

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 038658

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.09.30

(51) Int. Cl. C07H 1/00 (2006.01)  
C07H 19/06 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201891391

(22) Дата подачи заявки  
2016.12.09

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОЛЕКАРСТВА ГЕМЦИТАБИНА NUC-1031  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИАСТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОГО ОБОГАЩЕНИЯ  
ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФОСФАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

(31) 6635/CHE/2015; 1602185.9

(32) 2015.12.11; 2016.02.08

(33) IN; GB

(43) 2019.02.28

(86) PCT/GB2016/053875

(87) WO 2017/098252 2017.06.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
НУКАНА ПиЭлСи (GB); ЛАУРУС  
ЛЭБЗ ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:  
Котала Мани Бушан, Даммалапати  
Венката Лакшми Нарасимха Рао (IN)

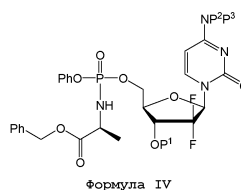
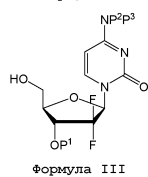
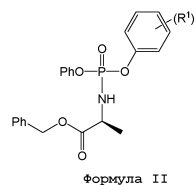
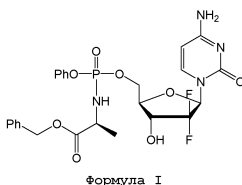
(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) 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, abstract, page 1532, right-hand  
column, line 16 - page 1533, left-hand column, line 3  
from the bottom; compounds 6a-6l  
WO-A1-2014076490

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, the whole  
document

WO-A2-2011123645  
WO-A1-2016030335

(57) Настоящее изобретение предоставляет способ получения ( $S_p$ )-диастереоизомера гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата формулы I, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%, включающий диастереоизомерное обогащение соединения формулы II с последующей обработкой соединения формулы II соединением формулы III в присутствии основания с получением соединения формулы IV и, в случае необходимости, удаление защитных групп  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  из соединения формулы IV.



B1

038658

038658

B1

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в основном относится к новому способу получения гемцитабин[фенилбензокси-L-аланинил]фосфата при использовании новых фосфорамидатных промежуточных соединений.

### Предпосылки создания изобретения

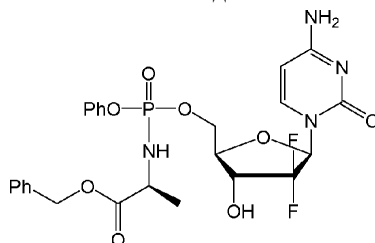
Ряд нуклеозидных аналогов, таких как цитарабин, флударабин, кладрибин, капецитабин, гемцитабин и пентостатин, клинически используются в качестве высокоэффективных антинеопластических средств. Среди них, гемцитабин (2',2'-дифтор-2'-дезоксцитидин; доступный на рынке как Gemzar™) представляет особый интерес из-за своей уникальной активности против солидных опухолей. В настоящее время он утвержден для лечения рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких, рака яичников и рака поджелудочной железы и широко применяется при лечении других различных типов рака, включая рак мочевого пузыря, рак желчных протоков, колоректальный рак и лимфому.

Ответственным за активность гемцитабина против солидных опухолей, как полагают, являются несколько самопотенцируемых механизмов, уникальных для данного нуклеозидного аналога. Дифосфатный метаболит гемцитабина ингибирует рибонуклеотид-редуктазу, что приводит в результате к более низкой концентрации внутриклеточного дезоксицитидин-трифосфата (dCTP) и, таким образом, к увеличению включения метаболита гемцитабинтрифосфата в ДНК, что в результате приводит к ингибированию синтеза ДНК и блокирует завершение цикла клеточного деления. Кроме того, восстановление концентрации dCTP нормализует фермент цитидин-киназы, которая отвечает за первоначальное фосфорилирование гемцитабина, необходимая стадия в ингибировании синтеза ДНК лекарственным средством. Наконец, трифосфатный метаболит гемцитабина является ингибитором цитидин-деаминазы, которая отвечает за инактивацию гемцитабина путем преобразования в метаболит уридина. Соответственно добавление природы указанных выше факторов может объяснить эффективность гемцитабина в лечении солидных опухолей.

Благодаря липофильности ProTides, эти молекулы могут доставлять нуклеозидные монофосфаты непосредственно в неповрежденную опухолевую клетку. Предыдущие исследования характеризовались несколькими механизмами клеточного транспорта для аналогов нуклеозидных лекарственных средств и их производных (для обзора см. Balimane et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 1999, 39, 183-209). Относительно гидрофильное соединение гемцитабин обладает ограниченной способностью проникать через мембраны плазмы посредством пассивной диффузии, и несколько исследований продемонстрировали, что гемцитабин является субстратом для уравнивающих и концентрирующих нуклеозидных транспортеров (ENT и CNT соответственно). Более конкретно, гемцитабин транспортируется человеческим ENT1, ENT2, CNT1 и CNT3, но не пурин-селективным концентрирующим транспортером CNT2 (см. Mackey et al., *Cancer Res.* 1998, 58, 4349-4357; Mackey et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, 91, 1876-1881; и Fang et al., *Biochem. J.* 1996, 317, 457465).

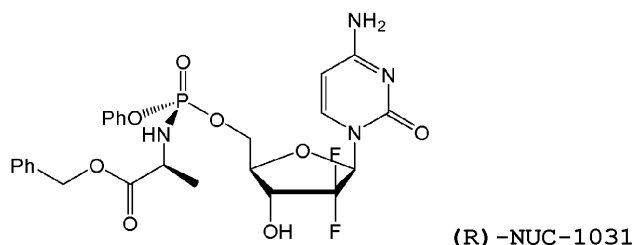
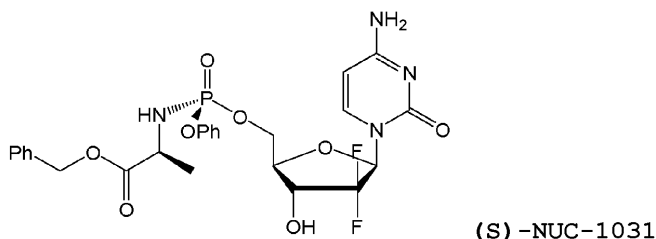
В патенте США 4808614 раскрыты 2,2'-дифторнуклеозиды, которые известны как антивирусные и противоопухолевые средства, в частности 2',2'-дифтор-2'-дезоксцитидин (широко известный как гемцитабин).

В патенте США 7951787 раскрыты фосфорамидатные производные нуклеозидов, такие как 2'-дезоксид-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфат (также называемый гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфатом или NUC-1031). Способы химического синтеза этих производных раскрыты в данном патенте путем взаимодействия гемцитабина или его структурных вариантов с диастереоизомерной смесью фосфорхлоридата, такого как фенил(бензокси-L-аланинил)фосфорхлоридат формулы II, в присутствии N-метилимидазола, с последующей очисткой продукта колоночной хроматографией, при элюировании смесью дихлорметан/метанол 95:5, что дает чистый продукт в виде белого пенообразного твердого вещества с очень низким выходом 16%.



NUC-1031

NUC-1031 обычно получают в виде смеси двух диастереоизомеров, эпимерных в центре фосфата. Диастереоизомеры NUC-1031 имеют следующие структуры:



NUC-1031 является чрезвычайно липофильным и, следовательно, плохо растворим в воде (по расчету: <0,1 мг/мл), и ионизируемые фрагменты имеют рассчитанное значение рK<sub>a</sub>, которое лежит вне диапазона значений pH, подходящих для парентерального введения. Его существенная нерастворимость в воде, независимо от содержания соли или pH, приводит к осложнениям при разработке составов для доставки соединения в достаточно высоких дозах для эффективного лечения. Он также приводит к осложнениям при разработке эффективных способов производства, которые дают возможность эффективно производить NUC-1031 без особых затрат.

Недавно было обнаружено, что (S)-эпимер гемцитабин[фенилбензоксид-L-аланинил]фосфата имеет достаточную растворимость в смесях целого ряда полярных органических растворителей с водой для приведения его в подходящее состояние для формулирования и введения в качестве терапевтического средства. Растворимость (R)-эпимера значительно ниже. В некоторых смесях растворителей разница в растворимости (S)-эпимера и (R)-эпимера является более чем 100-кратной. Поэтому ожидается, что могут быть разработаны клинически более эффективные, приемлемые и удобные для введения пациенту способы с использованием (S)-эпимера, чем с использованием эпимера (R) или смеси. Поэтому желательно добиться возможности получения гемцитабин[фенилбензоксид-L-аланинил]фосфата (S) по существу в диастереоизомерно чистой форме.

Низкая растворимость NUC-1031 во многих растворителях, особенно часто используемая при разделении соединений с помощью ВЭЖХ, означает, что потребуются большие объемы растворителя при разделении, основанном на ВЭЖХ. Это означает, что любой процесс разделения в промышленных масштабах, основанный на ВЭЖХ, будет дорогостоящим, с большим количеством потребляемой энергии и материалов, и будет источником большого количества отходов.

Хотя в момент подачи данной заявки считалось предпочтительным применение гемцитабин[фенилбензоксид-L-аланинил] фосфата в виде (S)-эпимера, также формулировалась причина необходимости получения (R)-эпимера в диастереоизомерно чистом виде. Это должно включать проведение сравнительных испытаний для преобразования (R)-эпимера в (S)-эпимер или обеспечение преимуществ (R)-эпимера над (S)-эпимером, которые перевешивают его низкую растворимость.

Действительно, было показано, что (R)-эпимер имеет период полувыведения при инкубации с изолированными печеночными клетками человека, который в четыре раза больше, чем у (S)-эпимера. Длительный период полувыведения, связанный с (R)-изомером, указывает на низкий внутренний клиренс и должен приводить к другому фармакокинетическому и фармакодинамическому профилю (S)-изомера, что может предложить некоторые преимущества.

Как (S)-, так и (R)-эпимеры являются терапевтически активными.

В WO 2014/076490 описан способ получения нуклеозидных пролекарств, таких как гемцитабин[фенил(бензоксид-L-аланинил)]фосфат, путем взаимодействия гемцитабина или его структурных вариантов с диастереоизомерной смесью фосфорхлоридатов в присутствии катализатора, содержащего металлическую соль, такую как Cu(OTf)<sub>2</sub>, CuCl, CuBr, CuI, Cu(OAc)<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Cu(OC(O)CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Me(OTf)<sub>3</sub>, Cu(OTf)<sub>2</sub>, Yb(OTf)<sub>3</sub>, Fe(OTf)<sub>3</sub>, La(OTf)<sub>3</sub>, с выходом 45%.

Задачей некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения является предоставление способа получения гемцитабин[фенилбензоксид-L-аланинил]-(S)-фосфата, по существу, в диастереоизомерно чистой форме.

Задачей некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения является предоставление способа получения гемцитабин[фенилбензоксид-L-аланинил]-(R)-фосфата, по существу, в диастереоизомерно чистой форме.

Задачей некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения является предоставление способа получения (S) и/или (R)-эпимера(ов), по существу, в диастереоизомерно чистой форме(ах), кото-

рый является масштабируемым, экономическим и/или эффективным, т.е. более масштабируемым, экономическим и/или эффективным, чем способы, основанные на ВЭЖХ. Таким образом, задачей некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения является предоставление способа получения (S) и/или (R)-эпимера(ов), по существу, в диастереоизомерно чистой форме(ах), который подходит для крупномасштабного производства.

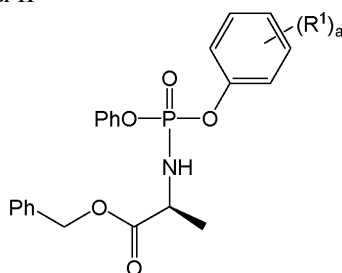
Задачей некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения является предоставление простого способа, т.е. способа, который включает минимальное число стадий процесса и/или реагентов для получения (S) и/или (R)-эпимера(ов), по существу, в диастереоизомерно чистой форме(ах).

Другой задачей некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения является предоставление способа, который обеспечивает выделение (S)- или (R)-эпимера, по существу, в диастереоизомерно чистой форме и в то же время удовлетворяет или превышает необходимые критерии, предусмотренные такими организациями как FDA США относительно количества и природы любых следов примесей, которые возникают при синтезе и разделении.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения удовлетворяют всем или некоторым из указанных выше целей.

