



MD/EP 3386998 T2 2022.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3386998 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07H 1/00 (2006.01.01),
C07H 19/06 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0977 (22) Data de depozit: 2016.12.09 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16812797.5, 2016.12.09 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3386998, 2018.10.17 (31) Numărul cererii prioritare: 6635CH2015; 201602185 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.12.11; 2016.02.08 (33) Țara cererii prioritare: IN; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2022, 2022.03.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 45/2021, 2021.11.10 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 11/2018, 2018.11.30
(71) Solicitanți: NUCANA PLC, GB; LAURUS LABS LIMITED, IN (72) Inventatori: KOTALA Mani Bushan, IN; DAMMALAPATI Venkata Lakshmi Narasimha Rao, IN (73) Titulari: NUCANA PLC, GB; LAURUS LABS LIMITED, IN (74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Sinteza diastereoselectivă a derivaților fosfat și a premedicamentului gemcitabinei NUC-1031

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție furnizează o metodă de preparare a intermediarilor utili în sinteza gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)]fosfatului.

2
Revendicări: 17

MD/EP 3386998 T2 2022.03.31

**(54) Diastereoselective synthesis of phosphate derivatives and of the
gemcitabine prodrug NUC-1031**

(57) Abstract:

1
The present invention provides a method for the preparation of intermediates useful in the synthesis of gemcitabine-[phenyl-benzoxo-L-alaninyl)]-phosphate. It also

2
provides a method of preparing gemcitabine-[phenyl-benzoxo-L-alaninyl)]-phosphate.
Claims: 17

Descriere:

(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)

BAZA INVENȚIEI

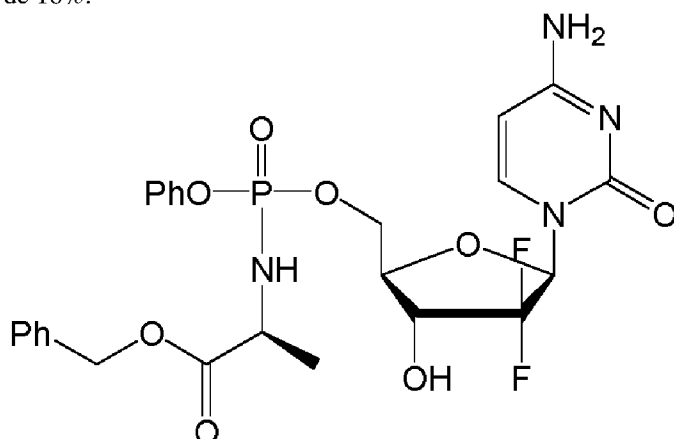
Se utilizează clinic mai mulți analogi nucleozidici precum citarabina, fludarabina, cladribina, capecitabina, gemcitabina și pentostatina ca agenți antineoplazici foarte eficienți. Dintre aceștia, gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-deoxicitidina; comercializată ca Gemzar™) este deosebit de interesantă datorită activității sale unice împotriva tumorilor solide. Este aprobată în prezent pentru tratarea cancerului mamar, pulmonar macrocelular, ovarian și pancreatic și este larg utilizată pentru tratarea unei varietăți de alte cancere inclusiv vezical, biliar, colorectal și limfom.

Se crede că mai multe mecanisme de auto-potențare unice acestui analog nucleozidic sunt responsabile pentru activitatea gemcitabinei împotriva tumorilor solide. Metabolitul difosfat al gemcitabinei inhibă reductaza ribonucleotidică, care duce la concentrații mai mici ale deoxicitidin trifosfatului intracelular (dCTP) și astfel încorporarea crescută a metabolitului trifosfat al gemcitabinei în ADN, care duce la inhibarea sintezei ADN și blochează încheierea ciclului de diviziune celulară. În plus, reducerea concentrației dCTP crește enzima citidin kinaza, care este responsabilă pentru fosforilarea inițială a gemcitabinei, o etapă necesară în inhibarea sintezei ADN de către medicament. În sfârșit, metabolitul trifosfat al gemcitabinei este un inhibitor al citidin deaminazei, care este responsabilă de inactivarea gemcitabinei prin conversie în metabolitul uridinei. Astfel, natura aditivă a factorilor de mai sus poate explica eficiența gemcitabinei în tratarea tumorilor solide.

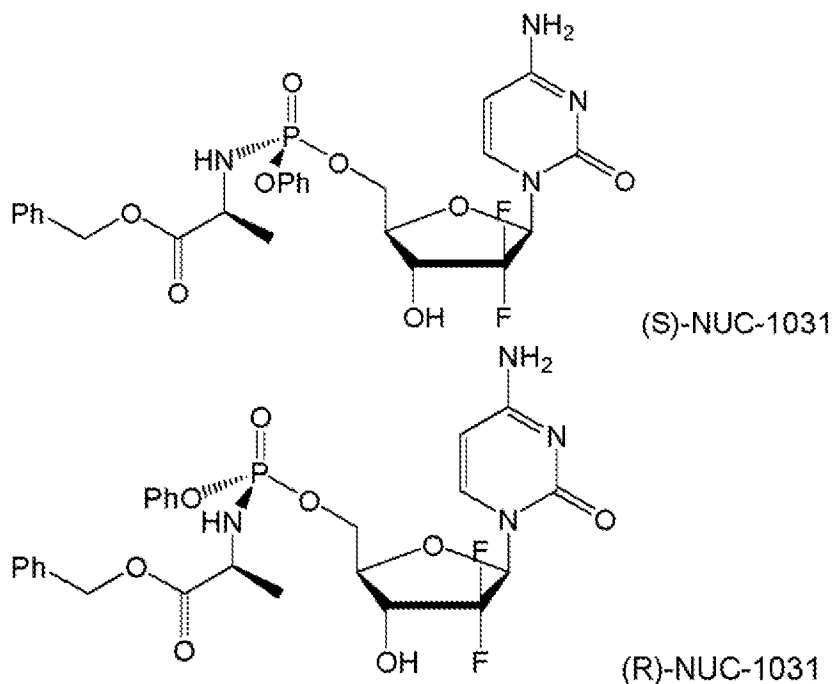
Datorită naturii lipofile a ProTides, aceste molecule pot furniza monofosfații nucleozidici direct în celula tumorală intactă. Studii anterioare au caracterizat mecanisme de transport celular multiple pentru medicamente de analogi nucleozidici și derivații lor (pentru o analiză, vezi Balimane et al., Adv. Drug Delivery Rev. 1999, 39, 183-209). Un compus relativ hidrofил, gemcitabina are capacitate limitată de a pătrunde prin membrane plasmatică prin difuzie pasivă și mai multe studii au demonstrat că gemcitabina este un substrat pentru transportorii nucleozidici echilibrativi și concentrativi (ENT, respectiv CNT). În mod specific, gemcitabina este transportată de ENT1, ENT2, CNT1 și CNT3 umani, dar nu de transportorul concentrativ selectiv la purină CNT2 (vezi Mackey et al., Cancer Res. 1998, 58, 4349-4357; Mackey et al., J. Natl. Cancer Inst. 1999, 91, 1876-1881; și Fang et al., Biochem. J. 1996, 317, 457465).

Brevetul U.S. nr. 4,808,614 descrie 2', 2'-difluoronucleozide care sunt agenți antivirali și anti-tumoralii cunoscuți, în mod specific 2',2'-difluoro-2'-deoxicitidina (cunoscută de obicei ca Gemcitabina).

Brevetul U.S. nr. 7,951,787 descrie derivați de fosforamidat ai nucleotidelor cum ar fi 2'-deoxi-2',2'-difluoro-D-citidina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfat (denumit și Gemcitabina-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfat sau NUC-1031). Se descriu în acest brevet metode de sinteză chimică a acestor derivați prin reacția gemcitabinei sau a variantelor sale structurale cu un amestec diastereoizomeric de fosfocloridat cum ar fi fenil-(benzoxi-L-alaninil)-fosforocloridat din Formula II în prezența N-metilimidazolului, urmată de purificarea produsului prin cromatografie în coloană, eluare cu diclorometan/metanol 95:5 pentru a obține un produs pur ca un solid spumos alb cu randament foarte mic de 16%.

**NUC-1031**

NUC-1031 se prepară în mod tipic ca un amestec de doi diastereoizomeri, epimerici la centrul fosfatului (Slusarczyk et al., J. of Med. Chem., 2014, 57(4), 1531-1542). Diastereoizomerii NUC-1031 au următoarele structuri:



NUC-1031 este extrem de lipofil și așadar slab solubil în apă (prin calcul: <0.1 mg/mL) și fracțiunile ionizabile au pKa calculate în afara intervalului pH adecvat pentru administrare parenterală. Este în esență insolubil în apă, indiferent de conținutul de sare sau pH, ceea ce afectează elaborarea compozițiilor de furnizare a compusului la doze suficient de mari pentru tratament eficient. Afectează de asemenea elaborarea proceselor de fabricare eficiente care vor permite producerea eficientă a NUC-1031 din punct de vedere al costului.

S-a descoperit recent că epimerul (S) al gemcitabin-[fenil-benzoxi-L-alaninil]-fosfatului are suficientă solubilitate în amestecuri de mai mulți solvenți organici polari cu apă pentru a fi adecvat preparării și administrării ca agent terapeutic. Solubilitatea epimerului (R) este considerabil mai mică. În anumite amestecuri de solvent, diferența de solubilitate între epimerul (S) și epimerul (R) este de peste 100 de ori. Se preconizează așadar că se pot dezvolta metode de administrare mai eficiente din punct de vedere clinic, practice și acceptabile de către pacient folosind epimerul (S) decât pot fi dezvoltate folosind epimerul (R) sau amestecul. Este de dorit așadar prevederea gemcitabin-[fenil-benzoxi-L-alaninil]-(S)-fosfatului în formă în mare măsură diastereoizomeric pură.

Solubilitatea mică a NUC-1031 în mulți solvenți, în special cei folosiți de obicei în separarea compușilor folosind HPLC, înseamnă că ar fi necesare volume mari de solvent pentru orice separare pe bază de HPLC. Aceasta înseamnă că orice proces de separare la scară industrială pe bază de HPLC ar fi costisitor, ar consuma cantități mari de energie și material și ar produce cantități mari de deșeuri.

Deși la momentul depunerii prezentei cereri pare preferabilă administrarea gemcitabin-[fenil-benzoxi-L-alaninil]-fosfatului ca epimer (S), pot exista motive de necesitate a obținerii epimerului (R) într-o formă diastereoizomeric pură. Acestea ar include efectuarea testelor comparative pentru a converti epimerul (R) în epimer (S) sau fiindcă epimerul (R) asigură beneficii față de epimerul (S) care îi eclipsează solubilitatea redusă.

Într-adevăr, s-a arătat că epimerul (R) are un timp de înjumătățire la incubare cu celule hepatice umane izolate de patru ori mai mare decât cel al epimerului (S). Timpul de înjumătățire mai lung asociat cu izomerul (R) indică un clearance intrinsec mai scăzut și ar trebui să determine un profil farmacocinetic și farmacodinamic diferit față de izomerul (S), ceea ce poate conferi unele beneficii.

Atât epimerul (S), cât și (R) sunt terapeutic activi.

WO 2014/076490 descrie un proces de preparare a promedicamentelor nucleozidice cum ar fi Gemcitabin-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfat prin reacția gemcitabinei sau a variantelor sale structurale cu un amestec diastereoizomeric de fosfocloridați în prezența unui catalizator cuprinzând sare metalică precum $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, CuCl , CuBr , CuI , $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{OC}(\text{O})\text{CF}_3)_2$, $\text{Me}(\text{OTf})_3$, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, $\text{Fe}(\text{OTf})_3$, $\text{La}(\text{OTf})_3$ cu randament de 45%.

Bruce et al. descrie o sinteză a fosforamidaților nucleotidici diastereoizomerici puri și propune utilizarea unui singur izomer al reactivului de fosforamidare care se poate folosi pentru a obține diastereomerul fosforamidat nucleozidic dorit. Diastereoizomerii individuali ai reactivilor de

fosforamidare sunt izolați prin HPLC, cristalizare sau cromatografie cu fluid supercritic (Bruce et al., J. Org. Chem., 2011, 76, 9311-8319). WO 2011/123645 A2 descrie metode similare pentru sinteza Sofosbuvir.

WO 2016/030335 A1 descrie de asemenea separarea diastereoizomerilor reactivilor de fosforamidare prin cromatografie cu fluid supercritic.

Un obiectiv al anumitor aplicări ale prezentei invenții este prevederea unei metode de furnizare a gemcitabin-[fenil-(benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfatului în formă în mare măsură diastereoizomeric pură.

Un obiectiv al anumitor aplicări ale prezentei invenții este prevederea unei metode de furnizare a gemcitabin-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfatului în formă în mare măsură diastereoizomeric pură.

Un obiectiv al anumitor aplicări ale prezentei invenții este prevederea unei metode de furnizare a epimerului (S) și/sau (R) în formă în mare măsură diastereoizomeric pură, care poate fi adaptată la scară, este economică și/sau eficientă, de ex. mai bine adaptată la scară, mai economică și/sau eficientă decât metodele care folosesc HPLC. Astfel, un obiectiv al anumitor aplicări ale prezentei invenții este prevederea unei metode de furnizare a epimerului (S) și/sau (R) în formă în mare măsură diastereoizomeric pură, care este adecvată preparării la scară mare.

