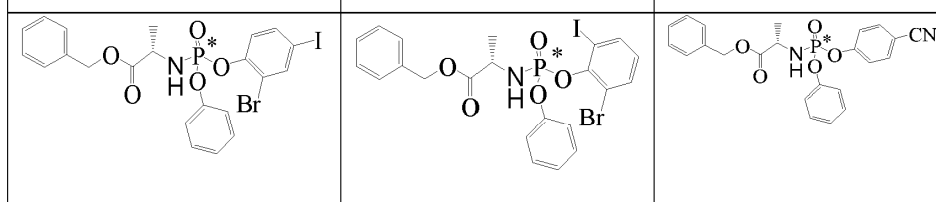
20



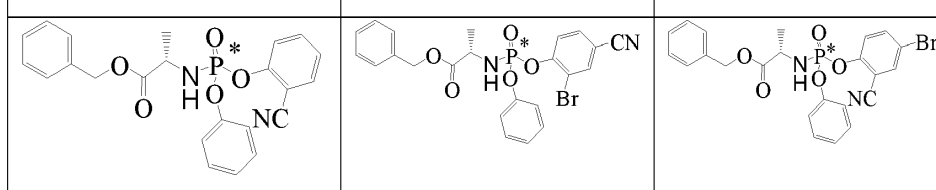
25



30



35

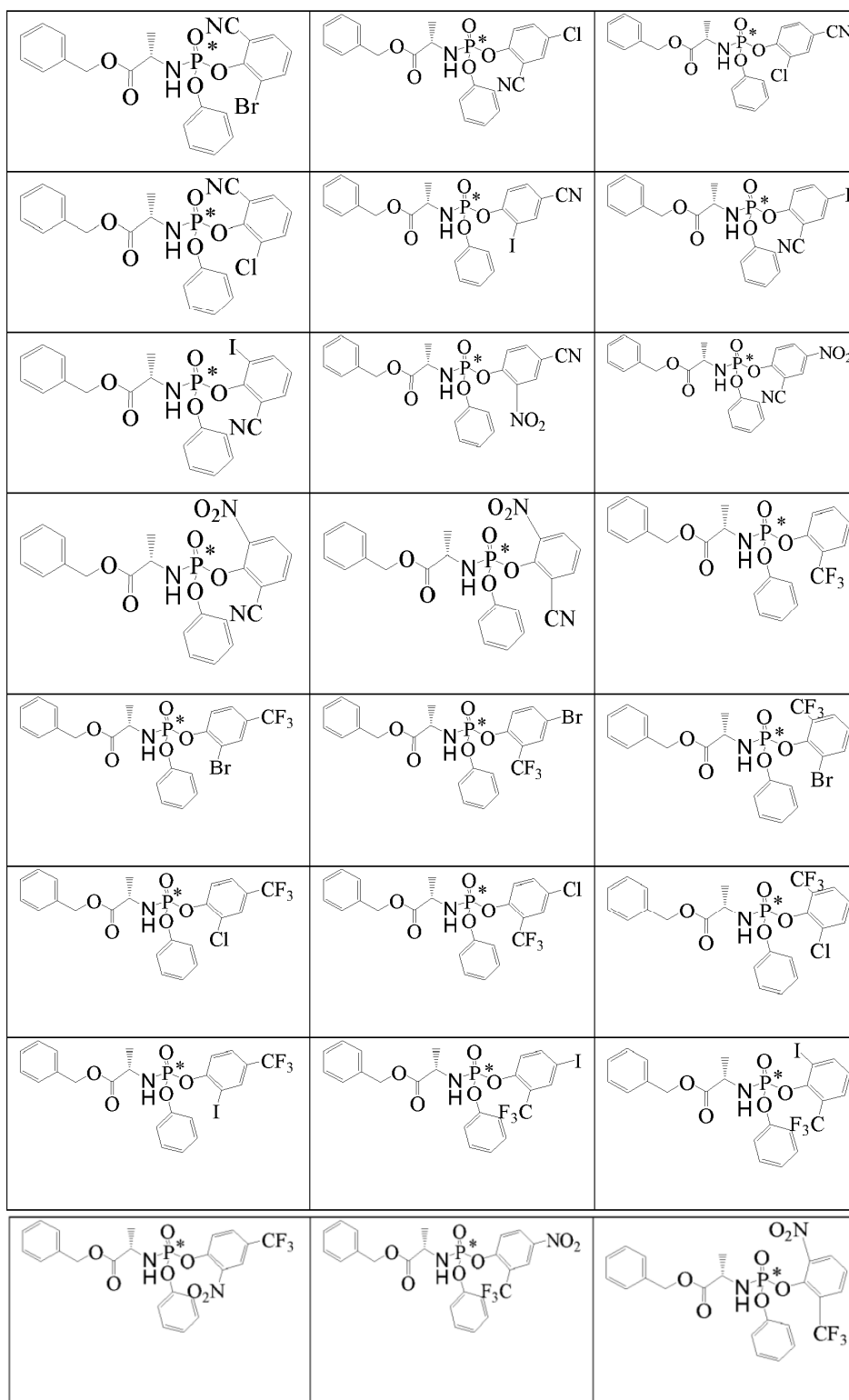


40



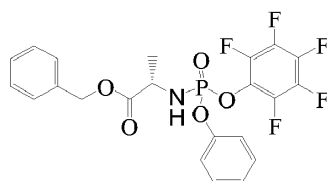
45

50

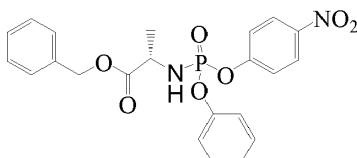


*representa el centro quiral

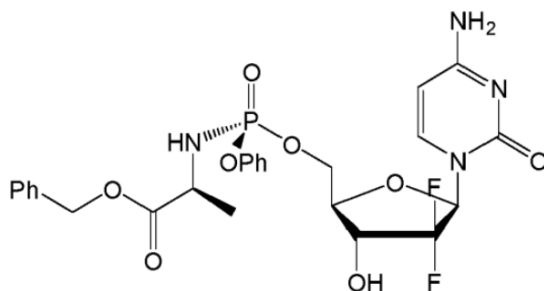
11. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto de Fórmula II es:



12. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto de Fórmula II es:



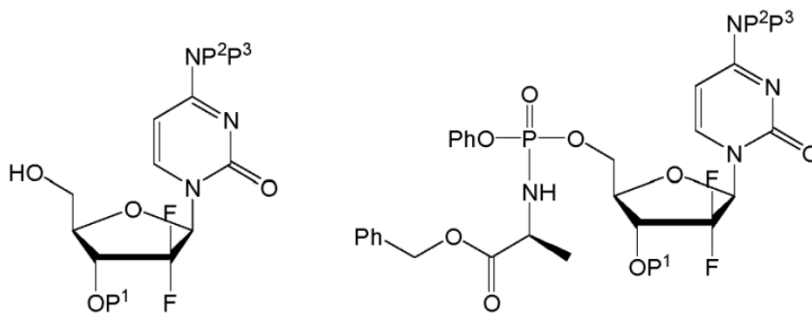
13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el proceso es un proceso para la preparación del diaestereoisómero (S) de gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alanil)] fosfato (Fórmula I) en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura:



Fórmula I

el proceso comprende además la etapa d) y opcionalmente la etapa e):

d) hacer reaccionar un compuesto del diaestereoisómero (S) de Fórmula II que se obtiene en la etapa c) con un compuesto de Fórmula III en presencia de una base (B1) para proporcionar un compuesto de Fórmula IV en forma sustancialmente diastereoméricamente pura; en donde P¹, P² y P³ independientemente representa hidrógeno o un grupo protector; y en donde el compuesto de Fórmula II está en forma sustancialmente diastereoméricamente pura:



Fórmula III

Fórmula IV

; y

e) donde cualquiera de uno o más de P¹, P² y P³ son grupos protectores, opcionalmente retirar los grupos protectores P¹, P² y P³ del compuesto de Fórmula IV para proporcionar (S)-gemcitabina-[fenil (benzoxi-L-alanil)] fosfato en forma sustancialmente diastereoméricamente pura.

14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde P¹ es —C(O)O-alquilo C₁-C₆ o —C(O)OCH₂-arilo opcionalmente sustituido; preferentemente en donde P¹ es —C(O)O^tBu; y preferentemente aún en donde la etapa e) se logra mediante la reacción del producto de la etapa d) con una mezcla de un alcohol C₁-C₄ y agua.

15. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en donde P^2 es H; y/o en donde P^3 es H.
- 5 16. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde B1 es un reactivo de Grignard; preferentemente en donde B1 es $t\text{-BuMgCl}$.
- 10 17. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde la etapa d) se lleva a cabo en un solvente de éter; preferentemente en donde la etapa d) se lleva a cabo en THF.