### Сущность изобретения

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предоставлен способ диастереоизомерного обогащения соединения формулы II



Формула II,

включающий

а) суспендирование или растворение ( $R_p$ )-диастереоизомера соединения формулы II, где  $R^1$  представляет собой электроноакцепторную группу, и  $a$  равен целому числу от 1 до 5, или смеси ( $R_p$ )- и ( $S_p$ )-диастереоизомеров соединения формулы II в растворителе (S2);

б) обработку данного раствора или суспензии основанием (B2) с получением ( $S_p$ )-диастереоизомера, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%; где основание (B2) представляет собой органическое аминное основание или неорганическое основание, выбранное из группы, состоящей из гидроксида щелочного металла, карбонатов щелочных металлов, алкоксидов щелочных металлов, арилоксидов щелочных металлов;

с) выделение ( $S_p$ )-диастереоизомера формулы II, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%.

Таким образом, способом согласно первому аспекту является способ диастереоизомерного обогащения (S)-диастереоизомера NUC-1031, и соединение формулы II представляет собой (S)-диастереоизомер в диастереомерно обогащенной форме.

Способ по первому аспекту может дополнительно включать:

получение соединения формулы II в виде смеси ( $R_p$ )- и ( $S_p$ )-диастереоизомеров;

где стадия а) включает суспендирование или растворение смеси ( $R_p$ )- и ( $S_p$ )-диастереоизомеров соединения формулы II в растворителе (S2).

Органическое аминное основание B2 может представлять собой органический первичный, вторичный, третичный амин; в частности, органическое аминное основание может представлять собой триэтиламин. Также органическое аминное основание может представлять собой N-метилимидазол, имидазол, необязательно замещенный пиридин или триалкиламин.

Когда стадию а) согласно первому аспекту проводят в присутствии азотного основания, органическим растворителем более предпочтительно является галогенированный растворитель или амид.

Данную реакцию обычно проводят при подходящей температуре, например примерно от  $-5^{\circ}\text{C}$  до примерно  $40^{\circ}\text{C}$ . Предпочтительно реакционная температура составляет от около  $25^{\circ}\text{C}$  до примерно  $30^{\circ}\text{C}$ . Реакции дают перемешиваться в течение периода от около 15 мин до примерно 16 ч и предпочтительно примерно от 30 мин до примерно 60 мин.

Образовавшийся в результате органический слой, содержащий защищенный фосфорамидат формулы II, может быть обработан непосредственно в том же самом реакционном сосуде с образованием гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата формулы I.

Альтернативно по окончании реакции растворитель из органического слоя может быть концентрирован с получением остатка неочищенного продукта любым из способов, известных в данной области техники, например дистилляцией, упариванием, сушкой на роторном испарителе (таком как роторный испаритель Buchi), сушкой вымораживанием, сушкой в кипящем слое, распылительной сушкой, спино-

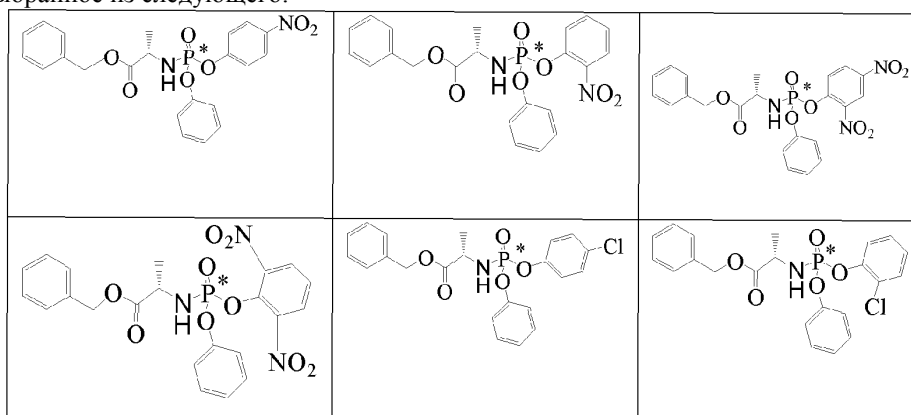
вой распылительной сушкой, предпочтительно растворитель удаляют отгонкой в вакууме.

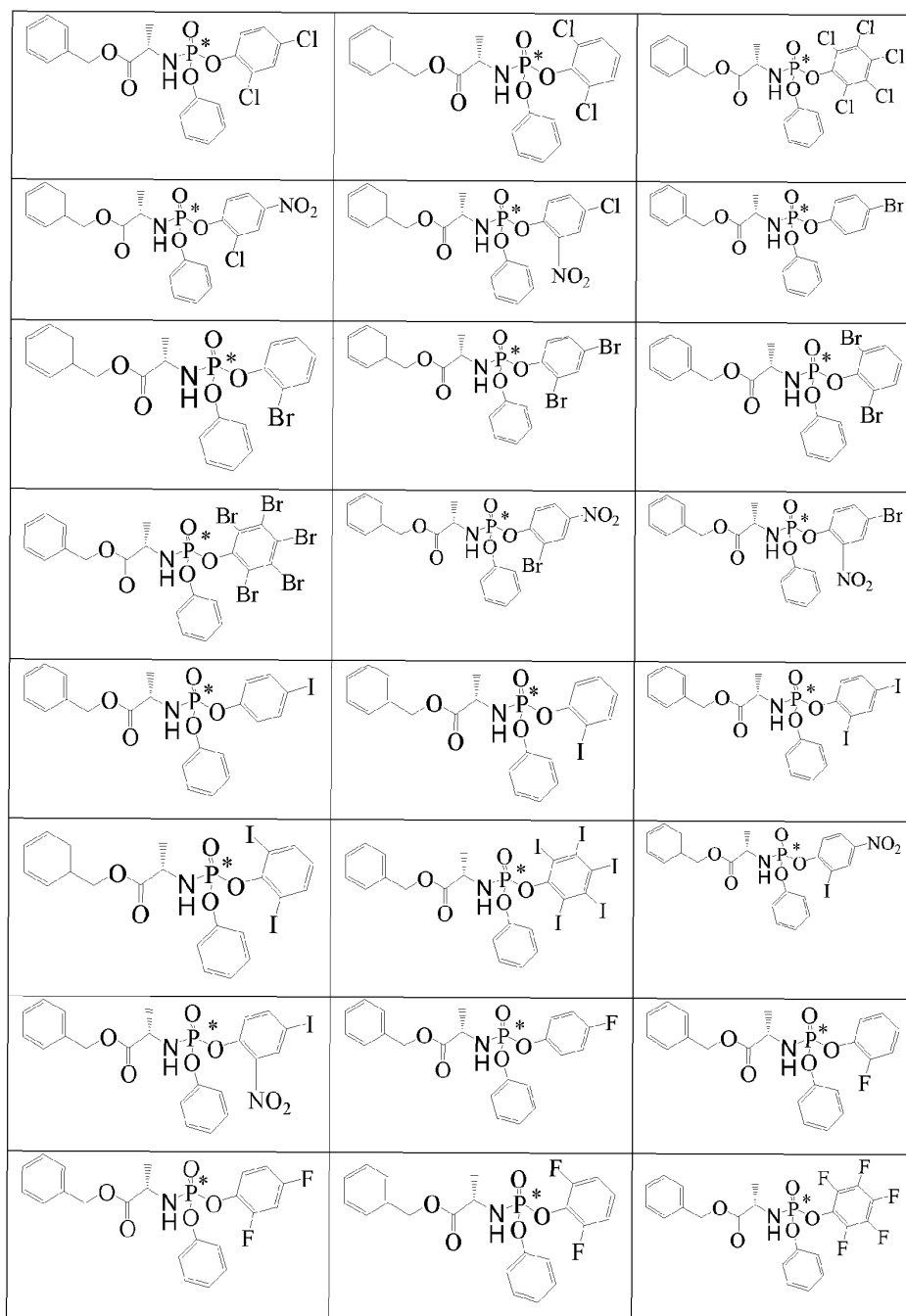
Стадия b) может включать перемешивание смеси соединения формулы II и основания В2 в течение 2 ч или дольше. Стадия b) может включать перемешивание смеси соединения формулы II и основания В2 в течение 6 ч или дольше. Стадия b) может включать перемешивание смеси соединения формулы II и основания В2 в течение 10 ч или дольше. Стадия b) может включать перемешивание смеси соединения формулы II и основания В2 в течение 16 ч или дольше. Стадия b) может включать перемешивание смеси соединения формулы II и основания В2 вплоть до 36 ч.

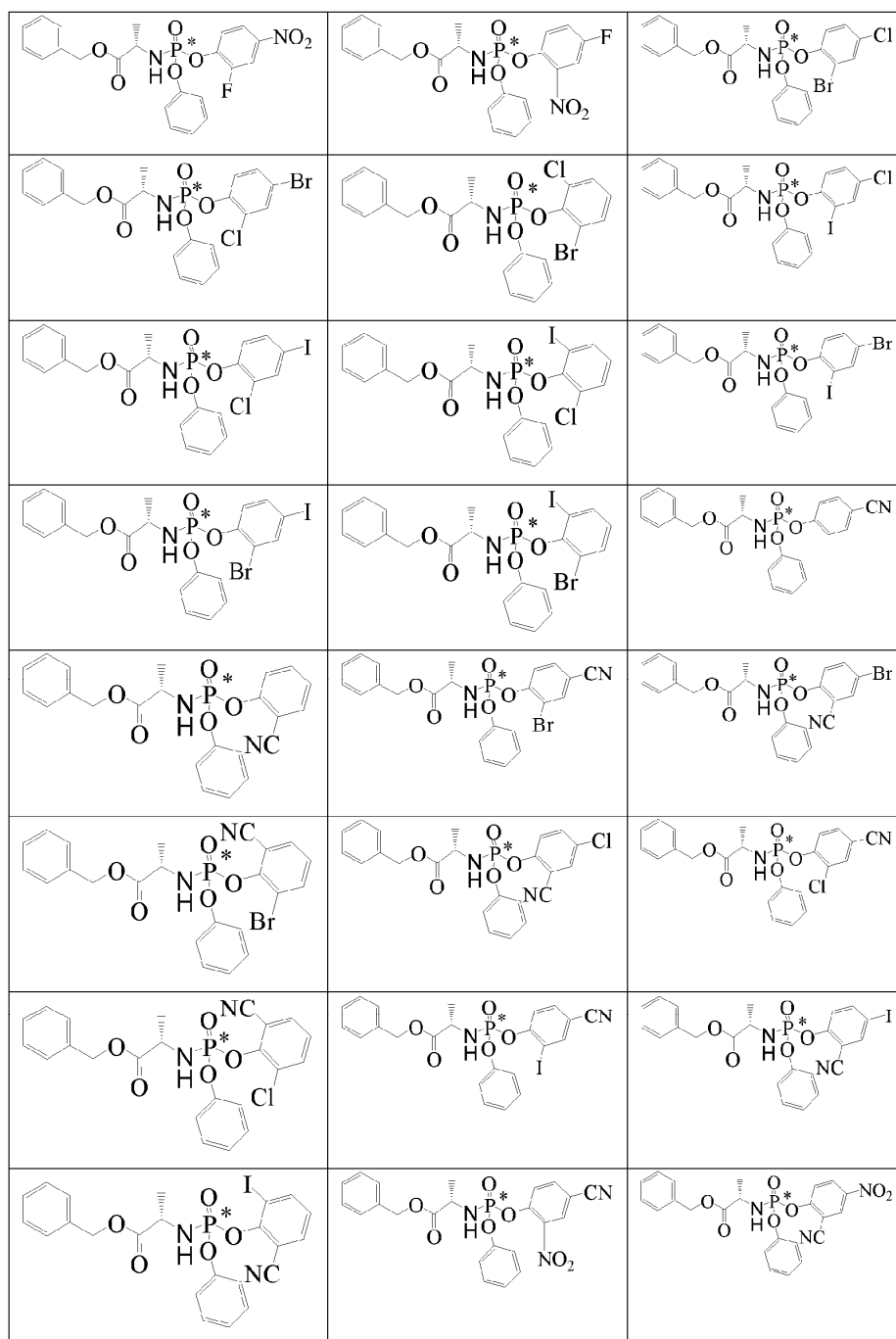
Стадия b) может включать перемешивание смеси соединения формулы II и основания В2 при температуре от 0 до 50°C. Стадия b) может включать перемешивание смеси соединения формулы II и основания В2 при температуре от 10 до 35°C.