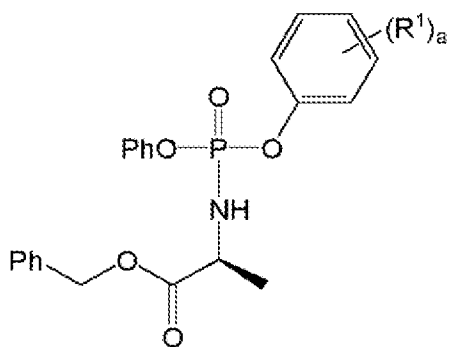
Un obiectiv al anumitor aplicări ale prezentei invenții este prevederea unei metode simple, adică a unei metode care implică un număr minim de etape și/sau reactivi, de furnizare a epimerului (S) și/sau (R) în formă în mare măsură diastereoizomeric pură.

Un alt obiectiv al anumitor aplicări ale prezentei invenții este prevederea unei metode care asigură că epimerii (S) sau (R) separați sunt prevăzuți în formă în mare măsură diastereoizomeric pură și, în același timp, că îndeplinesc sau depășesc criteriile necesare stipulate de organizații precum US FDA cu privire la cantitățile și natura oricăror impurități minore apărute din sinteză și separare.

Anumite aplicări ale prezentei invenții satisfac unele sau toate obiectivele de mai sus.

REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție prevede un proces de îmbogățire diastereoizomerică a unui compus din Formula II;

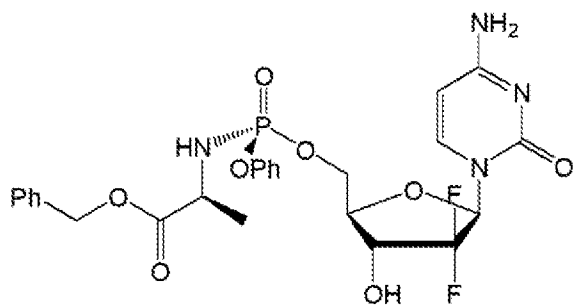


Formula II

unde R^1 reprezintă o grupă de retragere a electronilor și a este un număr întreg de la 1 la 5, procesul cuprinzând:

- suspensia sau dizolvarea diastereoizomerului R al compusului din Formula II; sau a unui amestec de diastereoizomeri (R) și (S) ai compusului din Formula II într-un solvent (S2);
- tratarea soluției sau suspensiei cu o bază aminică organică sau bază anorganică (B2) pentru a obține diastereoizomerul (S) în formă în mare măsură diastereoizomeric pură; și
- izolarea diastereoizomerului (S) din Formula II.

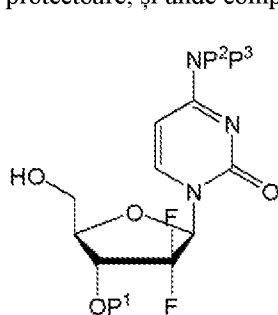
Procesul poate fi un proces de preparare a diastereoizomerului (S) al gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfatului (Formula I) în formă în mare măsură diastereoizomeric pură:



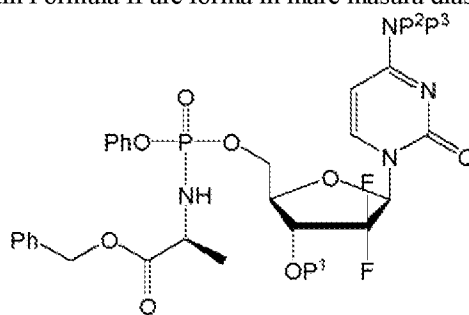
Formula I

procesul cuprinzând de asemenea etapa d) și opțional etapa e):

- 5 d) reacția unui compus al diastereoizomerului (S) din Formula II obținut în etapa c) cu un compus din Formula III în prezența unei baze (B1) pentru a obține un compus din Formula IV în formă în mare măsură diastereomeric pură; unde P^1 , P^2 și P^3 reprezintă în mod independent hidrogen sau o grupă protectoare; și unde compusul din Formula II are formă în mare măsură diastereomeric pură:



Formula III



Formula IV

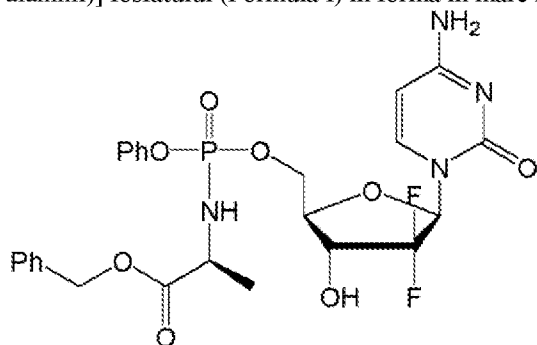
10

; și

e) unde oricare una sau mai multe dintre P^1 , P^2 și P^3 reprezintă grupe protectoare, opțional îndepărtarea grupelor protectoare P^1 , P^2 și P^3 din compusul din Formula IV pentru a furniza (S)-gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfat în formă în mare măsură diastereomeric pură.

15

Conform prezentei invenții, se prevede un proces de preparare a gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfatului (Formula I) în formă în mare măsură diastereoizomeric pură:

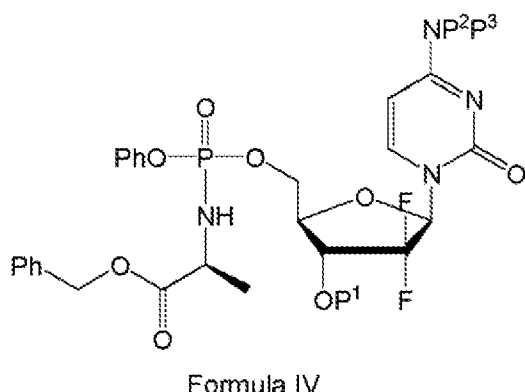
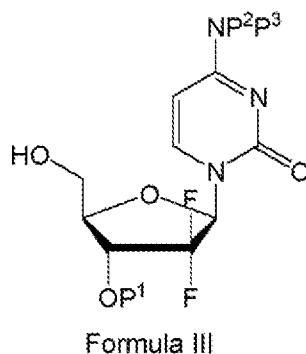
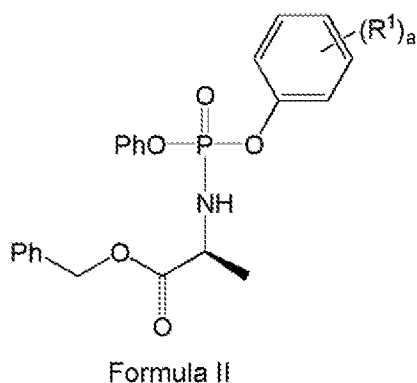


Formula I

procesul cuprinzând etapa d) și opțional etapa e):

20

d) reacția unui compus din Formula II; unde R^1 reprezintă o grupă de retragere a electronilor și a este un număr întreg de la 1 la 5, cu un compus din Formula III în prezența unei baze (B1) pentru a obține un compus din Formula IV în formă în mare măsură diastereomeric pură; unde P^1 , P^2 și P^3 reprezintă în mod independent hidrogen sau o grupă protectoare; și unde compusul din Formula II este în formă în mare măsură diastereomeric pură:



e) unde oricare una sau mai multe dintre P¹, P² și P³ reprezintă grupe protectoare, opțional îndepărtarea grupelor protectoare P¹, P² și P³ din compusul din Formula IV pentru a furniza gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfat în formă în mare măsură diastereomeric pură.

5 R¹ poate fi selectat din grupul cuprinzând: grupa halo (de ex. selectată dintre fluoro, bromo, cloro sau iodo); trifluorometil, ciano și nitro. a este un număr între 1 și 5. R¹ poate fi, la fiecare apariție, halo, de ex. fluoro. a poate fi 5.

Deplasarea grupei fenoxi substituie are loc cu inversarea stereochimiei fosfatului. Astfel, diastereoizomerul (S) al precursorului furnizează diastereoizomerul (S) al NUC-1031 și diastereoizomerul (R) al precursorului furnizează diastereoizomerul (R) al NUC-1031.

10 Baza (B1) poate fi o bază de azot. Bazele de azot includ N-alchilimidazoli (de ex. N-metil imidazol (NMI)), imidazol, piridine opțional substituie (de ex. colidina, piridina, 2,6-lutidina) și trialchilamine (de ex. trietilamina și diizopropiletilamina). Alternativ, baza (B1) poate fi o bază organometalică sau bază de hidrură metalică (de ex. NaH). Astfel, baza poate fi un reactiv Grignard (i.e. o halogenură alchilmagneziu). Reactivii Grignard exemplificativi includ halogenuri t-butilmagneziu cum ar fi tBuMgCl, tBuMgBr. De preferință, baza este tBuMgCl.

Procesul de preparare a diastereoizomerului (S) al gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfatului (Formula I) în formă în mare măsură diastereomeric pură poate fi efectuat într-un solvent S1.

20 Inventatorii au descoperit în mod surprinzător că, la tratarea compușilor din formula II cu o bază, aceștia se izomerizează, formând preferențial diastereoizomerul (S) față de diastereoizomerul (R). Astfel, diastereoizomerul (R) poate fi convertit în diastereoizomerul (S) sau un amestec epimeric al diastereoizomerului (R) și diastereoizomerului (S) poate fi convertit în diastereoizomerul (S). acest lucru crește eficiența totală a oricărei secvențe de sinteză pentru producerea diastereoizomerului (S) al NUC-1031 care încorporează procesul din primul first aspect, ceea ce înseamnă că se poate folosi întregul compus din formula II, chiar și cel care s-a format inițial ca diastereoizomer (R), și nu se aruncă nici o parte.

30 Procesul mai poate cuprinde: formarea compusului din Formula II ca un amestec al diastereoizomerilor (R) și (S); și etapa a) poate cuprinde suspensia sau dizolvarea amestecului diastereoizomerilor (R) și (S) ai compusului din Formula II într-un solvent (S2).

35 Baza (B2) poate fi selectată din grupul constând din baze aminice organice (de ex. amine primare, secundare, terțiare, amină ciclică; bazele aminice organice exemplificative includ baze precum N-alchilimidazoli (de ex. N-metil imidazol (NMI), imidazol, piridine opțional substituie (de ex. colidina, piridina, 2,6-lutidina) și trialchilamine (de ex. trietilamina și diizopropiletilamina)); sau baze anorganice (de ex. hidroxid de metal alcalin, carbonați de metal alcalin, alcoxi de metal alcalin, ariloxizi de metal

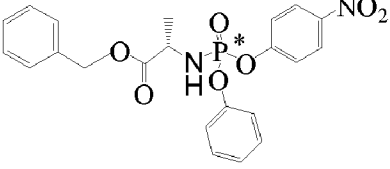
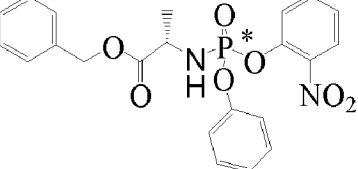
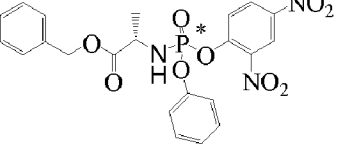
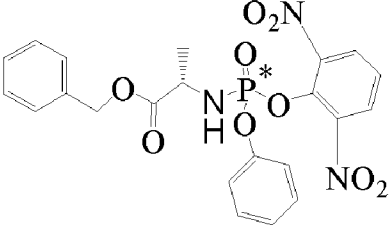
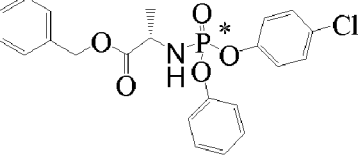
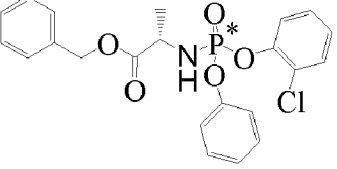
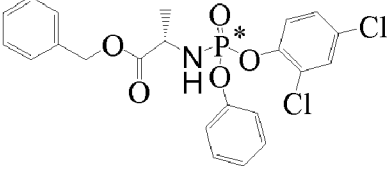
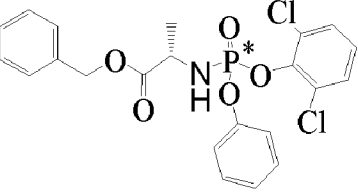
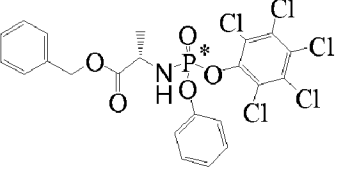
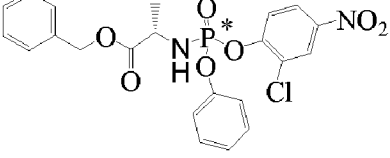
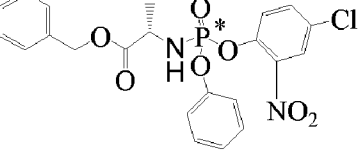
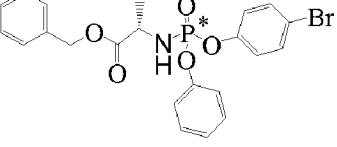
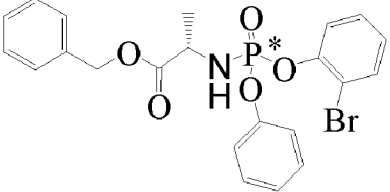
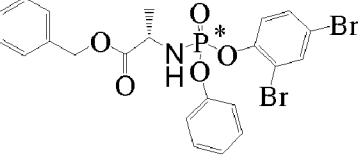
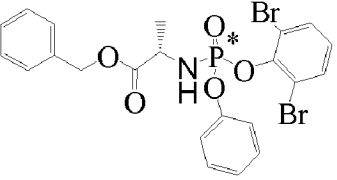
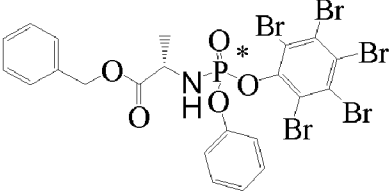
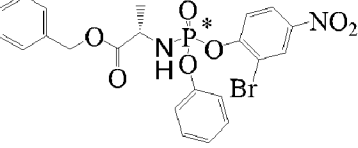
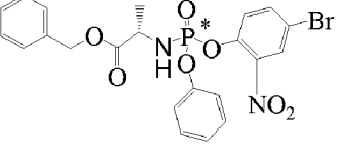
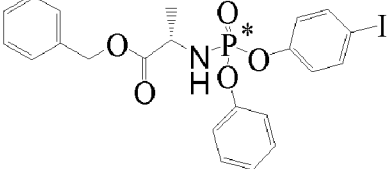
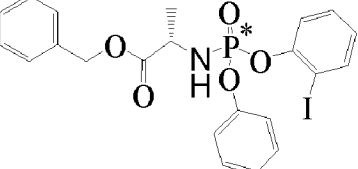
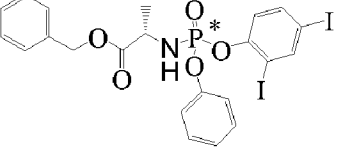
alcalin). De preferință, B2 este o amină terțiară. Astfel, B2 poate fi o trietilamină. Cel mai preferabil, B2 este trietilamină.