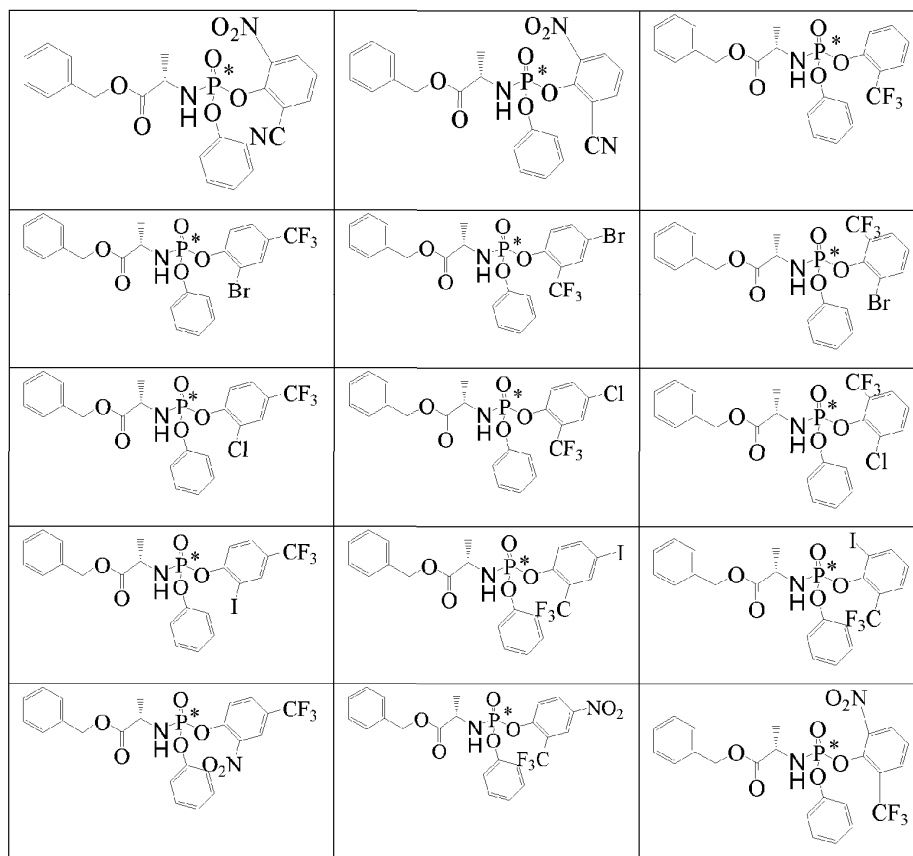
Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что при обработке соединений формулы II основанием они изомеризуются, предпочтительно с формированием (S)-диастереоизомера по сравнению с (R)-диастереоизомером. Таким образом, (R)-диастереоизомер может быть преобразован в (S)-диастереоизомер, или эпимерная смесь (R)-диастереоизомера и (S)-диастереоизомера может быть преобразована в (S)-диастереоизомер. Это увеличивает эффективный КПД любого синтетического последовательного получения (S)-диастереоизомера NUC-1031, включающего способ первого аспекта, поскольку это означает, что все соединения формулы II, даже те, которые первоначально сформированы в виде (R)-диастереоизомера, могут быть использованы, и ни одно из них не отбрасывается.

В некоторых конкретных вариантах осуществления соединение формулы II представляет собой соединение, выбранное из следующего.



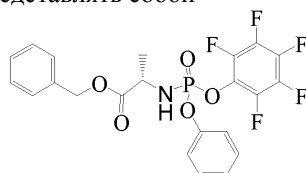




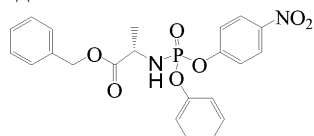


\*обозначает хиральный центр

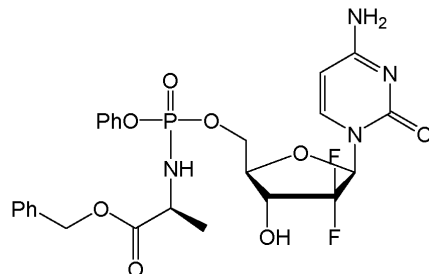
Соединение формулы II может представлять собой



Соединение формулы II может представлять собой



Во втором аспекте изобретение представляет собой способ получения ( $S_p$ )-диастереоизомера гем-цитабин[фенил(бензоксид-L-аланинил)]фосфата (формула I), обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%

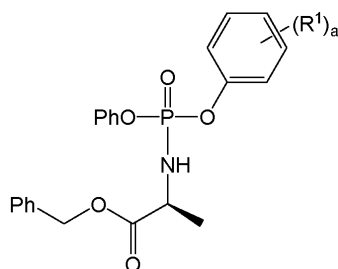


Формула I

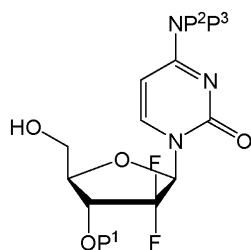
включающий способ по первому аспекту, затем стадию d);

d) взаимодействие ( $S_p$ )-диастереоизомера формулы II, полученного на стадии (c) способа по первому аспекту, с соединением формулы III в присутствии основания (B1), с получением соединения формулы IV, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%, где  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  независимо представляют собой водород или защитную группу:

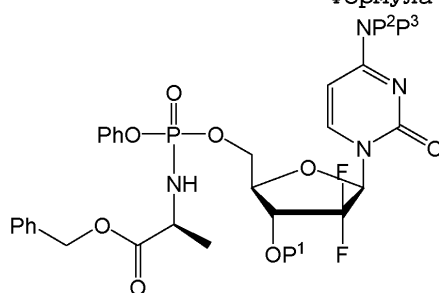




Формула II



Формула III и



Формула IV;

и, в случае когда любой один или более из  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  представляет собой защитную группу, стадию e);  
 e) удаление защитных групп  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  из соединения формулы IV с получением гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%.

Таким образом, способом согласно второму аспекту является способ получения (S)-диастереоизомера NUC-1031 в диастереомерно обогащенной форме, и соединение формулы II представляет собой (S)-диастереоизомер в диастереомерно обогащенной форме.

Основание (B1) может представлять собой азотное основание. Азотное основание включает N-алкилимидазолы, (например, N-метилимидазол (NMI)), имидазол, необязательно замещенные пиридины (например, коллидин, пиридин, 2,6-лютидин) и триалкиламины (например, триэтиламин и диизопропиламин). Альтернативно основание (B1) может представлять собой металлоорганическое основание или металлогидридное основание (например, Noah). Таким образом, основанием может быть реактив Гарньера (т.е. алкилмагниггалогенид). Примеры реактива Гриньяра включают трет-бутилмагниггалогениды, такие как  $^t\text{BuMgCl}$ ,  $^t\text{BuMgBr}$ . Предпочтительно основанием является  $^t\text{BuMgCl}$ .

Способ может быть осуществлен в растворителе S1.

Стадия d) согласно второму аспекту может проводиться в органическом растворителе (S1). Органические растворители включают, но не ограничиваясь ими, простые эфиры (например, тетрагидрофуран, диоксан, диэтиловый эфир); кетоны (например, ацетон и метилизобутилкетон); галогенированные растворители (например, дихлорметан, хлороформ и 1,2-дихлорэтан); и амиды (например, ДМФА, NMP); или их смеси. Когда стадию a) проводят в присутствии реактива Гриньяра, органическим растворителем предпочтительно является простой эфир. Более предпочтительно растворителем является тетрагидрофуран.

Когда стадию b) согласно второму аспекту проводят в присутствии азотного основания, органическим растворителем более предпочтительно является галогенированный растворитель или амид.

Данную реакцию обычно проводят при подходящей температуре, например примерно от  $-5^\circ\text{C}$  до примерно  $40^\circ\text{C}$ . Предпочтительно реакционная температура составляет от около  $25^\circ\text{C}$  до примерно  $30^\circ\text{C}$ . Реакции дают перемешиваться в течение периода от около 15 мин до примерно 16 ч и предпочтительно примерно от 30 мин до примерно 60 мин.

Гидроксилзащитная группа (например,  $P^1$ ) может быть независимо выбрана из  $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ -алкила и необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -арила,  $-\text{C}(\text{O})$ арила, необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})-\text{OC}_1-\text{C}_6$ -алкила,  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}$ -аллила,  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2$ -флуоренила, необязательно замещенного  $-\text{CH}(\text{арил})_3$ , необязательно замещенного  $-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкилен})$ арила, необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -арила и  $-\text{C}_1-\text{C}_4$ -алкил- $\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_4$ -алкила.

Аминозащитная группа (например,  $P^2$  и/или  $P^3$ ) в каждом случае может быть независимо выбрана из  $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1-\text{C}_6$ -алкила, необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -арила,  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}$ -аллила,  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2$ -

флуоренила, необязательно замещенного  $-\text{CH}(\text{арил})_3$ , необязательно замещенного  $-(\text{C}_1\text{-C}_3\text{-алкилен})\text{арила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $\text{C}(\text{O})\text{арила}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{S}(\text{O})_2\text{-арила}$  и необязательно замещенного  $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})_3$ .

В данной области известно много защищенных исходных соединений формулы III, и/или они могут быть получены известными способами. Например, исходные соединения формулы III могут быть синтезированы из гемцитабина путем защиты 3'-гидрокси и 4-аминогрупп подходящей защитной группой. Защитные группы, как правило, могут быть добавлены и удалены с использованием общеизвестных для защитных групп методик, например, как описано в "Protective Groups in Organic Chemistry," edited by J.W.F McOmie (1973); "Protective Groups in Organic Synthesis," 2<sup>nd</sup> edition, T.W Greene (1991); и "Protecting Groups", 3<sup>rd</sup> addition P.J Koscienski (1995).

Обычно для получения защищенных 3'-гидрокси и 4-аминогрупп соединений необходимо сначала защитить 5'-гидроксигруппу гемцитабина защитной группой, которая является ортогональной к той группе, которая будет использоваться для защиты 3'-гидрокси и 4-аминогрупп (т.е. группе, которая может быть удалена без удаления из желаемых 3'-гидрокси и 4-аминогрупп). Одновременно либо последовательно 3'-гидрокси и 4-аминогруппу защищают желаемой защитной группой(ми), и 5'-гидроксизащитную группу удаляют для образования соединения формулы III. Некоторые защитные группы могут быть одновременно введены в 3'-гидрокси, 5'-гидроксигруппы и необязательно в 4-аминогруппы и затем селективно удалены из 5'-гидроксильной группы без удаления из 3'-гидрокси и 4-аминогрупп.

Согласно некоторым вариантам осуществления  $\text{P}^1$  независимо выбран из необязательно замещенного  $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{алкил})_3$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{арила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-OC}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-аллила}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-флуоренила}$ , необязательно замещенного  $-\text{CH}(\text{арил})_3$ , необязательно замещенного  $-(\text{C}_1\text{-C}_3\text{-алкилен})\text{арила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-арила}$  и  $-\text{C}_1\text{-C}_4\text{-алкил-O-C}_1\text{-C}_4\text{-алкила}$ .

$\text{P}^1$  может быть независимо выбран из необязательно замещенного  $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})_3$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-OC}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$  и необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-арила}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-аллила}$ . Предпочтительно,  $\text{P}^1$  выбран из  $-\text{C}(\text{O})\text{O-tBu}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O-бензила}$  и  $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-аллила}$ . Таким образом,  $\text{P}^1$  может представлять собой  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-арил}$ .  $\text{P}^1$  может представлять собой  $-\text{C}(\text{O})\text{O}^t\text{Bu}$ .

Альтернативно  $\text{P}^1$  может быть независимо выбран из необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$  и необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-арила}$ , например  $\text{P}^1$  может быть независимо выбран из бензоила и ацетила.

$\text{P}^2$  может быть независимо выбран из  $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-арила}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-аллила}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-флуоренила}$ , необязательно замещенного  $-\text{CH}(\text{арил})_3$ , необязательно замещенного  $-(\text{C}_1\text{-C}_3\text{-алкилен})\text{арила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $\text{C}(\text{O})\text{арила}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{S}(\text{O})_2\text{-арила}$  и необязательно замещенного  $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{алкил})_3$ .

$\text{P}^2$  может быть независимо выбран из  $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-арила}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-аллила}$ , необязательно замещенного  $-\text{CH}(\text{арил})_3$  и необязательно замещенного  $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})_3$ . Предпочтительно  $\text{P}^2$  выбран из  $-\text{C}(\text{O})\text{O-tBu}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O-бензила}$  и  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-аллила}$ . Таким образом,  $\text{P}^2$  может представлять собой  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-арил}$ .

Альтернативно  $\text{P}^2$  может быть независимо выбран из необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$  и необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{арила}$ , например  $\text{P}^2$  может быть независимо выбран из бензоила и ацетила.

В другой альтернативе  $\text{P}^2$  представляет собой H.

Аналогичным образом  $\text{P}^3$  может быть независимо выбран из H,  $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{-арила}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{-O-аллила}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-флуоренила}$ , необязательно замещенного  $-\text{CH}(\text{арил})_3$ , необязательно замещенного  $-(\text{C}_1\text{-C}_3\text{-алкилен})\text{арила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{арила}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$ , необязательно замещенного  $-\text{S}(\text{O})_2\text{-арила}$  и необязательно замещенного  $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})_3$ .

Предпочтительно,  $\text{P}^3$  представляет собой H.

Группа необязательно замещенного  $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{-алкил})_3$  может представлять собой группу  $-\text{Si}(\text{C}_{1-4}\text{-алкил})_3$ . Группа (т.е. алкильная группа) предпочтительно является незамещенной. Иллюстративные примеры включает триэтилсиллил и трет-бутил-диметилсиллил.

Группа необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$  может представлять собой  $-\text{C}(\text{O})\text{-C}_1\text{-C}_6\text{-алкильную}$  группу. Группа (т.е. алкильная группа) предпочтительно является незамещенной. Иллюстративные примеры включает ацетил и пропионил.

Группа необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{арила}$  может представлять собой  $-\text{C}(\text{O})\text{-фенильную}$  группу. Группа (т.е. фенильная группа) предпочтительно является незамещенной. Иллюстративные примеры включает бензоил.

Группа необязательно замещенного  $-\text{C}(\text{O})\text{-OC}_1\text{-C}_6\text{-алкила}$  может представлять собой  $-\text{C}(\text{O})\text{-OC}_1\text{-C}_4\text{-алкильную}$  группу. Группа (т.е. алкильная группа) предпочтительно является незамещенной. Иллюстративные примеры включает  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-метил}$  и  $-\text{C}(\text{O})\text{-O-этил}$ . Особо предпочтительным примером является

C(O)OtBu.

Группа необязательно замещенного  $-(C_1-C_3\text{-алкилен})$ арила предпочтительно представляет собой необязательно замещенную бензильную группу. Иллюстративные примеры включает бензил, фенетил, 4-метоксибензил, 4-нитробензил, 4-бромбензил, 2,3-диметоксибензил и 2,4-диметоксибензил.

Группа необязательно замещенного  $-C(O)OCH_2$ -арила предпочтительно представляет собой необязательно замещенную  $C(O)O$ -бензильную группу. Иллюстративные примеры включает  $-C(O)O$ -бензил и  $-C(O)O$ -(4-метоксибензил).

Группа необязательно замещенного  $-C_1-C_4$ -алкил- $O-C_1-C_4$ -алкила может представлять собой  $-C_1-C_2$ -алкил- $O-C_1-C_2$ -алкильную группу. Группа (т.е. алкильная группа) предпочтительно является незамещенной. Иллюстративные примеры включает метоксиметил (МOM) и 2-метоксиэтоксиметил (MEM).

Группа необязательно замещенного  $-S(O)_2-C_1-C_6$ -алкила может представлять собой  $-S(O)_2-C_1-C_4$ -алкильную группу. Группа (т.е. алкильная группа) предпочтительно является незамещенной. Иллюстративные примеры включает метансульфонат.

Группа необязательно замещенного  $-S(O)_2$ -арила может представлять собой  $-S(O)_2$ -фенильную группу. Иллюстративные примеры включает фенилсульфонат, 4-метилфенилсульфонат и 4-нитрофенилсульфонат.

Группа необязательно замещенного  $-CH(арил)_3$  может представлять собой группу  $-CH(фенил)_3$ . Иллюстративные примеры включают тритил.

Когда два или более из  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  представляют собой защитные группы, стадия удаления защиты может включать две или три отдельные реакции удаления защиты. Это представляет собой случаи, когда используют две или три различные защитные группы и когда эти две или три защитные группы не могут быть удалены в одних и тех же условиях.

Однако возможно, что стадия удаления защиты включает одну реакцию удаления защиты, в которой удаляются все защитные группы. Таким образом, может быть, что  $P^1$  и  $P^2$  представляют собой защитные группы, которые могут быть удалены в одних и тех же условиях. Может быть, что  $P^1$  и  $P^2$  являются одинаковыми.

Может быть, что оба  $P^1$  и  $P^2$  представляют собой группу, выбранную из необязательно замещенного  $-C(O)OC_1-C_6$ -алкила,  $-C(O)-O$ -аллила и необязательно замещенного  $-C(O)OCH_2$ -арила. Таким образом, оба  $P^1$  и  $P^2$  могут представлять собой группу, выбранную из  $C(O)OtBu$ ,  $-C(O)-O$ -аллила и  $C(O)O$ -бензила. В некоторых вариантах осуществления  $P^1$  и  $P^2$  оба представляют собой группу  $C(O)OtBu$ .

Предпочтительно  $P^3$  представляет собой водород. Таким образом, в особом варианте осуществления  $P^1$  и  $P^2$  являются одинаковыми группами, и  $P^3$  представляет собой водород. Таким образом, в особом варианте осуществления  $P^1$  и  $P^2$  оба представляют собой группу  $C(O)OtBu$  и  $P^3$  представляет собой водород.

Может быть, что  $P^2$  и  $P^3$ , каждый представляют собой H, и  $P^1$  представляет собой защитную группу. Может быть, что  $P^2$  и  $P^3$  каждый представляют собой H и  $P^1$  представляет собой защитную группу, выбранную из  $-C(O)O-tBu$ ,  $-C(O)O$ -бензила и  $-C(O)OCH_2$ -аллила. Может быть, что  $P^2$  и  $P^3$  каждый представляют собой H и  $P^1$  представляет собой  $-C(O)O-tBu$ .

На протяжении всего описания "диастереомерно обогащенная форма" и "по существу диастереомерно чистая форма" означает диастереомерно чистоту больше чем 95%. "Диастереомерно обогащенная форма" и "по существу диастереомерно чистая форма" может означать диастереоизомерную чистоту больше чем 98%, больше чем 99% или больше чем 99,5%.

Любая из приведенных выше алкильных и арильных (например, фенил, включая фенильную группу в бензильной группе) групп необязательно замещена, где это химически возможно, 1-3 заместителями, каждый из которых, в каждом случае независимо, выбран из группы, состоящей из оксо,  $=NR^a$ ,  $=NOR^a$ , галогена, нитро, циано,  $NR^aR^a$ ,  $NR^aS(O)_2R^a$ ,  $NR^aCONR^aR^a$ ,  $NR^aCO_2R^a$ ,  $OR^a$ ,  $SR^a$ ,  $SOR^a$ ,  $SO_3R^a$ ,  $SO_2R^a$ ,  $SO_2NR^aR^a$ ,  $CO_2R^a$ ,  $C(O)R^a$ ,  $CONR^aR^a$ ,  $C_1-C_4$ -алкила,  $C_2-C_4$ -алкенила,  $C_2-C_4$ -алкенила и  $C_1-C_4$ -галогеналкила, где  $R^a$ , в каждом случае независимо, выбран из H,  $C_1-C_4$ -алкила и  $C_1-C_4$ -галогеналкила.

Может быть, что любая приведенная выше алкильная группа является незамещенной.

Может быть, что любая из приведенных выше арильных групп (например, фенил, включая фенильную группу в бензильной группе) необязательно замещена, где это химически возможно, 1-3 заместителями, каждый из которых, в каждом случае независимо, выбран из группы, состоящей из: галогена, нитро, циано,  $NR^aR^a$ ,  $NR^aS(O)_2R^a$ ,  $NR^aCONR^aR^a$ ,  $NR^aCO_2R^a$ ,  $OR^a$ ,  $SR^a$ ,  $SOR^a$ ,  $SO_3R^a$ ,  $SO_2R^a$ ,  $SO_2NR^aR^a$ ,  $CO_2R^a$ ,  $C(O)R^a$ ,  $CONR^aR^a$ ,  $C_1-C_4$ -алкила,  $C_2-C_4$ -алкенила,  $C_2-C_4$ -алкенила и  $C_1-C_4$ -галогеналкила, где  $R^a$  в каждом случае независимо выбран из H,  $C_1-C_4$ -алкила и  $C_1-C_4$ -галогеналкила.

Может быть, что любая из приведенных выше арильных (например, фенил, включая фенильную группу в бензильной группе) групп необязательно замещена 1-3 заместителями, каждый из которых, в каждом случае независимо, выбран из группы, состоящей из галогена, нитро,  $OR^a$ ,  $C_1-C_4$ -алкила,  $C_1-C_4$ -галогеналкила, где  $R^a$  в каждом случае независимо выбран из H,  $C_1-C_4$ -алкила и  $C_1-C_4$ -галогеналкила.

Арильные группы содержат от 6 до 20 атомов углерода, необходимых для удовлетворения требуемой валентности. Арильные группы представляют собой карбоциклические группы, которые удовлетворяют правилу Хюккеля (т.е. они содержат карбоциклическую кольцевую систему, содержащую  $2(2n+1)$  л электронов). Арильные группы могут быть необязательно замещены фенильными группами, обяза-

тельно замещенными бифенильными группами, необязательно замещенными нафталинильными группами или необязательно замещенными антраценильными группами. В равной степени арильные группы могут включать неароматические карбоциклические части. Предпочтительно арильная группа представляет собой необязательно замещенную фенильную группу.

Алкильные группы могут быть с прямой или разветвленной цепью. Таким образом, например, C<sub>4</sub>-алкильная группа может представлять собой н-бутил, изобутил или трет-бутил.

Способы настоящего изобретения также могут включать удаление гидроксидной и аминозащитных групп.

Может быть, что стадию удаления защиты (стадия e)) осуществляют без очистки продукта стадии d).

Когда защитная группа чувствительна к кислоте, например тритил, C(O)OtBu, MOM, MEM, 2,4-диметоксибензил, 2,3-диметоксибензил, стадию удаления защиты можно проводить с использованием подходящей кислоты. Кислота может представлять собой кислоту Брэнстеда (например, ТФУК, фосфорную кислоту, HCl или муравьиную кислоту) или кислоту Льюиса (например, ZnBr<sub>2</sub>, CeCl<sub>3</sub>). Кислоты Льюиса (например, ZnBr<sub>2</sub>) являются менее предпочтительными. Аналогичным образом HCl менее предпочтительна. Предпочтительной кислотой является ТФУК.

Когда защитная группа чувствительна к основанию, например ацетил, бензоил, стадию удаления защиты можно проводить с использованием подходящего основания, например водного NH<sub>3</sub> или водного NaOH. Чувствительные к основанию группы могут быть менее предпочтительными.

Когда защитная группа представляет собой силильную группу (например, триэтилсилил или трет-бутилдиметилсилил), стадию удаления защиты можно проводить с использованием подходящей кислоты (например, ТФУК) или с использованием подходящего источника фтора (например, тетрабутиламмонийфторида, фторкремниевой кислоты, HF).

Когда защитная группа представляет собой бензильную группу или C(O)O-бензильную группу, стадию удаления защиты можно проводить с использованием H<sub>2</sub> и подходящего катализатора (например, Pd/C). Такие защитные группы могут быть менее предпочтительными.

Когда защитная группа представляет собой 4-метоксибензил, 2,3-диметоксибензил, 2,4-диметоксибензил или C(O)O-(4-метоксибензил), стадию удаления защиты можно проводить с использованием подходящего окисляющего агента (например, мета-хлорнадбензойной кислоты).

Когда защитная группа представляет собой -C(O)-O-аллил, стадию удаления защиты можно проводить с использованием (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Pd.

Когда защитная группа представляет собой -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-флуоренил, стадию удаления защиты можно проводить с использованием пиперидина.

Когда R<sup>1</sup> представляет собой C(O)O<sup>t</sup>Bu, удаление защиты может быть достигнуто при использовании C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-спирта и/или воды. Когда R<sup>1</sup> представляет собой C(O)O<sup>t</sup>Bu, удаление защиты может быть достигнуто при использовании смеси C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-спирта и воды. Удаление защиты может быть достигнуто при использовании смеси изопропилового спирта (IPA) и воды.

Стадия удаления защиты может проводиться в органическом растворителе или его смеси. Примеры органических растворителей включает, но не ограничиваясь ими, галогенированные растворители (например, дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан); спирты (например, метанол, этанол, изопропанол) и простые эфиры (например, тетрагидрофуран, диэтиловый эфир).

Когда стадию удаления защиты осуществляют в присутствии кислоты (например, ТФУК), органическим растворителем предпочтительно является галогенированный растворитель, например дихлорметан.