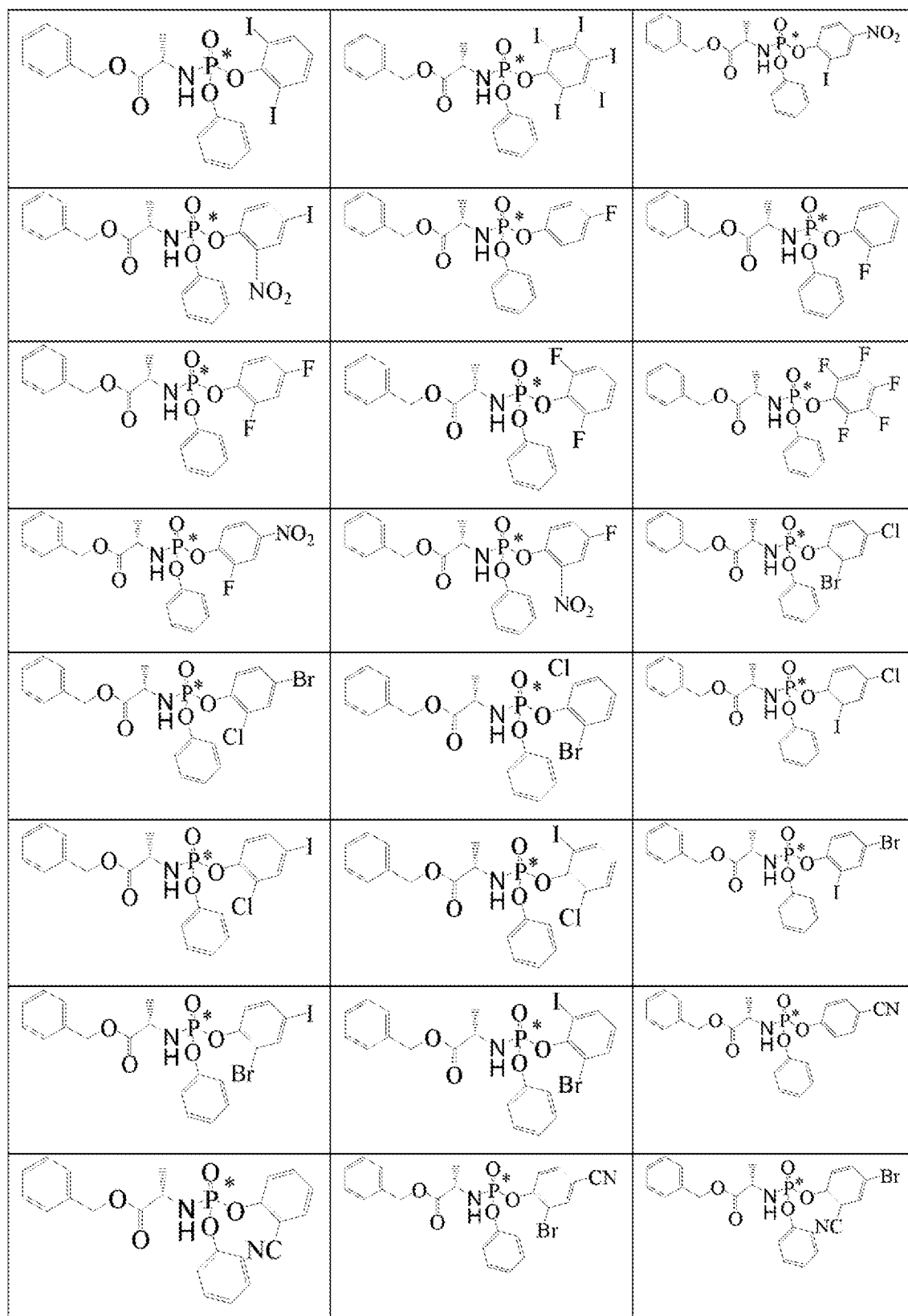
- 5 Solventul S2 poate fi selectat din grupul constând din amide, eteri, esteri, cetone, hidrocarburi aromatice, solvenți halogenați, nitrili, sulfoxizi, sulfone și amestecuri ale acestora. S2 poate fi un solvent organic. Solvenții organici includ nelimitativ eteri (de ex. tetrahidrofuran, dioxan, dietil eter); cetone (de ex. acetona și metil izobutil cetona); solvenți halogenați (de ex. diclorometan, cloroform și 1,2-dicloroetan); hidrocarburi (de ex. ciclohexan, pentan, hexan, heptan), solvenți aromatici (de ex. benzen și toluen), esteri (de ex. acetat de etil) și amide (de ex. DMF, NMP); sau amestecuri ale acestora. De preferință, S2 este o hidrocarbură sau un amestec cuprinzând o hidrocarbură. Dacă S2 este un amestec, 10 poate fi un amestec care conține peste 50% (de ex. peste 70%) hidrocarbură. S2 poate fi o hidrocarbură. Hidrocarbura poate fi hexan. Hidrocarbura poate fi heptan. S2 poate fi un amestec de hexan sau heptan și un solvent organic polar (de ex. un eter, ester, alcool sau solvent halogenat). S2 poate fi un amestec de hexan sau heptan și un solvent organic polar, amestecul cuprinzând peste 50% (de ex. peste 70%) din volum hexan sau heptan. S2 poate fi un amestec de hexan sau heptan și acetat de etil. S2 poate fi un 15 amestec de heptan și acetat de etil. S2 poate fi un amestec de hexan sau heptan și acetat de etil, amestecul cuprinzând peste 50% (de ex. peste 70%) din volum hexan sau heptan. S2 poate fi un amestec de heptan și acetat de etil, amestecul cuprinzând peste 50% (de ex. peste 70%) din volum heptan.

- Etapa b) poate cuprinde agitarea amestecului compusului din formula II și al bazei B2 timp de 2 h sau mai mult. Etapa b) poate cuprinde agitarea amestecului compusului din formula II și al bazei B2 20 timp de 6 h sau mai mult. Etapa b) poate cuprinde agitarea amestecului compusului din formula II și al bazei B2 timp de 10 h sau mai mult. Etapa b) poate cuprinde agitarea amestecului compusului din formula II și al bazei B2 timp de 16 h sau mai mult. Etapa b) poate cuprinde agitarea amestecului compusului din formula II și al bazei B2 timp de până la 36 h.

- Etapa b) poate cuprinde agitarea amestecului compusului din formula II și al bazei B2 la o 25 temperatură de la 0 la 50°C. Etapa b) poate cuprinde agitarea amestecului compusului din formula II și al bazei B2 la o temperatură de la 10 la 35°C.

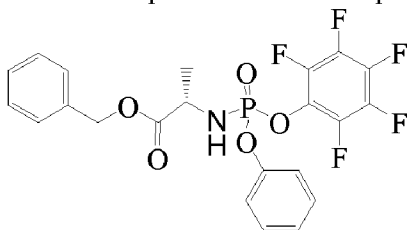
În anumite aplicări specifice, compusul din Formula II este un compus selectat dintre:

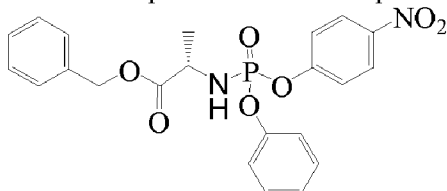


*reprezintă centrul chiral

Compusul din Formula II poate fi:



Compusul din Formula II poate fi:



5

O grupă protectoare pentru o grupă hidroxil (de ex. P¹) poate fi selectată în mod independent dintre -Si(C₁₋₆alchil)₃ opțional substituit, -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-aril opțional substituit, -C(O)-OC₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-O-alil, -C(O)-O-CH₂-fluorenil, -CH(aril)₃ opțional substituit, -(C₁-C₃-alchilen)-aril opțional substituit, -C(O)OCH₂-aril opțional substituit și -C₁-C₄-alchil-O-C₁-C₄-alchil.

10

O grupă protectoare pentru o grupă amino (de ex. P² și/sau P³) poate fi selectată în mod independent, la fiecare apariție, dintre -C(O)OC₁-C₆-alchil, -C(O)OCH₂-aril opțional substituit, -C(O)-O-alil, -C(O)-O-CH₂-fluorenil, -CH(aril)₃ opțional substituit, -(C₁-C₃-alchilen)-aril opțional substituit, -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-aril opțional substituit, -S(O)₂-C₁-C₆-alchil, -S(O)₂-aril opțional substituit și -Si(C₁₋₆alchil)₃ opțional substituit.

15

Mulți dintre compușii inițiali protejați din Formula III sunt cunoscuți în domeniu și/sau pot fi preparați prin metode cunoscute. De exemplu compușii inițiali din Formula III pot fi sintetizați din gemcitabină prin protejarea grupelor 3'-hidroxi și 4-amino cu grupe protectoare adecvate. Grupele protectoare pot fi adăugate în mod tipic și îndepărtate folosind metodologia convențională a grupelor protectoare, de exemplu, descrisă în "Protective Groups in Organic Chemistry," editată de J W F McOmie (1973); "Protective Groups in Organic Synthesis", ed. 2, T W Greene (1991); și "Protecting Groups", ed. 3 P. J. Kocienski (1995).

20

În mod tipic va fi necesară prepararea compușilor protejați cu grupă 3'-hidroxi și 4-amino protejând mai întâi grupa 5'-hidroxi a gemcitabinei cu o grupă protectoare care este ortogonală cu cele care vor fi folosite pentru protejarea grupei 3'-hidroxi și 4-amino (i.e. o grupă care poate fi îndepărtată fără a îndepărta și grupele 3'-hidroxi și 4-amino dorite). Simultan sau ulterior, grupele 3'-hidroxi și 4-amino sunt protejate cu grupa(e) protectoare dorită(e) și grupa protectoare 5'-hidroxi poate fi îndepărtată pentru a genera compusul din Formula III. Anumite grupe protectoare pot fi introduse simultan pe grupele 3'-hidroxi și 5'-hidroxi și opțional 4-amino și apoi îndepărtate selectiv din grupa 5' hidroxil fără a fi îndepărtate din grupele 3'-hidroxi și 4-amino.

25

30

Conform unor aplicări, P¹ este selectat în mod independent dintre -Si(C₁₋₆alchil)₃ opțional substituit, -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-aril opțional substituit, -C(O)-OC₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-O-alil, -C(O)-O-CH₂-fluorenil, -CH(aril)₃ opțional substituit, -(C₁-C₃-alchilen)-aril opțional substituit, -C(O)OCH₂-aril opțional substituit și -C₁-C₄-alchil-O-C₁-C₄-alchil.

35

P¹ poate fi selectat în mod independent dintre -Si(C₁₋₆alchil)₃ opțional substituit, -C(O)-OC₁-C₆-alchil opțional substituit și -C(O)OCH₂-aril opțional substituit, -C(O)-O-alil. De preferință, P¹ este selectat dintre -C(O)O-tBu, -C(O)O-benzil și -C(O)OCH₂-alil. Astfel, P¹ poate fi -C(O)OCH₂-aril. P¹ poate fi -C(O)O-tBu.