Реакция удаления защиты может быть осуществлена при температуре в интервале, например, от -10°C до примерно 30°C, например, до примерно 10°C. Удобная температура для проведения данной реакции составляет от -5 до 5°C. Данная реакция может быть подвергнута перемешиванию в течение периода примерно от 15 мин до примерно 16 ч и предпочтительно примерно от 1 ч до примерно 4 ч и более предпочтительно примерно от 2 ч до примерно 3 ч.

Когда стадию d) осуществляют при использовании C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-спирта и/или воды (например, смеси изопропилового спирта (IPA) и воды), реакционная смесь может быть нагрета, например, до температуры от 30 до 90°C или до температуры от 60 до 85°C.

Когда удаление защиты выполняют в присутствии кислоты (например, ТФУК), выделение полученного продукта после удаления защиты обычно проводят путем гашения избытка кислоты, использованной на стадии удаления защиты, и экстракцией продукта несмешивающимся с водой органическим растворителем и восстановлением путем выпаривания органического растворителя.

Примеры несмешивающихся с водой органических растворителей, полезных при экстракции, включает сложные эфиры, такие как этилацетат, метилацетат, изопропилацетат и т.п.; хлорированные растворители, такие как дихлорметан, хлороформ и т.п.; ароматические углеводородные растворители, такие как толуол, ксилол и т.п.; предпочтительно этилацетат.

Может быть, что R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> оба представляют собой группу C(O)O<sup>t</sup>Bu, и R<sup>3</sup> представляет собой водород, тогда стадию a) осуществляют в присутствии <sup>t</sup>BuMgCl (например, в ТГФ), и стадию b) осуществляют при использовании ТФУК (например, в DCM).

Может быть, что R<sup>1</sup> представляет собой группу C(O)O<sup>t</sup>Bu, R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый представляет собой водо-

род, тогда стадию а) осуществляют в присутствии  ${}^t\text{BuMgCl}$  (например, в ТГФ). Может быть, что стадию б) осуществляют без выделения продукта стадии а), например путем добавления IPA и воды к реакционной смеси стадии а) после завершения реакции стадии а).

В некоторых вариантах осуществления может быть желательна очистка гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата, полученного согласно способу по второму аспекту настоящего изобретения. Аналогичным образом еще может быть желательна очистка соединения формулы II, полученного согласно способу по первому аспекту настоящего изобретения. Методы очистки хорошо известны специалистам в данной области и включает хроматографию (например, колоночную хроматографию), перекристаллизацию и дистилляцию. В других вариантах осуществления очистка не является необходимой.

По всему данному описанию использованы следующие аббревиатуры:

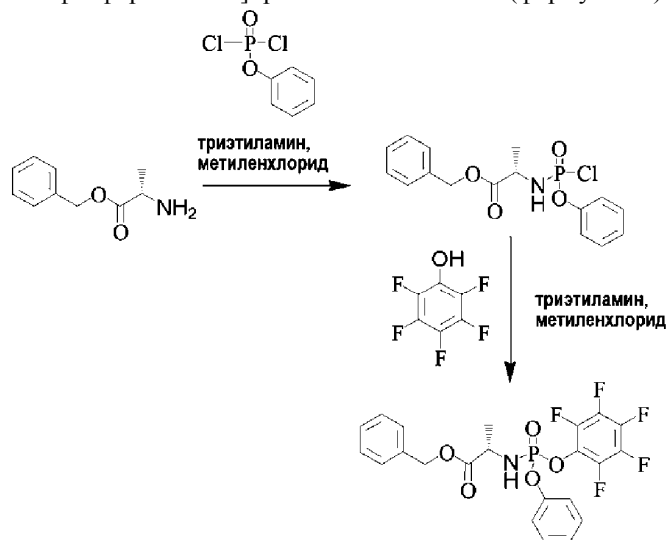
DCM	- дихлорметан	DIPE	- диизопропиловый эфир
DMFA	- <i>N,N</i> -диметилформамид	DMSO	- диметилсульфоксид
IPA	- изопропиловый спирт	MTBE	- метил-трет-бутиловый эфир
NMP	- <i>N</i> -метилпирролидон	TBDMS	- трет-бутилдиметилсилил
TEA	- триэтиламин	ТФУК	- трифторуксусная кислота
ТГФ	- тетрагидрофуран		

### Примеры

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые предоставляются только для иллюстрации и не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1.

Получение диастереоизомерной смеси бензилового эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (формула IIa).



Формула IIa (Sp и Rp смесь)

К перемешиваемой смеси гидрохлорида бензилового эфира L-аланина (100 г) в метиленхлориде (1 л) добавляли фенилдихлорфосфат (77 мл) при 25-35°C и полученную в результате смесь охлаждали до (-70°C) - (-78°C), добавляли триэтиламин (130,5 мл) и перемешивали в течение 1 ч при этой же температуре. Температуру реакционной массы повышали до 25-35°C и давали перемешиваться в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную массу концентрировали в вакууме при ниже 35°C, с получением остатка. К полученному остатку добавляли диизопропиловый эфир (2 л) при 25-35°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. Реакционную массу фильтровали и промывали диизопропиловым эфиром (500 мл) с последующим концентрированием фильтрата в вакууме при ниже 35°C, с получением фенил(бензокси-L-аланинил)фосфорохлоридата.

Полученное соединение растворяли в метиленхлориде (1 л) при 25-35°C и охлаждали до (-5°C) - (-10°C). К реакционной массе добавляли пентафторфенол (85,5 г), триэтиламин (65,2 мл) при этой же температуре и перемешивали в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную массу концентрировали в вакууме при ниже 35°C и загружали этилацетат (1 л) при 25-35°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. Твердые вещества отфильтровывали и промывали этилацетатом (1 л). Фильтрат промывали водой (1 л), 10% карбонатом натрия (2×1 л), насыщенным раствором соли (1 л) и органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, концентрировали в вакууме при 35-45°C, с полу-

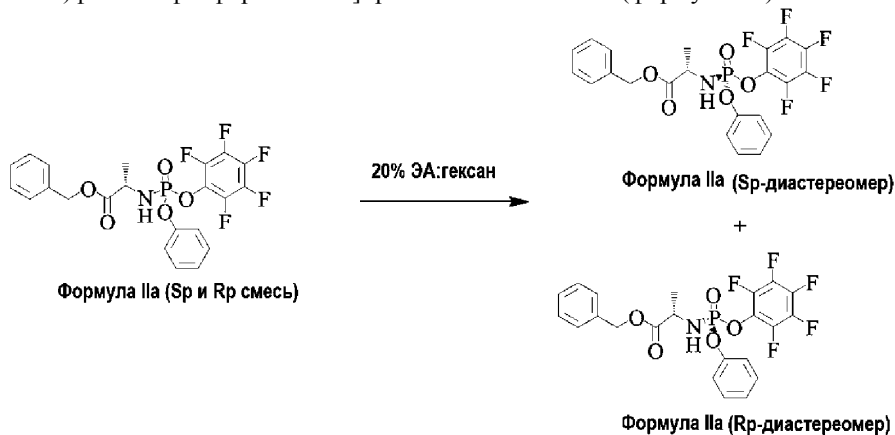
чением диастереоизомерной смеси указанного в заголовке соединения в виде белого полутвердого вещества.

Выход: 210 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 33,74:66,26% ( $R_p:S_p$ ).

Пример 2.

Отделение  $S_p$ -диастереоизомера бензилового эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифеноксифосфориламино)пропионой кислоты (формула IIa).



В полученную выше диастереоизомерную смесь соединения формулы IIa ( $R_p:S_p$  - 33,74:66,26%) загружали 20% этилацетат в гексане (1,2 л) при 25-35°C и перемешивали в течение 1 ч. Твердые вещества отфильтровывали и промывали 20% этилацетатом в гексане (300 мл), с получением смеси соединения формулы IIa.

Выход: 112 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 22,13:77,87% ( $R_p:S_p$ ).

Фильтрат концентрировали в вакууме, с получением диастереоизомерной смеси формулы IIa (75 г;  $R_p:S_p$  65,43:34,57%).

В полученную выше диастереоизомерную смесь формулы IIa ( $R_p:S_p$  - 22,13:77,87%) загружали 20% этилацетат в гексане (1,2 л) при 25-35°C и перемешивали в течение 1 ч. Твердые вещества отфильтровывали и промывали 20% этилацетатом в гексане (300 мл), с получением чистого  $S_p$ -диастереоизомера соединения формулы IIa.

Выход: 80 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 0,20:99,80% ( $R_p:S_p$ ).

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 7,18-7,41 (м, 10H), 6,91-6,99 (д, 1H), 5,10 (с, 2H), 4,01-4,11 (м, 1H), 1,30-1,32 (д, 3H) ESI-МС ( $m/z$ ): 524 ( $M+1$ ).

Фильтрат концентрировали в вакууме, с получением диастереоизомерной смеси формулы IIa (28 г;  $R_p:S_p$  80,77:19,23%).

Пример 3.

Изомеризация бензилового эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифеноксифосфориламино)пропионой кислоты (формула IIa).

К перемешиваемому раствору полученного выше бензилового эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифеноксифосфориламино)пропионой кислоты формулы IIa (75 г;  $R_p:S_p$  - 65,43:34,57%) в 20% этилацетате в гексане (1,1 л) добавляли триэтиламин (7,5 мл) при 25-35°C и перемешивали в течение 6 ч при этой же температуре. После завершения реакции реакцию массу гасили в воде (750 мл) и экстрагировали этилацетатом (750 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

Выход: 45 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 91,29:8,71% ( $S_p:R_p$ ).

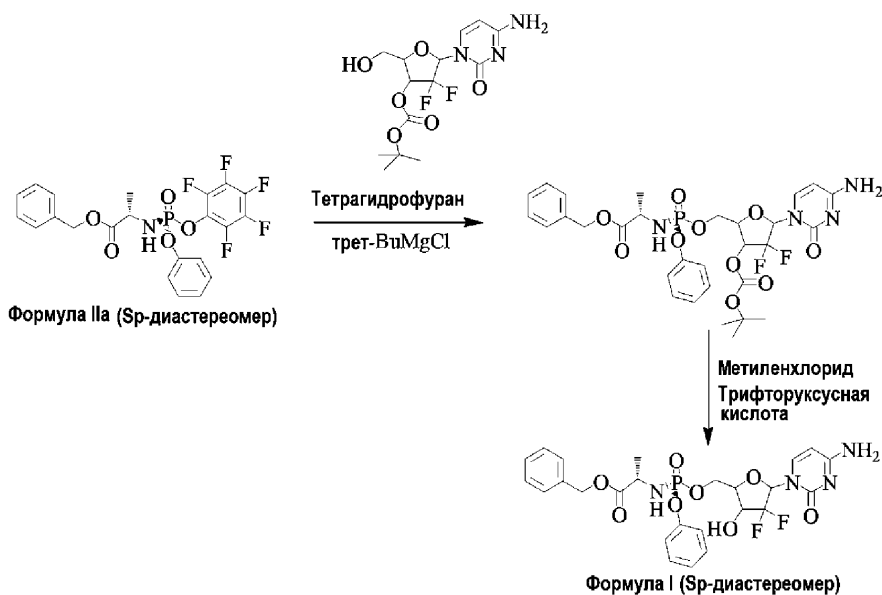
Полученную выше  $R_p$  и  $S_p$ -диастереоизомерную смесь бензилового эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифеноксифосфориламино)пропионой кислоты формулы IIa (45 г;  $R_p:S_p$  - 8,71:91,29%) суспендировали в 20% этилацетате в гексане (1,1 л) при 25-30°C и перемешивали в течение 1 ч при этой же температуре. Твердое вещество отфильтровывали и промывали 20% этилацетатом в гексане (225 мл), с получением  $S_p$ -диастереоизомера указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

Выход: 19 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 99,92:0,08% ( $S_p:R_p$ ).

Пример 4.

Получение  $S_p$ -диастереоизомера NUC-1031 (используя  $S_p$ -диастереоизомер формулы IIa).



К перемешиваемой смеси 3'-O-(трет-бутоксикарбонил)гемцитабина (5 г) в тетрагидрофуране (75 мл) добавляли трет-бутилмагнийхлорид (15,2 мл 2,0М в тетрагидрофуране) и *S<sub>p</sub>*-диастереоизомер бензилового эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)феноксифосфирамино]пропионовой кислоты формулы IIa (8,3 г, разбавленный в 50 мл тетрагидрофурана) при (0°C)-(-5°C), температуру повышали до 25-30°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. После завершения реакции реакцию массу гасили добавлением 0,5Н хлористоводородной кислоты (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×75 мл). Органический слой последовательно промывали 10% карбонатом натрия (2×50 мл), насыщенным раствором соли (50 мл). Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением остатка.