Alternativ, P¹ poate fi selectat în mod independent dintre -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituit și -C(O)-aril opțional substituit, de ex. P¹ poate fi selectat în mod independent dintre benzoil și acetil.

40

P² poate fi selectat în mod independent dintre -C(O)OC₁-C₆-alchil, -C(O)OCH₂-aril opțional substituit, -C(O)-O-alil, -C(O)-O-CH₂-fluorenil, -CH(aril)₃ opțional substituit, -(C₁-C₃-alchilen)-aril opțional substituit, -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-aril opțional substituit, -S(O)₂-C₁-C₆-alchil, -S(O)₂-aril opțional substituit și -Si(C₁₋₆alchil)₃ opțional substituit.

45

P² poate fi selectat în mod independent dintre -C(O)OC₁-C₆-alchil, -C(O)OCH₂-aril opțional substituit, -C(O)-O-alil, -CH(aril)₃ opțional substituit și -Si(C₁₋₆alchil)₃ opțional substituit. De preferință, P² este selectat dintre -C(O)O-tBu, -C(O)O-benzil și -C(O)OCH₂-alil. Astfel, P² poate fi -C(O)OCH₂-aril.

Alternativ, P² poate fi selectat în mod independent dintre -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituit și -C(O)-aril opțional substituit, de ex. P² poate fi selectat în mod independent dintre benzoil și acetil.

Alternativ, P² este H.

- În mod similar, P³ poate fi selectat în mod independent dintre H, -C(O)OC₁-C₆-alchil, -C(O)OCH₂-aril opțional substituit, -C(O)-O-alil, -C(O)-O-CH₂-fluorenil, -CH(aril)₃ opțional substituit, -(C₁-C₃-alchilen)-aril opțional substituit, -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-aril opțional substituit, -S(O)₂-C₁-C₆-alchil, -S(O)₂-aril opțional substituit și -Si(C₁-alchil)₃ opțional substituit.

De preferință, P³ este H.

- Grupa -Si(C₁-alchil)₃ opțional substituită poate fi o grupă -Si(C₁-alchil)₃. Grupa (i.e. alchil) este de preferință nesubstituită. Exemplele ilustrative includ trietilsilil și *t*-butil-dimetilsilil.

Grupa -C(O)-C₁-C₆-alchil opțional substituită poate fi o grupă -C(O)-C₁-C₆-alchil. Grupa (i.e. grupa alchil) este de preferință nesubstituită. Exemplele ilustrative includ acetil și propionil.

- Grupa -C(O)-aril opțional substituită poate fi o grupă -C(O)-fenil. Grupa (i.e. grupa fenil) este de preferință nesubstituită. Exemplele ilustrative includ benzoil.

Grupa -C(O)-OC₁-C₆-alchil opțional substituită poate fi o grupă -C(O)-OC₁-C₄-alchil. Grupa (i.e. grupa alchil) este de preferință nesubstituită. Exemplele ilustrative includ -C(O)-O-metil și -C(O)-O-etil. Un exemplu deosebit de preferat este C(O)OtBu.

- Grupa -(C₁-C₃-alchilen)-aril opțional substituită este de preferință o grupă benzil opțional substituită. Exemplele ilustrative includ benzil, fenetil, 4-metoxi benzil, 4-nitrobenzil, 4-bromobenzil, 2,3-dimetoxibenzil și 2,4-dimetoxibenzil.

Grupa -C(O)OCH₂-aril este de preferință o grupă -C(O)Obenzil opțional substituită. Exemplele ilustrative includ -C(O)Obenzil și -C(O)O-(4-metoxibenzil).

- Grupa -C₁-C₄-alchil-O-C₁-C₄-alchil opțional substituită poate fi o grupă -C₁-C₂-alchil-O-C₁-C₂-alchil. Grupa (i.e. alchil) este de preferință nesubstituită. Exemplele ilustrative includ metoxi-metil (MOM) și 2-metoxi-etoxi-metil (MEM).

Grupa -S(O)₂-C₁-C₆-alchil opțional substituită poate fi o grupă -S(O)₂-C₁-C₄-alchil. Grupa (i.e. grupa alchil) este de preferință nesubstituită. Exemplele ilustrative includ metansulfonat.

- Grupa -S(O)₂-aril opțional substituită poate fi o grupă -S(O)₂-fenil. Exemplele ilustrative includ fenilsulfonat, 4-metilfenilsulfonat și 4-nitro fenilsulfonat.

Grupa -CH(aril)₃ opțional substituită poate fi o grupă -CH(fenil)₃. Exemplele ilustrative includ tritil.

- Acolo unde două sau mai multe dintre P¹, P² și P³ reprezintă grupe protectoare, etapa de deprotejare poate cuprinde două sau trei reacții de deprotejare individuale. Acesta este cazul în care se folosesc două sau trei grupe protectoare diferite și aceste două sau trei grupe protectoare nu se pot îndepărta în aceleași condiții.

Etapă de deprotejare poate cuprinde însă o singură reacție de deprotejare în care se îndepărtează toate grupele protectoare. Astfel, P¹ și P² pot reprezenta grupe protectoare care pot fi îndepărtate în aceleași condiții. P¹ și P² pot fi identice.

- P¹ și P² pot reprezenta ambele o grupă selectată dintre -C(O)OC₁-C₆-alchil opțional substituit, -C(O)-O-alil și -C(O)OCH₂-aril opțional substituit. Astfel P¹ și P² pot reprezenta ambele o grupă selectată dintre C(O)OtBu, -C(O)-O-alil și C(O)O-benzil. În unele aplicări, P¹ și P² reprezintă ambele grupe C(O)OtBu.

- De preferință P³ este hidrogen. Astfel, într-o aplicare specifică, P¹ și P² reprezintă aceleași grupe și P³ este hidrogen. Astfel, într-o aplicare specifică, P¹ și P² reprezintă ambele grupe C(O)OtBu și P³ este hidrogen.

P² și P³ pot reprezenta fiecare H și P¹ este o grupă protectoare. P² și P³ pot reprezenta fiecare H și P¹ este o grupă protectoare selectată dintre -C(O)O-tBu,

-C(O)O-benzil și -C(O)OCH₂-alil. P² și P³ reprezintă fiecare H și P¹ este -C(O)O-tBu.

- În cadrul prezentei specificații, 'formă îmbogățită diastereomeric' și 'formă în mare măsură pură diastereomeric' înseamnă o puritate diastereoizomerică mai mare de 95%. 'Forma îmbogățită diastereomeric' și 'forma în mare măsură pură diastereomeric' pot însemna o puritate diastereoizomerică mai mare de 98%, mai mare de 99% sau mai mare de 99.5%.

- Oricare dintre grupele alchil și aril menționate mai sus (de ex. fenil, inclusiv grupele fenil în grupele benzil) sunt opțional substituibile, acolo unde este posibil din punct de vedere chimic, cu 1 până la 3 substituenți selectați în mod independent, la fiecare apariție, din grupul constând din: oxo, =NR^a, =NOR^a, halo, nitro, ciano, NR^aR^a, NR^aS(O)₂R^a, NR^aCONR^aR^a, NR^aCO₂R^a, OR^a; SR^a, SOR^a, SO₃R^a, SO₂R^a, SO₂NR^aR^a, CO₂R^a, C(O)R^a, CONR^aR^a, C₁-C₄-alchil, C₂-C₄-alchenil, C₂-C₄-alchenil și C₁-C₄ haloalchil; unde R^a este selectat în mod independent, la fiecare apariție, dintre H, C₁-C₄ alchil și C₁-C₄ haloalchil.

Oricare dintre grupele alchil menționate mai sus pot fi nesubstituibile.

Oricare dintre grupele aril menționate mai sus (de ex. fenil, inclusiv grupele fenil din grupele benzil) pot fi opțional substituite, acolo unde este posibil din punct de vedere chimic, cu 1 până la 3 substituenți selectați în mod independent, la fiecare apariție, din grupul constând din: halo, nitro, ciano, NR^aR^a , $\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$, $\text{NR}^a\text{CONR}^a\text{R}^a$, $\text{NR}^a\text{CO}_2\text{R}^a$, OR^a ; SR^a , SOR^a , SO_3R^a , SO_2R^a , $\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^a$, CO_2R^a , $\text{C}(\text{O})\text{R}^a$, CONR^aR^a , C_1 - C_4 -alchil, C_2 - C_4 -alchenil, C_2 - C_4 -alchenil și C_1 - C_4 haloalchil; unde R^a este selectat în mod independent, la fiecare apariție, dintre H, C_1 - C_4 alchil și C_1 - C_4 haloalchil.

Oricare dintre grupele aril menționate mai sus (de ex. fenil, inclusiv grupele fenil din grupele benzil) pot fi opțional substituite cu 1 până la 3 substituenți selectați în mod independent, la fiecare apariție, din grupul constând din: halo, nitro, OR^a ; C_1 - C_4 -alchil, C_1 - C_4 haloalchil; unde R^a este selectat în mod independent, la fiecare apariție, dintre H, C_1 - C_4 alchil și C_1 - C_4 haloalchil.

Grupele aril au de la 6 la 20 de atomi de carbon, după caz, pentru a îndeplini cerințele de valență. Grupele aril sunt grupe carbociclice care satisfac regula Huckel (i.e. conțin un sistem carbociclic cuprinzând $2(2n + 1)\pi$ electroni). Grupele aril pot fi grupe fenil opțional substituite, grupe bifenil opțional substituite, grupe naftalenil opțional substituite sau grupe antracenil opțional substituite. În mod egal, grupele aril pot include porțiuni carbociclice nearomate. De preferință o grupă aril este o grupă fenil opțional substituită.

Grupele alchil pot fi liniare sau ramificate. Astfel, de exemplu, o grupă C_4 alchil poate fi *n*-butil, *i*-butil sau *t*-butil.

Etapă d) se poate efectua într-un solvent organic (S1). Solvenții organici includ nelimitativ eteri (de ex. tetrahidrofuran, dioxan, dietil eter); cetone (de ex. acetonă și metil izobutil cetonă); solvenți halogenați (de ex. diclorometan, cloroform și 1,2-dicloroetan); și amide (de ex. DMF, NMP); sau amestecuri ale acestora. Acolo unde etapa d) se efectuează în prezența unui reactiv Grignard, solventul organic este de preferință un eter. Cel mai preferabil, solventul este tetrahidrofuran.

Acolo unde etapa d) se efectuează în prezența unei baze de azot, solventul organic este cel mai preferabil un solvent halogenat sau o amidă.

Reacția se efectuează în mod tipic la o temperatură adecvată, de ex. de la circa -5°C la circa 40°C . De preferință, temperatura reacției este circa 25°C până la circa 30°C . Reacția poate fi lăsată să se agite o perioadă de la circa 15 min până la circa 16 h și de preferință de la circa 30 min până la circa -60 min.

Stratul organic rezultat care conține fosforamidatul protejat din Formula II poate fi procesat direct în același vas de reacție pentru a forma gemcitabin-[fenil(benzoxi-L-Alaninil)] fosfat din Formula I. Alternativ, solventul din stratul organic poate fi concentrat pentru a obține un reziduu de produs brut prin orice metodă cunoscută în domeniu, la încheierea reacției, de exemplu distilare, evaporare, uscare rotativă (cum ar fi cu evaporatorul rotativ Buchi), liofilizare, uscare în strat fluidizat, uscare rapidă, uscare rapidă cu centrifugare. De preferință solventul se îndepărtează prin distilare în vid.

Procesele din invenție pot cuprinde de asemenea deproteizarea grupelor protectoare hidroxi și amino.

Etapă de deprotezare (etapa e)) se poate efectua fără purificarea produsului din etapa d).

Acolo unde o grupă protectoare este sensibilă la acid, de ex. tritil, $\text{C}(\text{O})\text{OtBu}$, MOM, MEM, 2,4-dimetoxibenzil, 2,3-dimetoxibenzil, etapa de deprotezare se poate efectua folosind un acid adecvat. Acidul poate fi un acid Bronsted (de ex. TFA, acid fosforic, HCl sau acid formic) sau un acid Lewis (de ex. ZnBr_2 , CeCl_3). Acizii Lewis (de ex. ZnBr_2) sunt mai puțin preferați. HCl este de asemenea mai puțin preferat. De preferință, acidul este TFA.

Acolo unde o grupă protectoare este sensibilă la baze, de ex. acetyl, benzoil, etapa de deprotezare se poate efectua folosind o bază adecvată, de ex. NH_3 apos sau NaOH apos. Grupele sensibile la baze pot fi mai puțin preferate.

Acolo unde o grupă protectoare este o grupă silil (de ex. trietilsilil sau *t*-butildimetilsilil), etapa de deprotezare se poate efectua folosind un acid adecvat (de ex., TFA) sau folosind o sursă de fluor adecvată (de ex. fluorură de tetrabutilamoniu, acid fluorosilicic, HF).

Acolo unde o grupă protectoare este o grupă benzil sau $\text{C}(\text{O})\text{Obenzil}$, etapa de deprotezare se poate efectua folosind H_2 și un catalizator adecvat (de ex. Pd/C). Aceste grupe protectoare pot fi mai puțin preferate.

Acolo unde o grupă protectoare este 4-metoxi benzil, 2,3-dimetoxibenzil, 2,4-dimetoxibenzil sau $\text{C}(\text{O})\text{O}$ -(4-metoxibenzil), etapa de deprotezare poate fi efectuată folosind un agent de oxidare corespunzător (de ex. acid meta-cloroperbenzoic).