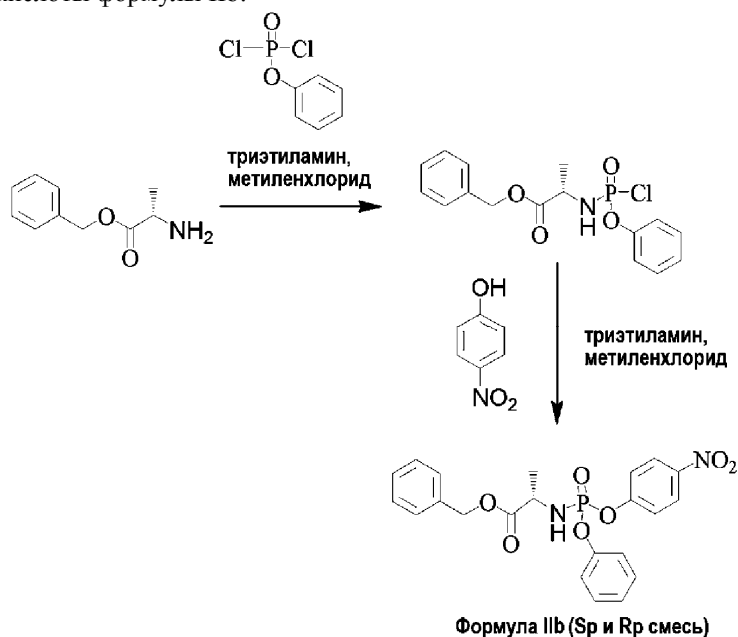
Полученный остаток забирали в метиленхлорид (50 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (18,5 мл) при 0-5°C. Реакционную массу выдерживали при 25-35°C в течение 2 ч и гасили в 20% растворе карбоната натрия (125 мл). Экстрагировали этилацетатом (165 мл), органический слой сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме при 40-45°C. Полученный остаток суспендировали в 50% смеси этилацетата в гептане (150 мл), с получением указанного в заголовке соединения.

Выход: 4,8 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 99,4% (*S<sub>p</sub>*-диастереоизомер).

Пример 5.

Получение диастереоизомерной смеси бензилового эфира 2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфирамино]пропионовой кислоты формулы IIb.



К перемешиваемой смеси гидрохлорида бензилового эфира L-аланина (50 г) в метиленхлориде (500 мл) добавляли фенолдихлорфосфат (54 г) при 25-35°C, и полученную в результате смесь охлаждали

до (-70°C) - (-78°C), добавляли триэтиламин (65,2 мл) и перемешивали в течение 1 ч при этой же температуре. Температуру реакционной массы повышали до 25-35°C и давали перемешиваться в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную массу концентрировали в вакууме при ниже 35°C, с получением остатка. К полученному остатку добавляли диизопропиловый эфир (1 л) при 25-35°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. Реакционную массу фильтровали и промывали диизопропиловым эфиром (250 мл) с последующим концентрированием фильтрата в вакууме при ниже 35°C, с получением фенил(бензокси-L-аланинил)фосфорохлорида.

Полученное соединение растворяли в метиленхлориде (500 мл) при 25-35°C и охлаждали до (-5°C)-(-10°C). К реакционной массе добавляли пентафторфенол (27,5 г), триэтиламин (65,2 мл) при этой же температуре и перемешивали в течение 2 ч. После завершения реакции, реакционную массу концентрировали в вакууме при ниже 35°C, загружали этилацетат (500 мл) при 25-35°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. Твердые вещества отфильтровывали и промывали этилацетатом (500 мл). К фильтрату добавляли воду (500 мл), промывали 10% карбонатом натрия (2×500 мл), насыщенным раствором соли (500 мл) и органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, концентрировали в вакууме при 35-40°C, с получением диастереоизомерной смеси указанного в заголовке соединения в виде густой маслянистой жидкости.

Выход: 90 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 45,6:54,94% (R<sub>p</sub>:S<sub>p</sub>).

Полученную выше диастереоизомерную смесь бензилового эфира 2-[(4-нитрофеноксифосфорилиламино)пропионовой кислоты формулы IIb (40 г; R<sub>p</sub>:S<sub>p</sub> - 45,6:54,94%) разделяли на чистые S<sub>p</sub> и R<sub>p</sub> диастереоизомеры препаративной ВЭЖХ и чистые фракции концентрировали в вакууме, с получением отдельных S<sub>p</sub> и R<sub>p</sub> диастереоизомеров.

Выход: S<sub>p</sub>-диастереоизомер: 8 г.

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): - 8,15-8,19 (д, 2H), 7,15-8,37 (м, 12H), 5,12 (с, 2H), 4,02-4,24 (м, 2H), 1,39-1,42 (д, 3H).

ESI-МС (m/z): - 479 (M+Na).

R<sub>p</sub>-диастереоизомер: 6 г.

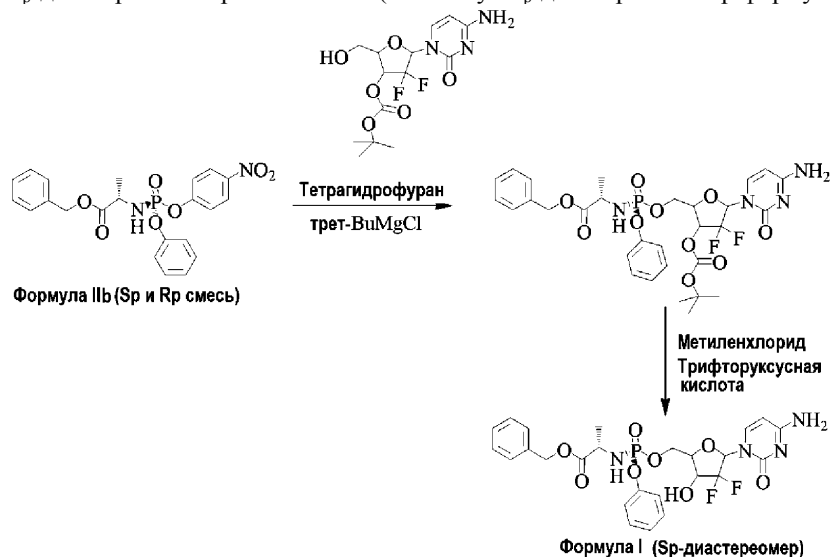
<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): - 8,08-8,13 (д, 2H), 7,15-7,34 (м, 12H), 5,10 (с, 2H), 4,48-4,56 (м, 1H), 4,11-4,20 (м, 1H), 1,39-1,41 (д, 3H).

ESI-МС (m/z): - 457 (M+1)<sup>+</sup>.

Смесь S<sub>p</sub> и R<sub>p</sub>-диастереоизомеров: 20 г.

Пример 6.

Получение S<sub>p</sub>-диастереоизомера NUC-1031 (используя S<sub>p</sub>-диастереоизомер формулы IIb).



К перемешиваемой смеси 3'-O- (трет-бутоксикарбонил)гемцитабина (2 г) в тетрагидрофуране (30 мл) добавляли N-метилпиридин (2 мл), трет-бутилмагнийхлорид (5,5 мл, 2,0М в тетрагидрофуране) и S<sub>p</sub>-диастереоизомер бензилового эфира 2-[(4-нитрофеноксифосфорилиламино)пропионовой кислоты формулы IIb (4 г, разбавленный в 20 мл тетрагидрофурана) при (0°C)-(-5°C), температуру повышали до 25-30°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. После завершения реакции реакционную массу гасили добавлением 0,5Н хлористоводородной кислоты (20 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×30 мл). В органический слой последовательно промывали 10% карбонатом натрия (2×20 мл), насыщенным раствором соли (20 мл). Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением остатка.

Полученный остаток забирали в метиленхлорид (20 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту



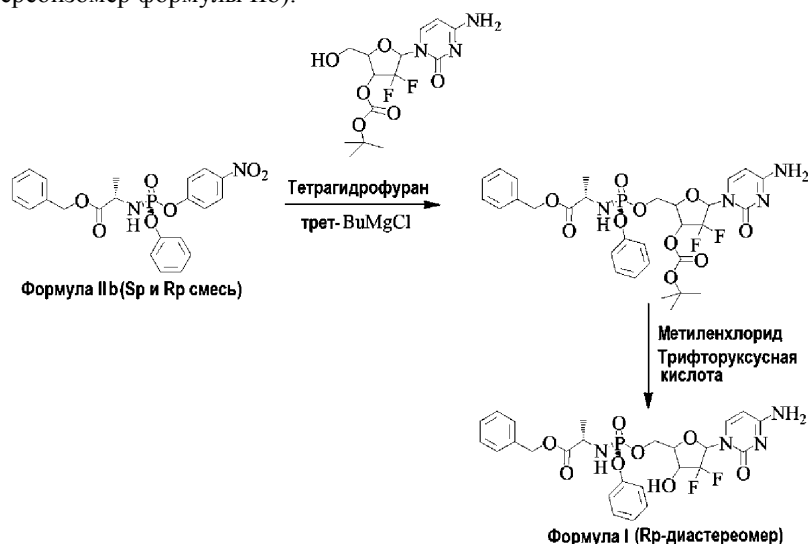
(7,4 мл) при 0-5°C. Реакционную массу выдерживали при 25-35°C в течение 2 ч и гасили в растворе 20% карбоната натрия (30 мл). Экстрагировали этилацетатом (66 мл), органический слой сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме при 40-45°C. Полученный остаток (3 г;  $S_p$  - 85,98%) очищали методом колоночной хроматографии, элюируя смесью 2-10% изопропанол в метиленхлориде. Содержащие продукт фракции собирали и концентрировали в вакууме, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

Выход: 1,1 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 97,88:0,48% ( $S_p$ : $R_p$ ).

Пример 7.

Получение  $R_p$ -диастереоизомера гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата формулы I (используя  $R_p$ -диастереоизомер формулы IIb).



К перемешиваемой смеси 3'-О- (трет-бутоксикарбонил)гемцитабина (2 г) в тетрагидрофуране (30 мл) добавляли N-метилпиридин (2 мл), трет-бутилмагнийхлорид (5,5 мл, 2,0М в тетрагидрофуране) и  $R_p$ -диастереоизомер бензилового эфира 2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфирамино]пропионовой кислоты формулы IIb (4 г, разбавленный в 20 мл тетрагидрофурана) при (0°C)- (-5°C), температуру повышали до 25-30°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. После завершения реакции реакционную массу гасили в 0,5N хлористоводородной кислоте (20 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×30 мл). Органический слой последовательно промывали 10% карбонатом натрия (2×20 мл), насыщенным раствором соли (20 мл). Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме, с получением остатка.

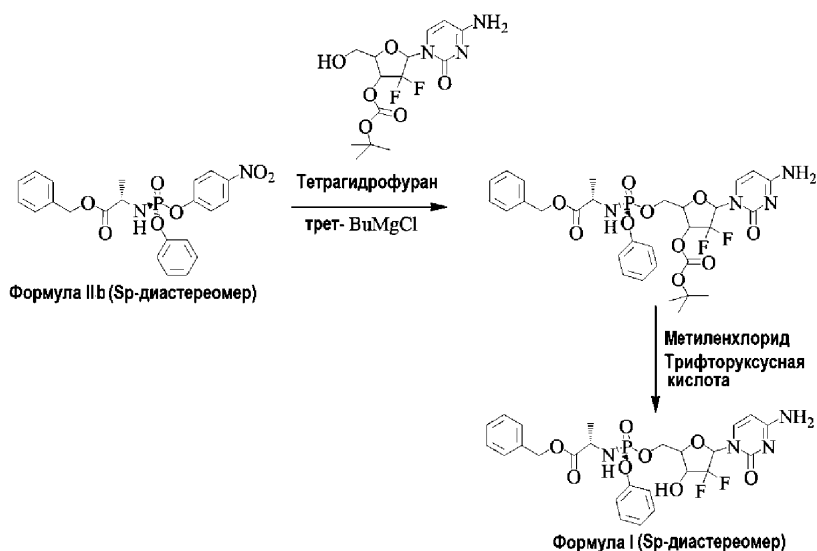
Полученный остаток забирали в метиленхлорид (20 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (7,4 мл) при 0-5°C. Реакционную массу выдерживали при 25-35°C в течение 2 ч и гасили 20% раствором карбоната натрия (30 мл). Экстрагировали этилацетатом (66 мл), органический слой сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме при 40-45°C. Полученный остаток (2,9 г;  $R_p$ -84,05%) очищали методом колоночной хроматографии, элюируя смесью 2-10% изопропанол в метиленхлориде. Содержащие продукт фракции собирали и концентрировали в вакууме, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

Выход: 1,4 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 97,99:0,86% ( $R_p$ : $S_p$ ).