Acolo unde o grupă protectoare este $-\text{C}(\text{O})-\text{O}$ -alil, etapa de deprotezare se poate efectua folosind $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$.

Acolo unde o grupă protectoare este $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2$ -fluorenil, etapa de deprotezare se poate efectua folosind piperidină.

Acolo unde P^1 este $C(O)OtBu$, deprotejarea se poate realiza folosind un C_1 - C_4 -alcool și/sau apă. Acolo unde P^1 este $C(O)OtBu$, deprotejarea se poate realiza folosind un amestec de C_1 - C_4 -alcool și apă. Deprotejarea se poate realiza folosind un amestec de alcool izopropilic (IPA) și apă.

- 5 Etapa de deprotejare se poate efectua într-un solvent organic sau un amestec al acestora. Solvenții organici exemplificativi includ, nelimitativ, solvenți halogenați (de ex. diclorometan, cloroform, dicloroetan); alcooli (de ex. metanol, etanol, izopropanol) și eteri (de ex. tetrahidrofuran, dietil eter).

Acolo unde etapa de deprotejare se efectuează în prezența unui acid (de ex. TFA), solventul organic este de preferință un solvent halogenat, de ex. diclorometan.

- 10 Reacția de deprotejare se poate efectua la o temperatură, de exemplu, în intervalul -10°C până la circa 30°C , de ex. până la circa 10°C . O temperatură convenabilă pentru efectuarea reacției este -5°C până la 5°C . reacția poate fi lăsată să se agite o perioadă de la circa 15 min până la circa 16 ore și de preferință de la circa 1 oră până la circa 4 ore, mai preferabil de la circa 2 ore până la circa 3 ore.

- 15 Acolo unde etapa e) se realizează folosind un C_1 - C_4 -alcool și/sau apă (de ex. un amestec de alcool izopropilic (IPA) și apă), amestecul de reacție se poate încălzi, de ex. la o temperatură de la 30°C la 90°C sau la o temperatură de la 60°C la 85°C .

Acolo unde deprotejarea se efectuează în prezența unui acid (de ex. TFA), izolarea produsului obținut după deprotejare se realizează în mod tipic prin stingerea surplusului de acid folosit în etapa de deprotejare și extragerea produsului cu un solvent organic imiscibil în apă și recuperarea produsului prin evaporarea solventului organic.

- 20 Exemplele de solvenți organici imiscibili în apă utili în extragere includ esteri cum ar fi acetat de etil, acetat de metil, acetat de izopropil etc.; solvenți clorurați cum ar fi diclorometan, cloroform etc.; solvenți de hidrocarburi aromatice cum ar fi toluen, xilen etc.; de preferință acetat de etil.

P^1 și P^2 pot reprezenta ambele grupe $C(O)OtBu$ și P^3 poate fi hidrogen, etapa d) se poate efectua în prezența $tBuMgCl$ (de ex. în THF) și etapa e) se poate efectua în TFA (de ex. în DCM).

- 25 P^1 poate fi o grupă $C(O)OtBu$, P^2 și P^3 pot reprezenta fiecare hidrogen, etapa d) se poate efectua în prezența $tBuMgCl$ (de ex. în THF). Etapa e) se efectuează fără izolarea produsului din etapa d), de ex. adăugând un amestec de IPA și apă în amestecul de reacție de la etapa d) după încheierea reacției din etapa d).

- 30 În anumite aplicări, poate fi încă dezirabilă purificarea gemcitabin-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfatului obținut din procesul conform primului aspect al invenției. În mod similar, poate fi încă dezirabilă purificarea compusului din Formula II obținut din procesul conform celui de-al doilea aspect al invenției. Metodele de purificare sunt bine cunoscute în domeniu și includ cromatografie (de ex. cromatografie în coloană), recristalizare și distilare. În alte aplicări, nu este necesară purificarea.

În cadrul prezentei specificații se folosesc următoarele abrevieri:

35

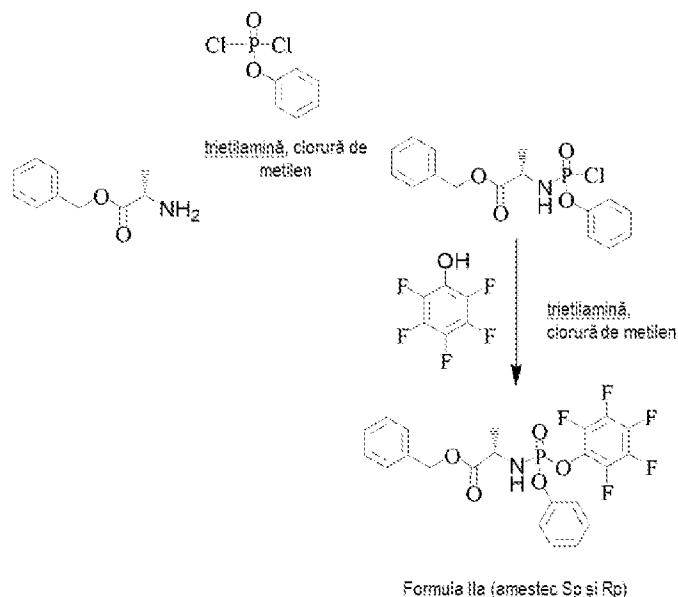
DCM - diclorometan	DIPE - diizopropileter
DMF - <i>N,N</i> -dimetilformamidă	DMSO - dimetilsulfoxid
IPA - alcool izopropilic	MTBE - metil- <i>t</i> -butileter
NMP - <i>N</i> -metilpirolidinonă	TBDMS - <i>tert</i> -butildimetilsilil
TEA - trietilamină	TFA - acid trifluoroacetic
THF - tetrahidrofuran	

EXEMPLE

Prezenta invenție este ilustrată în continuare prin următoarele exemple 3, 8 și 10, prezentate exclusiv ilustrativ și nelimitativ, fără a limita domeniul de aplicare al invenției definite în revendicările anexate.

- 40 **Exemplul de referință 1:**

Prepararea amestecului diastereoizomeric al esterului benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic (Formula IIa)



- Într-un amestec agitat de L-alanin benzil ester clorhidrat (100 gms) în clorură de metilen (1 lit) s-a adăugat fenil diclorofosfat (77 ml) la 25-35°C și amestecul rezultat s-a răcit la -70°C până la -78°C, s-a adăugat trietil amină (130.5 ml) și s-a agitat 1 h la aceeași temperatură. Temperatura masei de reacție a crescut la 25-35°C și s-a lăsat să se agite 2h. După încheierea reacției, masa reacției s-a concentrat în vid la sub 35°C pentru a obține reziduul. În reziduul obținut s-a adăugat diizopropil eter (2 lit) la 25-35°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. Masa reacției s-a filtrat și s-a spălat cu diizopropil eter (500 ml), după care concentratul a fost filtrat în vid la sub 35°C pentru a obține fenil-(benzoxi-L-alaninil)-fosforocloridat. Compusul obținut s-a dizolvat în clorură de metilen (1 lit) la 25-35°C și s-a răcit la -5°C până la -10°C. În masa de reacție s-au adăugat pentafluorofenol (85.5 gms), trietil amină (65.2 ml) la aceeași temperatură și s-au agitat 2h. După încheierea reacției, masa reacției s-a concentrat în vid la sub 35°C și s-a încărcat acetat de etil (1 lit) la 25-35°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. Solidele s-au filtrat și s-au spălat cu acetat de etil (1 lit). În filtrat s-au adăugat spălări cu apă (1 lit), 10% carbonat de sodiu (2x1 lit), soluție salină (1 lit) și stratul organic s-a uscat cu sulfat de sodiu anhidru, s-a concentrat în vid la 35-45°C pentru a obține amestecul diastereoizomeric al compusului din titlu ca un semi-solid alb.

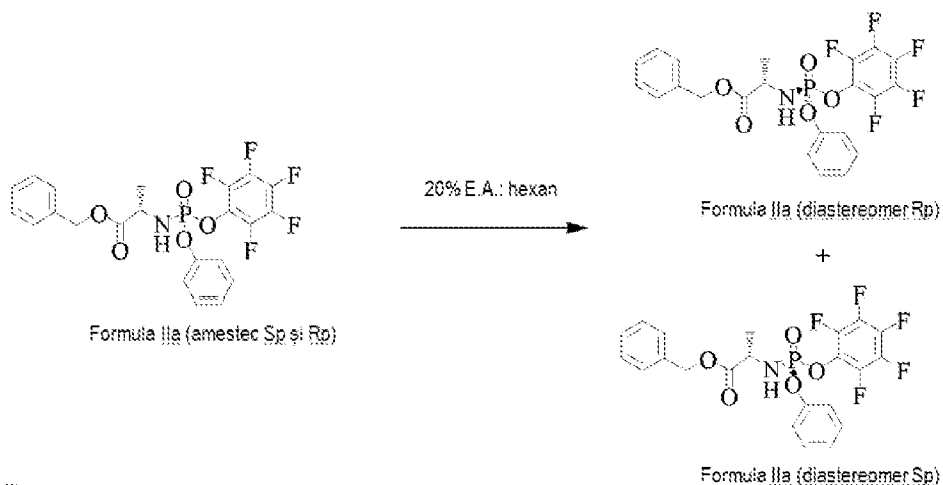
Randament: 210 gms

- Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 33.74:66.26% (R_p: S_p)

Exemplul de referință 2:

Separarea diastereoizomerului S_p al esterului benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic (Formula IIa)

25



În amestecul diastereoizomeric obținut mai sus din Formula IIa (R_P : S_P - 33.74:66.26%) s-a încărcat 20% acetat de etil în hexan (1.2 lit) la 25-35°C și s-a agitat 1 h. Solidele s-au filtrat și s-au spălat cu 20% acetat de etil în hexan (300 ml) pentru a obține un amestec al compusului din Formula IIa.

5 Randament: 112 gms

Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 22.13:77.87% (R_P : S_P)

Filtratul s-a concentrat în vid pentru a obține un amestec diastereoizomeric din Formula IIa (75 gm; R_P : S_P -65.43:34.57%).

10 În amestecul diastereoizomeric obținut mai sus din Formula IIa (R_P : S_P - 22.13:77.87%) s-a încărcat 20% acetat de etil în hexan (1.2 lit) la 25-35°C și s-a agitat 1 h. Solidele s-au filtrat și s-au spălat cu 20% acetat de etil în hexan (300 ml) pentru a obține un S_P -diastereoizomer pur al compusului din Formula IIa.

Randament: 80 gms

15 Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 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)

20 Filtratul s-a concentrat în vid pentru a obține un amestec diastereoizomeric din Formula IIa (28 gm; R_P : S_P -80.77:19.23%).

Exemplul 3:

Îzomerizarea esterului benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic (Formula IIa)

25 Într-o soluție agitată a esterului benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic obținut mai sus din Formula IIa (75 gms; R_P : S_P - 65.43:34.57%) în 20% acetat de etil în hexan (1.1 lit), s-a adăugat trietil amină (7.5ml) la 25-35°C și s-a agitat 6 h la aceeași temperatură. După încheierea reacției, masa reacției s-a stins cu apă (750 ml) și s-a extras cu acetat de etil (750 ml). Stratul organic s-a uscat cu sulfat de sodiu anhidru și s-a concentrat în vid pentru a obține compusul din titlu ca un solid.

30

Randament: 45 gms

Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 91.29: 8.71% (S_P : R_P)

35 Amestecul diastereoizomeric R_P și S_P obținut mai sus al esterului benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic din Formula IIa (45 gms; R_P : S_P - 8.71:91.29%) a fost suspendat în 20% acetat de etil în hexan (1.1 lit) la 25-30°C și s-a agitat 1 h la aceeași temperatură. Solidul s-a filtrat și s-a spălat cu 20% acetat de etil în hexan (225 ml) pentru a obține diastereoizomerul S_P al compusului din titlu ca un solid.

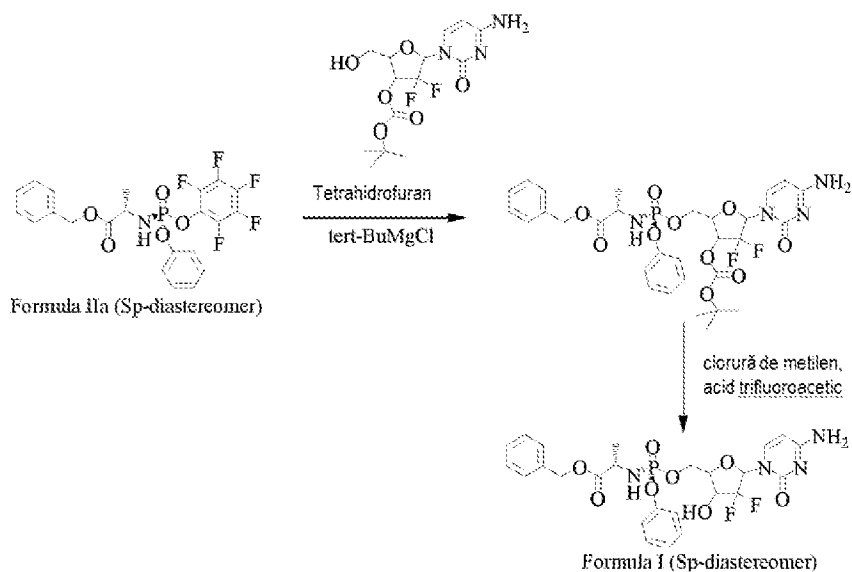
40 Randament: 19 gms

Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 99.92: 0.08% (S_P : R_P)

Exemplul de referință 4:

Prepararea diastereoizomerului S_P al NUC-1031 (folosind S_P -diastereoizomerul din Formula IIa)

45



Într-un amestec agitat de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonil) gemcitabină (5 gms) în tetrahidrofuran (75 ml), s-a adăugat clorură de *tert*-butil magneziu (15.2 ml de 2.0 M în tetrahidrofuran) și *S_p*-diastereoizomerul esterului benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic din Formula IIa (8.3 gms diluate în 50 ml de tetrahidrofuran)) la 0°C până la -5°C și temperatura a crescut la 25-30°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. După încheierea reacției, masa reacției s-a stins cu 0.5 N acid clorhidric (50 ml) și s-a extras cu acetat de etil (2x75 ml). În stratul organic s-au introdus succesiv spălări cu 10% carbonat de sodiu (2x50 ml), soluție salină (50 ml). Stratul organic s-a separat, s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a concentrat în vid pentru a obține un reziduu.

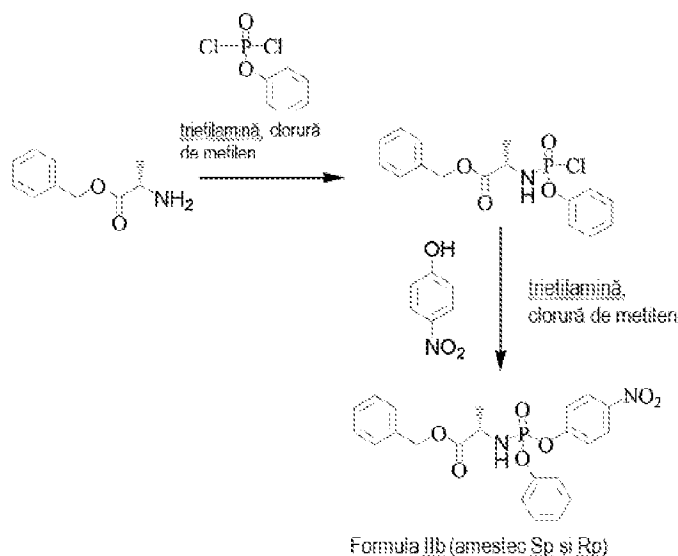
Reziduul obținut s-a introdus în clorură de metilen (50 ml) și s-a adăugat acid trifluoro acetic (18.5 ml) la 0°C până la 5°C. Masa reacției s-a menținut la 25-35°C timp de 2 h și s-a stins cu 20% soluție de carbonat de sodiu (125 ml). S-a extras cu acetat de etil (165 ml), stratul organic s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a evaporat în vid la 40-45°C. Reziduul obținut a fost suspendat în 50% acetat de etil în heptan (150 ml) pentru a obține compusul din titlu.

Randament: 4.8 gms

Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 99.4% (*Sp*-diastereoizomer)

Exemplul de referință 5:

Prepararea amestecului diastereoizomeric al esterului benzilic al acidului 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propionic din Formula IIb



Într-un amestec agitat de L-alanină benzil ester clorhidrat (50 gms) în clorură de metilen (500 ml) s-a adăugat fenil diclorofosfat (54 gms) la 25-35°C și amestecul rezultat s-a răcit la -70°C până la -78°C, s-a adăugat trietil amină (65.2 ml) și s-a agitat 1 h la aceeași temperatură. Temperatura masei de reacție a crescut la 25-35°C și s-a lăsat să se agite 2h. După încheierea reacției, masa reacției s-a concentrat în vid la sub 35°C pentru a obține reziduul. În reziduul obținut s-a adăugat diizopropil eter (1 litru) la 25-35°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. Masa reacției s-a filtrat și s-a spălat cu diizopropil eter (250 ml) după care concentratul a fost filtrat în vid la sub 35°C pentru a obține fenil-(benzoxi-L-alaninil)-fosforocloridat. Compusul obținut s-a dizolvat în clorură de metilen (500 ml) la 25-35°C și s-a răcit la -5°C până la -10°C. În masa de reacție s-au adăugat paranitrofenol (27.5 gms), trietil amină (65.2 ml) la aceeași temperatură și s-au agitat 2h. După încheierea reacției, masa reacției s-a concentrat în vid la sub 35°C și s-a încărcat acetat de etil (500 ml) la 25-35°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. Solidele s-au filtrat și s-au spălat cu acetat de etil (500 ml). În filtrat s-au adăugat spălări cu apă (500 ml), 10% carbonat de sodiu (2x500 ml), soluție salină (500 ml) și stratul organic s-a uscat cu sulfat de sodiu anhidru, s-a concentrat în vid la 35-40°C pentru a obține amestecul diastereoizomeric al compusului din titlu ca un lichid uleios gros.

Randament: 90 gms

Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 45.6: 54.94% (R_p: S_p)

Amestecul diastereoizomeric obținut mai sus al esterului benzilic al acidului 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propionic din Formula IIb (40 gms; R_p: S_p- 45.6: 54.94%) s-a separat în diastereoizomeri S_p și R_p puri prin HPLC preparativă și fracțiunile pure s-au concentrat în vid pentru a obține diastereoizomerii S_p și R_p separat.

Randament: S_p-diastereoizomer: 8 gms,

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)

R_p-diastereoizomer: 6 gms,

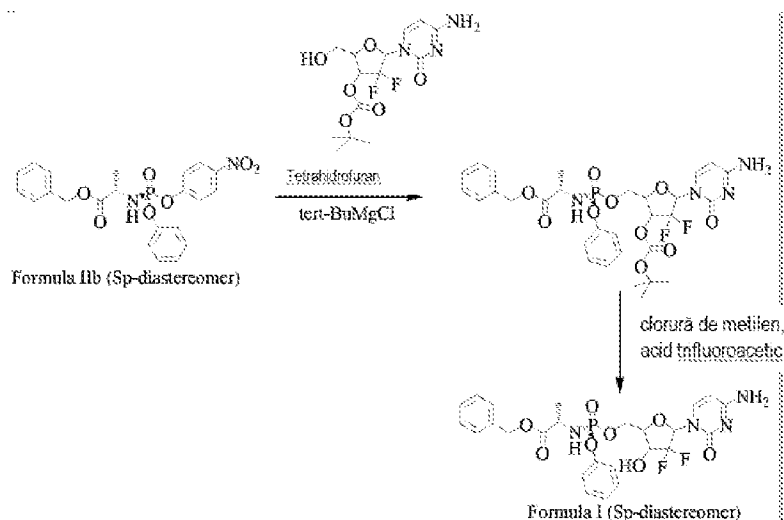
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): - 8.08-8.13(d, 2H), 7.15-7.34(m, 12H), 5.10(s, 2H), 4.48-4.56(m, 1H), 4.11-4.20(m, 1H), 1.39-1.41 (d, 3H)

ESI-MS (m/z):-457 (M+1)⁺

Amestec diastereoizomeri S_p & R_p: 20 gms

Exemplul de referință 6:

Prepararea diastereoizomerului S_p al NUC-1031 (folosind diastereoizomerul S_p din Formula IIb)



Într-un amestec agitat de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonil) gemcitabină (2 gms) în tetrahidrofuran (30 ml) s-au adăugat N-metil piridină (2 ml), clorură de *tert*-butil magneziu (5.5 ml de 2.0 M în tetrahidrofuran) și diastereoizomerul S_p al esterului benzilic al acidului 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propionic din Formula IIb (4 gms diluate în 20 ml de tetrahidrofuran) la 0°C până la -5°C și temperatura a crescut la 25-30°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. După încheierea reacției, masa reacției s-a stins cu 0.5 N acid clorhidric (20 ml) și s-a extras cu acetat de etil (2x30 ml). În stratul

organic s-au introdus succesiv spălări cu 10% carbonat de sodiu (2x20 ml), soluție salină (20 ml). Stratul organic s-a separat, s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a concentrat în vid pentru a obține un reziduu.

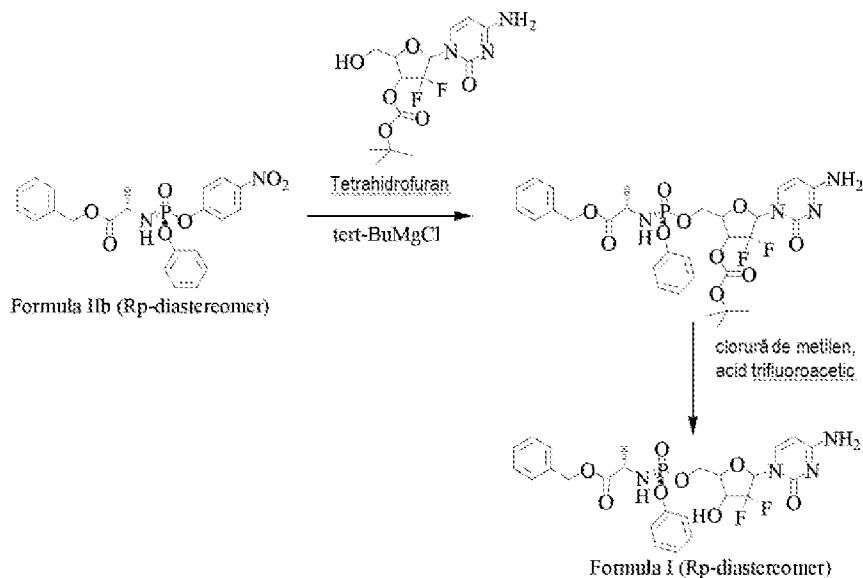
Reziduul obținut s-a introdus în clorură de metilen (20 ml) și s-a adăugat acid trifluoro acetic (7.4 ml) la 0°C până la 5°C. Masa reacției s-a menținut la 25-35°C timp de 2 h și s-a stins cu 20% soluție de carbonat de sodiu (30 ml). S-a extras cu acetat de etil (66 ml), stratul organic s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a evaporat în vid la 40-45°C. Reziduul obținut (3 gms; S_p - 85.98%) a fost purificat prin cromatografie în coloană prin eluare cu 2-10% izopropanol în clorură de metilen. Frațiunile conținând produsul au fost colectate și concentrate în vid pentru a obține compusul din titlu ca un solid.

Randament: 1.1 gms

Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 97.88: 0.48% (S_p : R_p)

Exemplul comparativ 7:

Prepararea diastereoisomerului R_p al gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfatului din Formula I (folosind diastereoizomerul R_p din Formula IIb)



Într-un amestec agitat de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonil) gemcitabină (2 gms) în tetrahidrofuran (30 ml), s-au adăugat N-metil piridină (2 ml), clorură de *tert*-butil magneziu (5.5 ml de 2.0 M în tetrahidrofuran) și R_p -diastereoizomerul esterului benzilic al acidului 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propionic din Formula IIb (4 gms diluate în 20 ml de tetrahidrofuran) la 0°C până la -5°C și temperatura a crescut la 25-30°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. După încheierea reacției, masa reacției s-a stins cu 0.5 N acid clorhidric (20 ml) și s-a extras cu acetat de etil (2x30 ml). În stratul organic s-au introdus succesiv spălări cu 10% carbonat de sodiu (2x20 ml), soluție salină (20 ml). Stratul organic s-a separat, s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a concentrat în vid pentru a obține un reziduu.

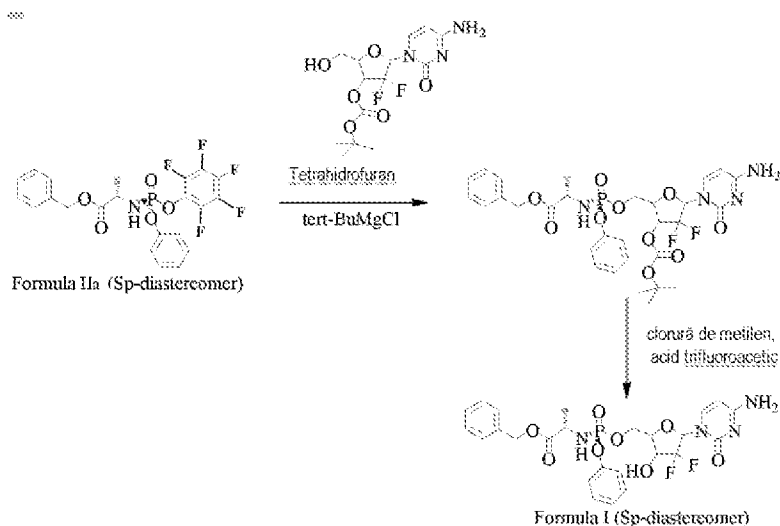
Reziduul obținut s-a introdus în clorură de metilen (20 ml) și s-a adăugat acid trifluoro acetic (7.4 ml) la 0°C până la 5°C. Masa reacției s-a menținut la 25-35°C timp de 2 h și s-a stins cu 20% soluție de carbonat de sodiu (30 ml). S-a extras cu acetat de etil (66 ml), stratul organic s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a evaporat în vid la 40-45°C. Reziduul obținut (2.9 gms; R_p -84.05%) a fost purificat prin cromatografie în coloană prin eluare cu 2-10% izopropanol în clorură de metilen. Frațiunile conținând produsul au fost colectate și concentrate în vid pentru a obține compusul din titlu ca un solid.