Пример 8.

Получение  $S_p$ -диастереоизомера гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата формулы I (используя изомеризованный  $S_p$ -диастереоизомер формулы IIa примера 3).



К перемешиваемой смеси 3'-O- (трет-бутоксикарбонил)гемцитабина (5 г) в тетрагидрофуране (75 мл) добавляли трет-бутилмагнийхлорид (15,2 мл, 2,0М в тетрагидрофуране) и  $S_p$ -диастереоизомер бензильного эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафторфеноксифосфорилиламино)пропионовой кислоты формулы IIa (8,3 г из примера 3 (99,92%); разбавленный в 50 мл тетрагидрофурана) при (0°C)-(-5°C), температуру повышали до 25-30°C и перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре. После завершения реакции, реакцию гасили добавлением 0,5N хлористоводородной кислоты (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×75 мл). Органический слой последовательно промывали 10% карбонатом натрия (2×50 мл), насыщенным раствором соли (50 мл). Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением остатка.

Полученный остаток забирали в метиленхлорид (50 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (18,5 мл) при 0-5°C. Реакционную массу выдерживали при 25-35°C в течение 2 ч и гасили добавлением раствора 20% карбоната натрия (125 мл). Экстрагировали этилацетатом (165 мл), органический слой сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме при 40-45°C. Полученный остаток суспендировали в смеси 50% этилацетат в гептане (150 мл), с получением указанного в заголовке соединения.

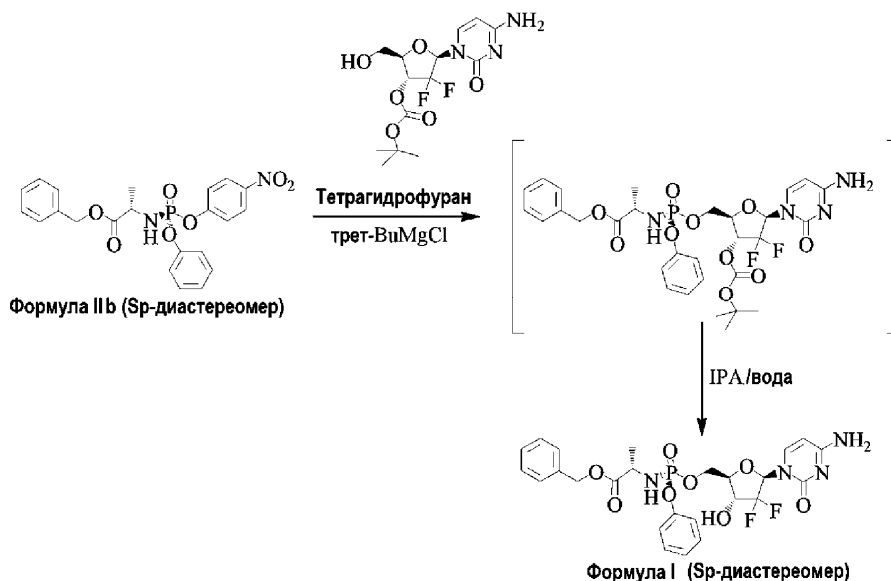
Выход: 4,9 г.

Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 99,72% ( $S_p$ -диастереоизомер).

Следует понимать, что могут быть произведены различные модификации вариантов осуществления, раскрываемых в настоящем описании. Поэтому приведенное выше описание должно толковаться не как ограничение, а как просто иллюстративный пример предпочтительного варианта осуществления. Например, функции, описанные выше и реализованные в качестве наилучшего метода при осуществлении настоящего изобретения, являются только иллюстративными. Другие варианты и методы могут быть осуществлены специалистом в данной области техники, не отходя от существа и объема настоящего изобретения. Кроме того, специалист в данной области сможет предоставить другие модификации в объеме и сущности настоящего изобретения, содержащихся в прилагаемых пунктах формулы изобретения.

Пример 9.

Получение  $S_p$ -диастереоизомера NUC-1031 (используя  $S_p$ -диастереоизомер формулы IIb) при использовании смеси IPA/вода для удаления защиты.

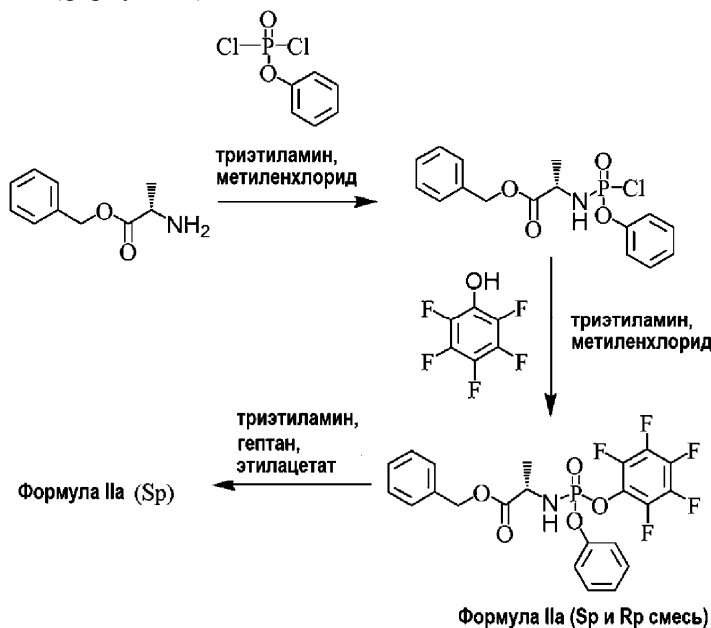


К перемешиваемой смеси 3'-О- (трет-бутоксикарбонил)гемцитабина (100 г) в тетрагидрофуране (1 л) добавляли трет-бутилмагнийхлорид (292 мл, 2,0 М в тетрагидрофуране) и  $S_p$ -диастереоизомер бензилового эфира 2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты формулы IIb (166 г, разбавленный в 700 мл тетрагидрофурана) при (-5°C)-(-0°C), температуру повышали до 25-30°C и перемешивали в течение 3 ч при этой же температуре. После завершения реакции реакционную массу гасили добавлением 0,5Н хлористоводородной кислоты (1л) и экстрагировали этилацетатом. Органический слой последовательно промывали 10% карбонатом натрия, водой и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяли и концентрировали в вакууме, с получением остатка. К остатку добавляли изопропиловый спирт (IPA; 850 мл), воду (2,5 л) и смесь нагревали до 75°C в течение 3 ч перед добавлением еще воды (2,5 л) и смесь охлаждали до 25°C и фильтровали. Полученное в результате твердое вещество промывали этилацетатом и сушили.

Получали 124 г продукта (78%). Хиральная чистота по данным ВЭЖХ (% площади пиков): 99,95% ( $S_p$ -диастереоизомер).

Пример 10.

Получение бензилового эфира ( $S_p$ )-2-[(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (формула IIa).



К перемешиваемой смеси бензилового эфира L-аланина.HCl (100 г) в 1000 мл метиленхлорида добавляли фенилдихлорфосфат (97,8 г) при 30°C. Смесь охлаждали до -20°C и медленно добавляли триэтиламин (93,8 г), поддерживая температуру при -20°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -20°C, затем нагревали до 10°C (10±5) и перемешивали в течение еще 1,5 ч.

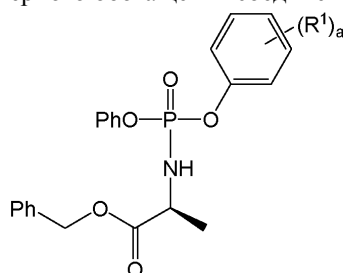
Медленно добавляли раствор пентафторфенола (85,3 г) в 100 мл метиленхлорида при 10°C, с последующим медленным добавлением триметиламина (46,8 г), поддерживая температуру при 10°C. В ре-

акционную массу медленно добавляли 46,9 г триэтиламина при 10°C (10±5) в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 10°C перед гашением при медленном добавлении 0,5Н раствора HCl, поддерживая температуру при 10°C. После нагревания до комнатной температуры смесь разделяли, и органические фракции промывали насыщенным бикарбонатным раствором, дистиллированной водой и насыщенным раствором соли перед концентрированием в вакууме.

Неочищенную смесь суспендировали в 1500 мл 20% этилацетата в н-гептане при 25°C. Добавляли триэтиламин (12,2 г) и полученную смесь перемешивали при 25°C. Смесь фильтровали и полученное твердое вещество растворяли в 2500 мл этилацетата, промывали водой и насыщенным раствором соли и концентрировали в вакууме. Твердое вещество суспендировали в 1200 мл 20% этилацетата в н-гептане, перемешивали в течение 45-60 мин и фильтровали. Полученное вещество сушили в вакууме с получением требуемого продукта. Выход составлял в диапазоне от 40 до 80%, и диастереоизомерная чистота составляла свыше 99%.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Способ диастереоизомерного обогащения соединения формулы II



Формула II,

включающий

а) суспендирование или растворение ( $R_p$ )-диастереоизомера соединения формулы II, где  $R^1$  представляет собой электроноакцепторную группу и  $a$  равен целому числу от 1 до 5, или смеси ( $R_p$ )- и ( $S_p$ )-диастереоизомеров соединения формулы II в растворителе (S2);

б) обработку данного раствора или суспензии основанием (B2) с получением ( $S_p$ )-диастереоизомера, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%; где основание (B2) представляет собой органическое аминное основание или неорганическое основание, выбранное из группы, состоящей из гидроксида щелочного металла, карбонатов щелочных металлов, алкоксидов щелочных металлов, арилоксидов щелочных металлов; и

с) выделение ( $S_p$ )-диастереоизомера формулы II, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий

получение соединения формулы II в виде смеси ( $R_p$ ) - и ( $S_p$ )-диастереоизомеров;

где стадия а) включает суспендирование или растворение смеси ( $R_p$ )- и ( $S_p$ )-диастереоизомеров соединения формулы II в растворителе (S2).

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где B2 представляет собой органическое аминное основание.

4. Способ по п.3, где органическое аминное основание представляет собой органический первичный, вторичный, третичный амин; необязательно где органическое аминное основание представляет собой триэтиламин.

5. Способ по п.3, где органическое аминное основание представляет собой N-метилимидазол, имидазол, необязательно замещенный пиридин или триалкиламин.

6. Способ по любому из пп.1-5, где S2 представляет собой гексан или гептан.

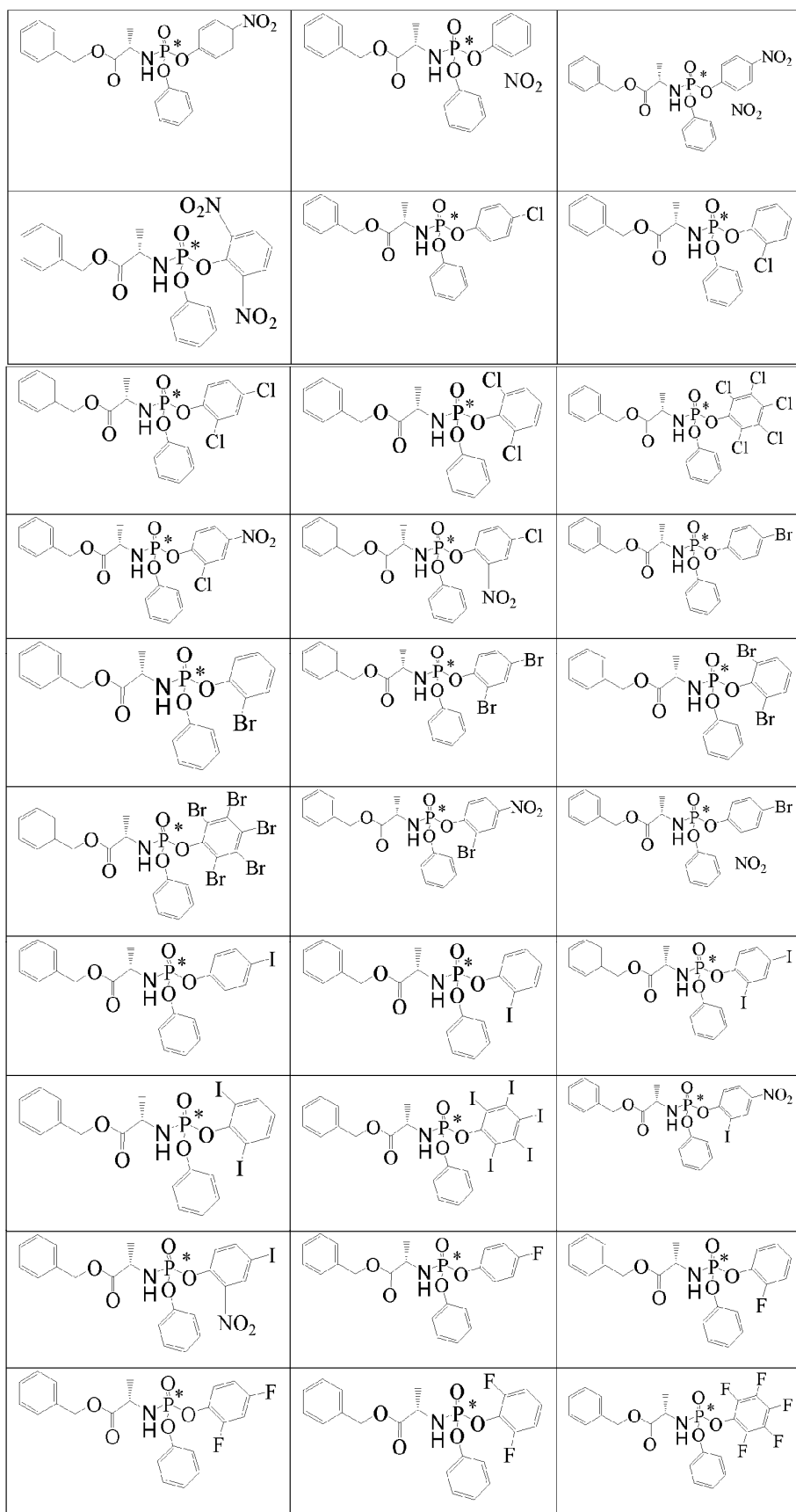
7. Способ по любому из пп.1-5, где S2 представляет собой смесь гексана или гептана и полярного органического растворителя, содержащую свыше 50% по объему гексана или гептана.

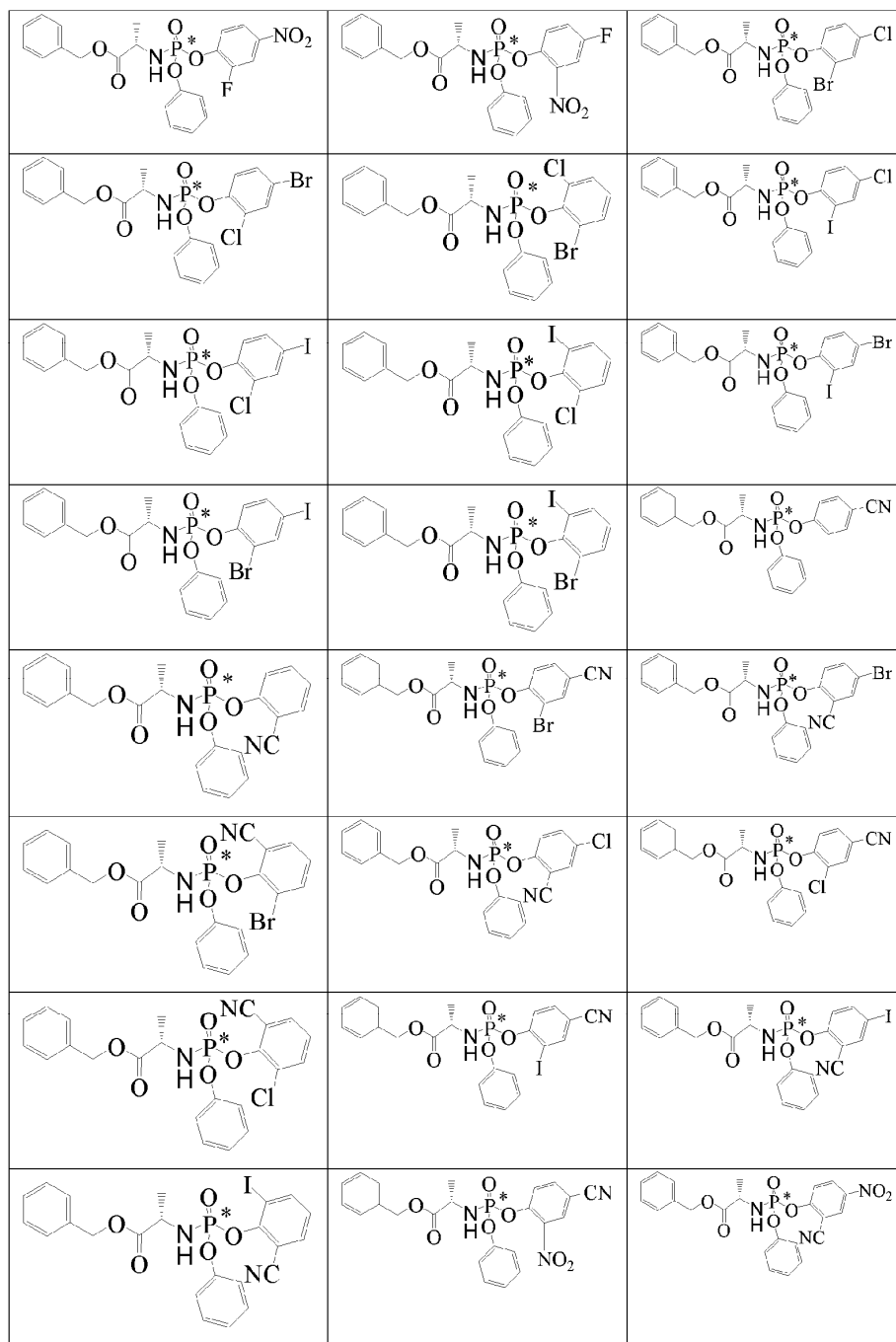
8. Способ по п.7, где S2 представляет собой смесь гептана или гексана и этилацетата, содержащую свыше 50% по объему гептана или гексана.

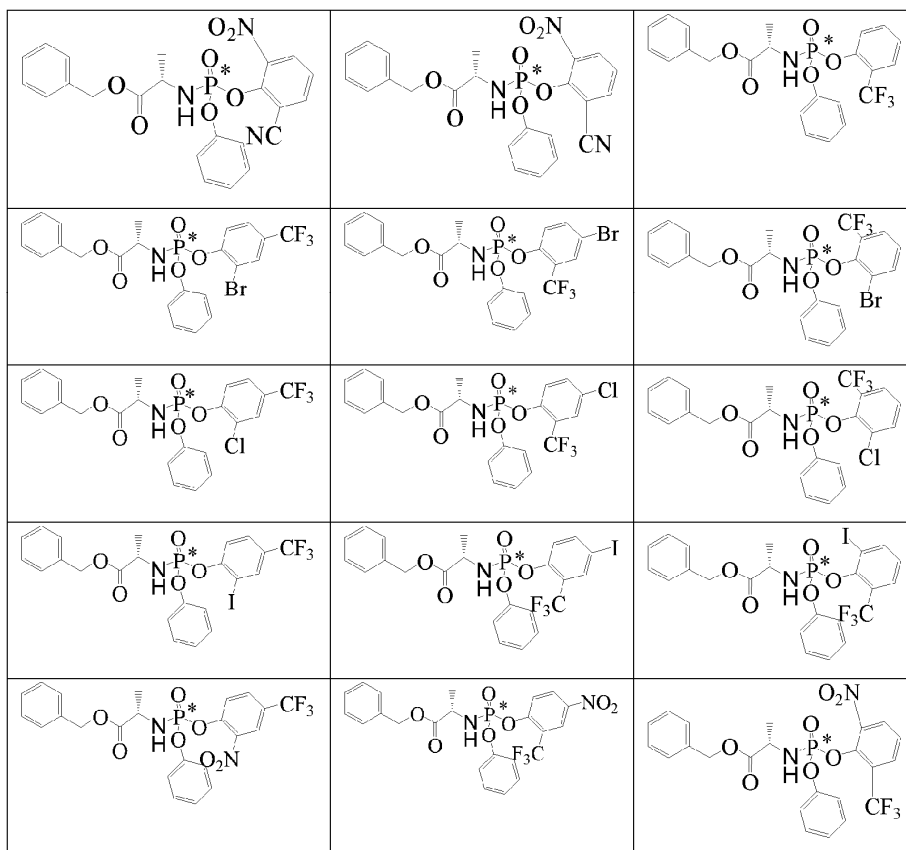
9. Способ по любому из пп.1-8, где стадия б) включает перемешивание смеси соединения формулы II и основания B2 в течение 6 ч или дольше.

10. Способ по любому из пп.1-9, где стадия б) включает перемешивание смеси соединения формулы II и основания B2 при температуре от 0 до 50°C.

11. Способ по любому из пп.1-10, где соединение формулы II представляет собой соединение, выбранное из

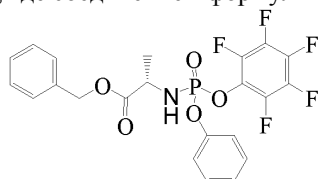




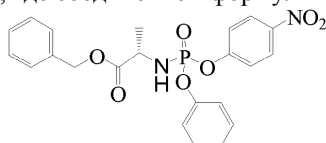


\*обозначает хиральный центр

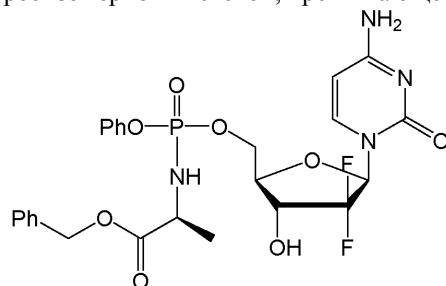
12. Способ по любому из пп.1-10, где соединением формулы II является



13. Способ по любому из пп.1-10, где соединением формулы II является



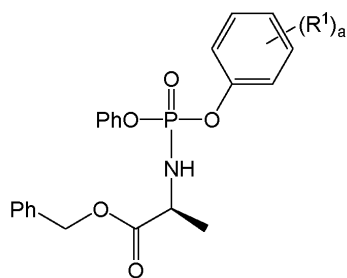
14. Способ получения ( $S_p$ )-диастереоизомера гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата (формула I), обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%



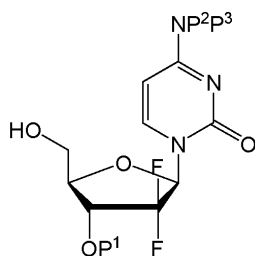
Формула I

включающий способ по любому из пп.1-13; затем стадию d):

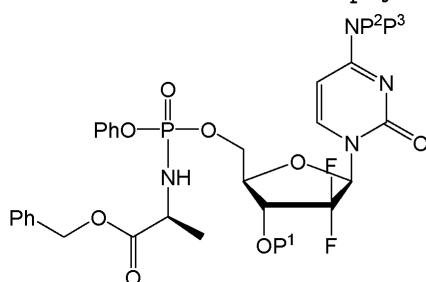
d) взаимодействие ( $S_p$ )-диастереоизомера формулы II, полученного на стадии (с) способа по любому из пп.1-13, с соединением формулы III в присутствии основания (B1), с получением соединения формулы IV, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%, где  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  независимо представляют собой водород или защитную группу



Формула II



Формула III и



Формула IV;

и, в случае когда любой один или более из  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  представляет собой защитную группу, стадию е):

е) удаление защитных групп  $P^1$ ,  $P^2$  и  $P^3$  из соединения формулы IV с получением гемцитабин[фенил(бензокси-L-аланинил)]фосфата, обладающего диастереоизомерной чистотой, превышающей 95%.

15. Способ по п.14, где  $P^1$  представляет собой  $-C(O)O_{C_1-C_6}$ -алкил или необязательно замещенный  $-C(O)OCH_2$ -арил.

16. Способ по п.15, где  $P^1$  представляет собой  $-C(O)O^tBu$ .

17. Способ по п.16, где стадию е) осуществляют путем взаимодействия продукта стадии d) со смесью  $C_1-C_4$ -спирта и воды.

18. Способ по любому из пп.14-17, где  $P^2$  представляет собой H.

19. Способ по любому из пп.14-18, где  $P^3$  представляет собой H.

20. Способ по любому из пп.14-19, где  $B1$  представляет собой реактив Гриньяра.

21. Способ по п.20, где  $B1$  представляет собой  $^tBuMgCl$ .

22. Способ по любому из пп.14-21, где стадию d) проводят в растворителе, представляющем собой простой эфир.

23. Способ по п.22, где стадию d) проводят в ТГФ.