Randament: 1.4 gms

Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 97.99: 0.86% (R_p : S_p)

Exemplul 8:

Prepararea diastereoizomerului S_p al gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfatului din Formula I (folosind diastereoizomerul S_p izomerizat din Formula IIa din exemplul 3)



- Într-un amestec agitat de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonil) gemcitabină (5 gms) în tetrahidrofuran (75 ml), s-au adăugat clorură de *tert*-butil magneziu (15.2 ml de 2.0 M în tetrahidrofuran) și S_p-diastereoizomerul esterului benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic din Formula IIa (8.3 gms din exemplul 3 (99.92%); diluate în 50 ml de tetrahidrofuran) la 0°C până la -5°C și temperatura a crescut la 25-30°C și s-a agitat 30 min la aceeași temperatură. După încheierea reacției, masa reacției s-a stins cu 0.5 N acid clorhidric (50 ml) și s-a extras cu acetat de etil (2x75 ml). În stratul organic s-au introdus succesiv spălări cu 10% carbonat de sodiu (2x50 ml), soluție salină (50 ml). Stratul organic s-a separat, s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a concentrat în vid pentru a obține un reziduu.

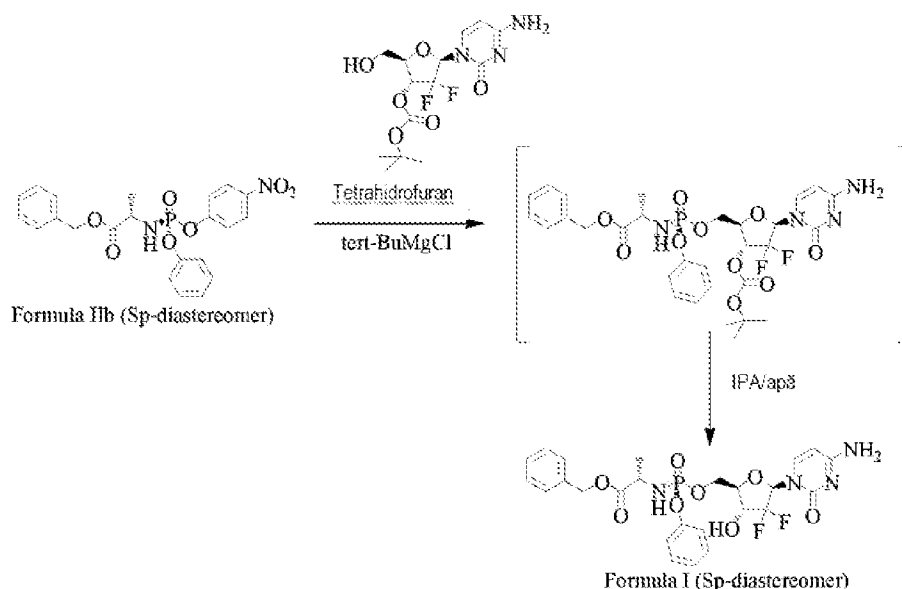
- Reziduul obținut s-a introdus în clorură de metilen (50 ml) și s-a adăugat acid trifluoro acetic (18.5 ml) la 0°C până la 5°C. Masa reacției s-a menținut la 25-35°C timp de 2 h și s-a stins cu 20% soluție de carbonat de sodiu (125 ml). S-a extras cu acetat de etil (165 ml), stratul organic s-a uscat cu sulfat de sodiu și s-a evaporat în vid la 40-45°C. Reziduul obținut a fost suspendat în 50% acetat de etil în heptan (150 ml) pentru a obține compusul din titlu.

Randament: 4.9 gms

- Puritate chirală prin HPLC (% suprafață): 99.72% (Sp-diastereoizomer)

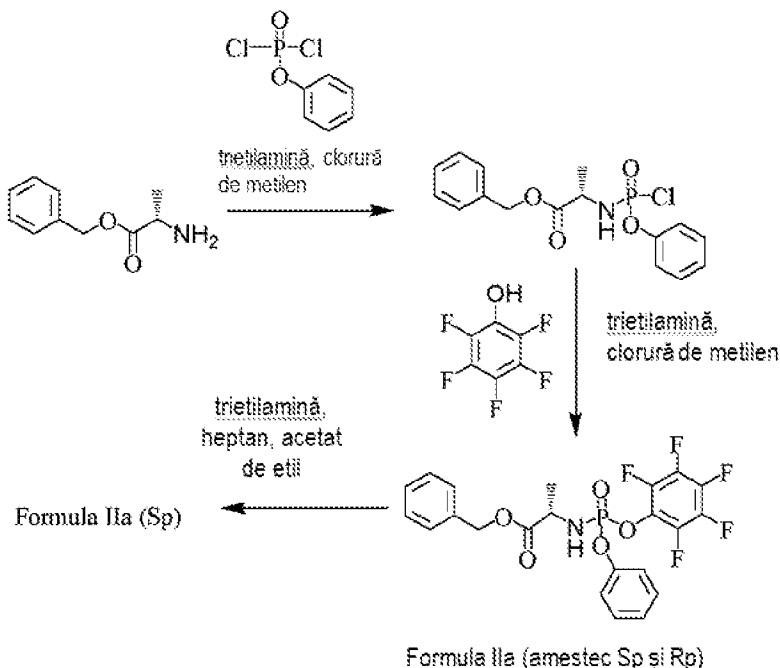
Exemplul de referință 9:

Prepararea diastereoizomerului S_p al NUC-1031 (folosind diastereoizomerul S_p din Formula IIb) folosind IPA/apă pentru deprotejare



Într-un amestec agitat de 3'-O-(*tert*-butoxicarbonil) gemcitabină (100 gms) în tetrahidrofuran (1 L), s-au adăugat clorură de *tert*-butil magneziu (292 mL de 2.0 M în tetrahidrofuran) și S_p-diastereoizomerul esterului benzilic al acidului 2-[(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propionic din Formula IIb (166 gms diluate în 700 mL de tetrahidrofuran) la -5°C până la -0°C și temperatura a crescut la 25-30°C și s-a agitat 3 h la aceeași temperatură. După încheierea reacției, masa reacției s-a stins cu 0.5 N acid clorhidric (1 L) și s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic s-a spălat succesiv cu 10% carbonat de sodiu, apă și soluție salină. Stratul organic s-a separat și s-a concentrat in vid pentru a obține un reziduu. S-au adăugat alcool izopropilic (IPA; 850 mL) și apă (2.5 L) în reziduu și amestecul s-a încălzit la 75°C timp de 3h înainte să se adauge mai multă apă (2.5 L) și amestecul s-a răcit la 25°C și s-a filtrat. Solidul rezultat s-a spălat cu acetat de etil și s-a uscat. S-au obținut 124 g de produs (78%). Purity chirală prin HPLC (% suprafață): 99.95% (S_p-diastereoizomer).

Exemplul 10 - Prepararea (S_p)-esterul benzilic al acidului 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforil amino] propionic (Formula IIa)



15

Într-un amestec agitat de L-Alanină benzil ester. HCl (100 g) în 1000 mL de diclorură de metilen s-a adăugat fenil diclorofosfat (97.8 g) în masa reacției la 30°C. Amestecul s-a răcit la -20°C și s-a adăugat încet trietilamină (93.8 g), menținând temperatura la -20°C.

Reacția s-a agitat 1h la -20°C, apoi s-a încălzit la 10°C (10±5) și s-a agitat încă 1.5 h.

S-a adăugat încet o soluție de pentafluorofenol (85.3 g) în 100 mL de diclorură de metilen la 10°C, urmată de trimetilamină (46.8 g) care s-a adăugat încet, menținând temperatura la 10°C. Se adaugă încet 46.9 g de trietilamină în masa reacției la 10°C (10±5) în atmosferă de azot. Amestecul s-a agitat 2 h la 10°C înaintea stingerii prin adăugarea lentă a 0.5 N soluție de HCl, menținând temperatura la 10°C. După încălzire la temperatura camerei, amestecul s-a separat și stratul organic s-a spălat cu o soluție saturată de bicarbonat, apă distilată și soluție salină înaintea concentrării *in vacuo*.

Amestecul brut s-a suspendat în 1500 mL de 20% acetat de etil în n-heptan la 25°C. S-a adăugat trietilamină (12.2 g) și amestecul s-a agitat la 25°. Amestecul a fost filtrat și solidul a fost dizolvat în 2500 mL acetat de etil, care s-a spălat cu apă și soluție salină și s-a concentrat in vacuo. Solidul a fost suspendat în 1200 mL de 20% acetat de etil în n-heptan, s-a agitat 45-60 min și s-a filtrat. Materialul s-a uscat in vid pentru a furniza produsul dorit. Randamentele sunt în intervalul 40 până la 80% și puritatea diastereoizomerică este peste 99%.

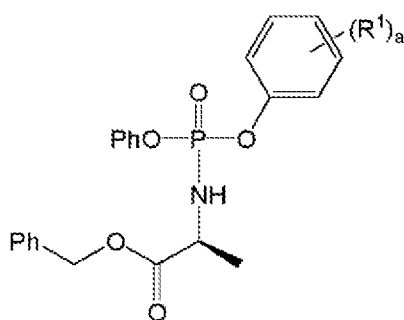
30

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- MAGDALENA SLUSARCZYK ET AL: "Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 57, no. 4, 27 February 2014 (2014-02-27), pages 1531-1542, XP055205033, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm401853a
- WO-A1-2014/076490
- WO-A1-2016/030335
- BRUCE S. ROSS ET AL: "Synthesis of Diastereomerically Pure Nucleotide Phosphoramidates", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 76, no. 20, 21 October 2011 (2011-10-21), pages 8311-8319, XP055137289, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo201492m
- WO-A2-2011/123645

(57) Revendicări:

1. Un proces de îmbogățire diastereoizomerică a unui compus din Formula II;



Formula II

unde R^1 reprezintă o grupă de retragere a electronilor și a este un număr întreg de la 1 la 5, procesul cuprinzând:

- a) suspensia sau dizolvarea diastereoizomerului R al compusului din Formula II; sau a unui amestec al diastereoizomerilor (R) și (S) ai compusului din Formula II într-un solvent (S2);
- b) tratarea soluției sau suspensiei cu o bază aminică organică sau anorganică (B2) pentru a obține diastereoizomerul (S) în formă în mare măsură diastereomeric pură; și
- c) izolarea diastereoizomerului (S) din Formula II.

2. Un proces conform revendicării 1, unde procesul mai cuprinde:

formarea compusului din Formula II ca un amestec al diastereoizomerilor (R) și (S); și

unde etapa a) cuprinde suspensia sau dizolvarea amestecului diastereoizomerilor (R) și (S) ai compusului din Formula II într-un solvent (S2).

3. Un proces conform revendicării 1 sau 2, unde B2 este o bază aminică organică.

4. Un proces conform revendicării 3, unde baza aminică organică este o bază aminică organică, secundară, terțiară sau ciclică; de preferință unde baza aminică organică este trietilamină.

5. Un proces conform revendicării 3, unde o bază aminică organică este un N-alchilimidazol, imidazol, piridină opțional substituită sau trialchilamină.

6. Un proces conform revendicării 1 sau 2, unde B2 este o bază anorganică; de preferință unde baza anorganică este un hidroxid de metal alcalin, carbonat de metal alcalin, alcoxid de metal alcalin sau ariloxid de metal alcalin.

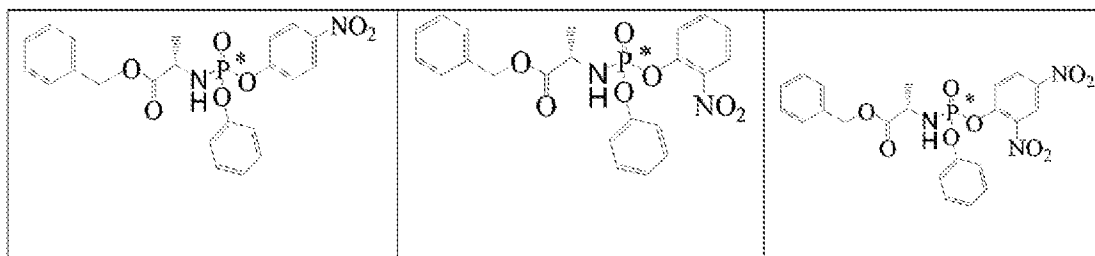
7. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 1 la 6, unde S2 este o hidrocarbură sau un amestec cuprinzând o hidrocarbură.

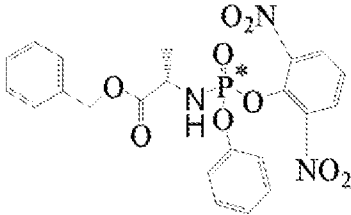
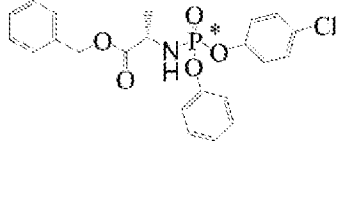
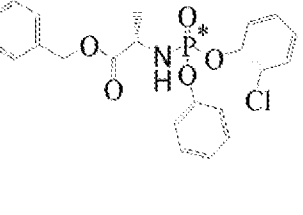
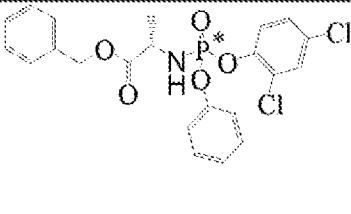
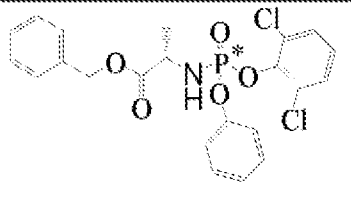
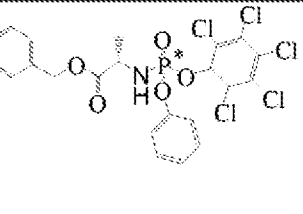
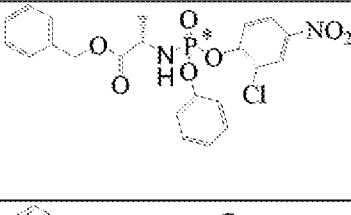
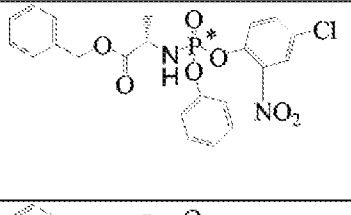
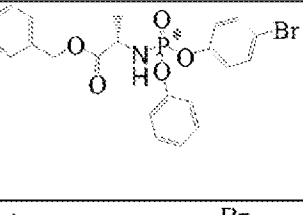
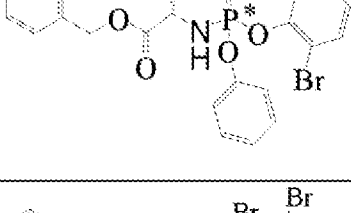
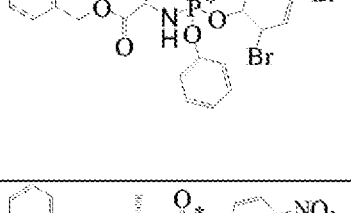
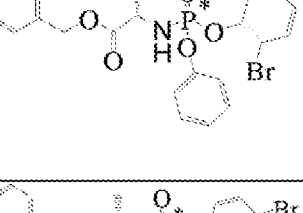
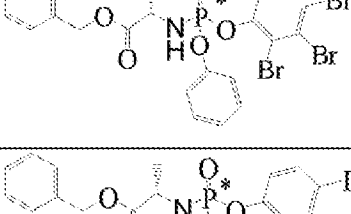
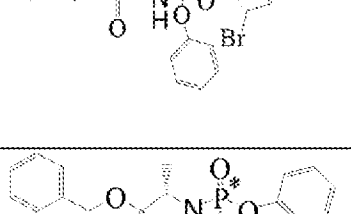
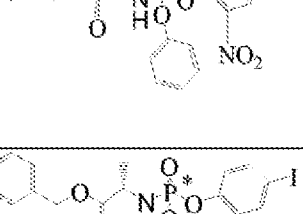
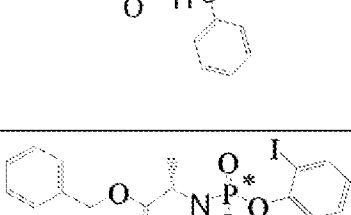
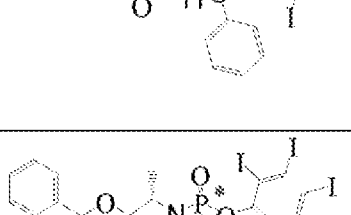
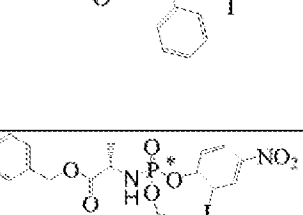
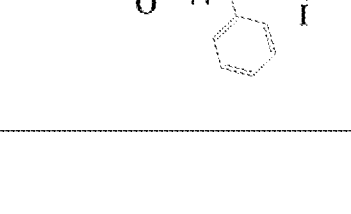
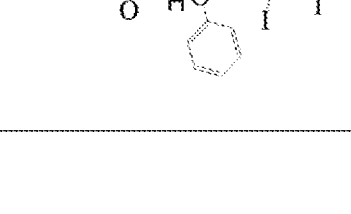
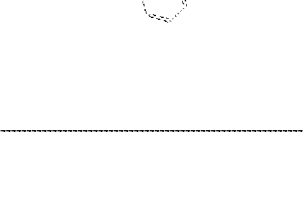
8. Un proces conform revendicării 7, unde S2 este hexan sau heptan; sau unde S2 este un amestec de hexan sau heptan și un solvent organic polar, amestecul cuprinzând peste 50% din volum

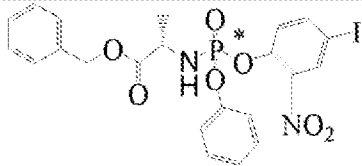
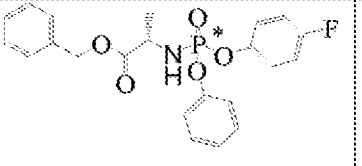
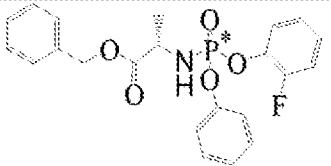
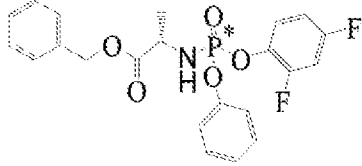
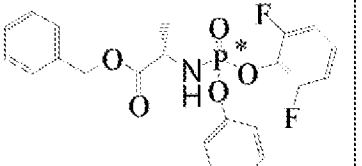
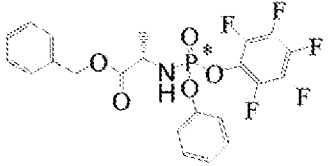
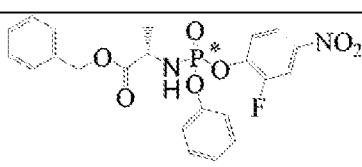
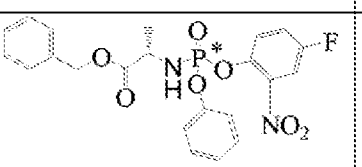
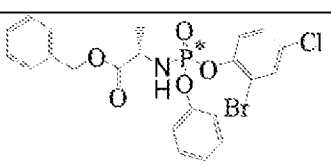
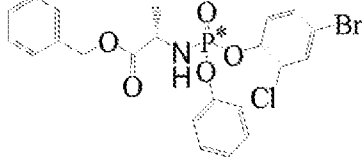
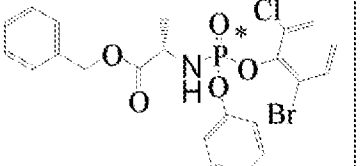
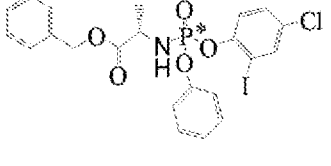
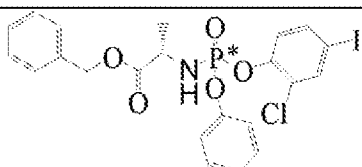
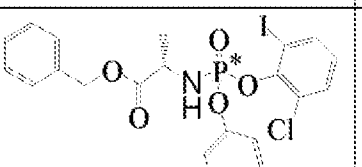
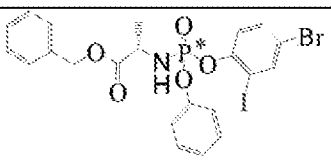
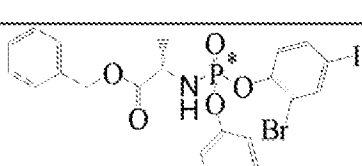
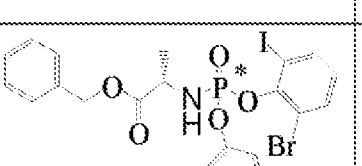
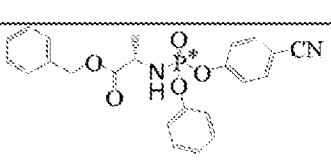
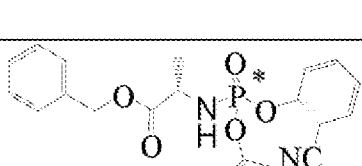
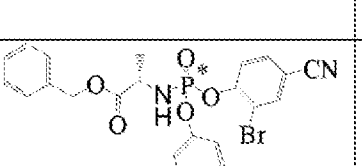
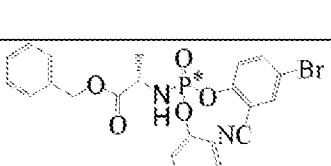
hexan sau heptan; de preferință unde S2 este un amestec de heptan sau hexan și acetat de etil, amestecul cuprinzând peste 50% din volum heptan sau hexan.

9. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 1 la 8, unde etapa b) cuprinde agitarea amestecului de compus din Formula II și bază B2 timp de 6 h sau mai mult; și/sau unde etapa b) cuprinde agitarea amestecului de compus din Formula II și bază B2 la o temperatură de la 0 la 50°C.

10. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 1 la 9, unde compusul din Formula II este un compus selectat dintre:

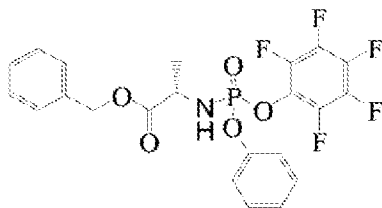


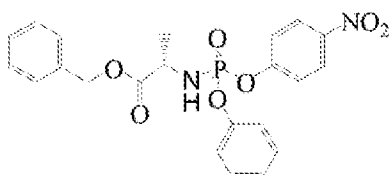
		
		
		
		
		
		
		

*represents the chiral center

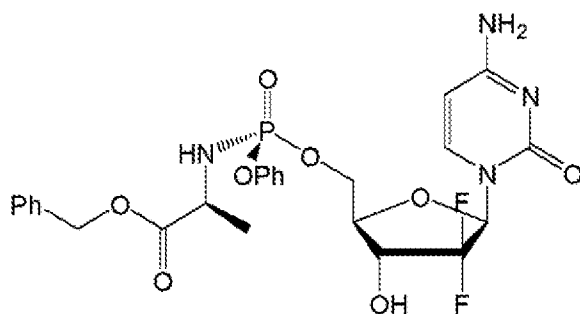
11. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 1 la 9, unde compusul din Formula II este:



12. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 1 la 9, unde compusul din Formula II este:



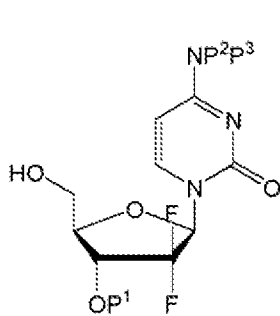
13. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 1 la 12, reprezentând un proces pentru prepararea diastereoizomerului (S) al gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfatului (Formula I) în formă în mare măsură diastereoizomeric pură:



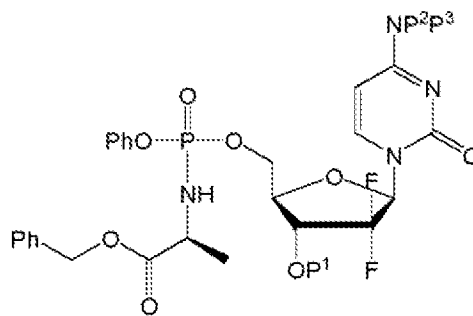
Formula I

procesul cuprinzând de asemenea etapa d) și opțional etapa e):

d) reacția unui compus al diastereoizomerului (S) din Formula II obținut în etapa c) cu un compus din Formula III în prezența unei baze (B1) pentru a obține un compus din Formula IV în formă în mare măsură diastereoizomeric pură; unde P¹, P² și P³ reprezintă în mod independent hidrogen sau o grupă protectoare; și unde compusul din Formula II este în formă în mare măsură diastereoizomeric pură:



Formula III



Formula IV

și

e) unde oricare una sau mai multe dintre P^1 , P^2 și P^3 reprezintă grupe protectoare, opțional îndepărtarea grupelor protectoare P^1 , P^2 și P^3 din compusul din Formula IV pentru a furniza (S)-gemcitabin-[fenil (benzoxi-L-alaninil)] fosfatul în formă în mare măsură diastereomeric pură.

14. Un proces conform revendicării 13, unde P^1 este $-C(O)OC_1-C_6$ -alchil sau $-C(O)OCH_2$ -aril opțional substituit; de preferință unde P^1 este $-C(O)O^tBu$; și de preferință unde etapa e) se realizează prin reacția produsului din etapa d) cu un amestec de C_1-C_4 -alcool și apă.

15. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 13 la 14, unde P^2 este H; și/sau unde P^3 este H.

16. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 13 la 15, unde B1 este un reactiv Grignard; de preferință unde B1 este tBuMgCl .

17. Un proces conform oricăreia din revendicările de la 13 la 16, unde etapa d) se realizează într-un solvent eter; de preferință unde etapa d) se realizează în THF.