



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115746073 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 07

(21) 申请号 202210687635.8

(22) 申请日 2016.12.09

(30) 优先权数据

1602185.9 2016.02.08 GB

6635/CHE/2015 2015.12.11 IN

(62) 分案原申请数据

201680081573.9 2016.12.09

(71) 申请人 努卡那有限公司

地址 英国爱丁堡

申请人 劳拉斯实验室有限公司

(72) 发明人 玛尼·布尚·科塔拉

文卡塔·拉克希米·纳拉辛哈·拉

奥·达马拉帕蒂

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int.Cl.

C07H 19/10 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书22页

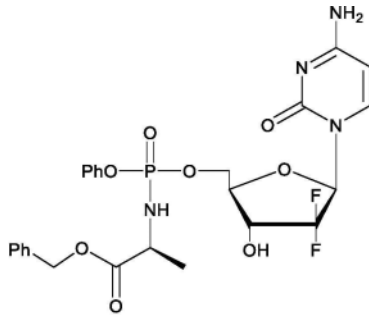
(54) 发明名称

磷酸酯衍生物和吉西他滨前药NUC-1031的
非对映选择性合成

(57) 摘要

磷酸酯衍生物和吉西他滨前药NUC-1031的
非对映选择性合成。本发明提供了制备用于合成
吉西他滨-[苯基-苄氧基-L-丙氨酰基]-磷酸酯
的中间体的方法。还提供了制备吉西他滨-[苯
基-苄氧基-L-丙氨酰基]-磷酸酯的方法。

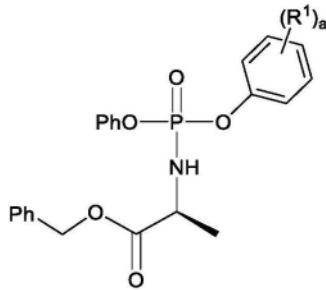
1. 一种制备非对映异构纯度大于约95%的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯(式I)的方法:



式 I

所述方法包括步骤a) 到e) :

a) 将式II化合物的 (R) - 非对映异构体悬浮或溶解在溶剂(S2) 中:



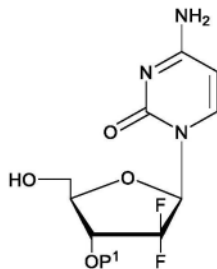
式 II

其中R¹是吸电子基团; 并且a是1到5之间的整数, 或将式II化合物的 (R) - 和 (S) - 非对映异构体混合物悬浮或溶解在溶剂(S2) 中;

b) 用碱B2处理溶液或悬浮液以得到非对映异构纯度大于约95%的 (S) - 非对映异构体;

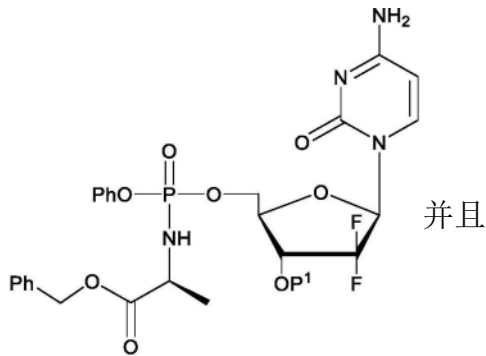
c) 分离非对映异构纯度大于约95%的式II的 (S) - 非对映异构体;

d) 使非对映异构纯度大于约95%的式II化合物与式III化合物在碱B1的存在下反应, 以提供非对映异构纯度大于约95%的式IV化合物的 (S) - 非对映异构体,



式 III

其中P¹基团选自 -C(O)C₁-C₆烷基、-C(O)芳基、-C(O)OC₁-C₆烷基和 -C(O)OCH₂-芳基,



式 IV ;

e) 从式IV化合物上除去P¹基团以提供非对映异构纯度大于约95%的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯(式I)。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中R¹选自氟、氯、氰基、三氟甲基和硝基。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中R¹是氟并且a是5。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中R¹是氯并且a是5。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中R¹选自三氟甲基、硝基或氰基,并且a是1。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中P¹是-C(O)O-tBu。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中步骤e)在C₁₋₄-醇和水的混合物中进行。
8. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中S2是包含烃的混合物。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中S2是己烷或庚烷与极性有机溶剂的混合物。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中S2是庚烷和乙酸乙酯的混合物。
11. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中B2是叔胺。
12. 权利要求11所述的方法,其中B2是三乙胺。
13. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中步骤b)包括将式II化合物和B2搅拌多达36小时。
14. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中B1是tBuMgCl或tBuMgBr。
15. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中步骤d)在THF中进行。
16. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,用于制备非对映异构纯度大于约98%的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯(式I)。
17. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,用于制备非对映异构纯度大于约99%的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯(式I)。

磷酸酯衍生物和吉西他滨前药NUC-1031的非对映选择性合成

[0001] 本发明是申请日为2016年12月9日,题为《磷酸酯衍生物和吉西他滨前药NUC-1031的非对映选择性合成》的中国发明专利申请201680081573.9的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明大体上涉及使用新型氨基磷酸酯中间体制备吉西他滨-[苯基-苄氧基-L-丙氨酰基]-磷酸酯的新方法。

背景技术

[0003] 许多核苷类似物如阿糖胞苷(cytarabine)、氟达拉滨(fludarabine)、克拉屈滨(cladribine)、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨(gemcitabine)和喷司他丁(pentostatin)在临床上用作高效抗肿瘤剂。其中,吉西他滨(2',2'-二氟-2'-脱氧胞苷;作为GemzarTM销售)由于其对实体瘤的独特活性而受到特别关注。它目前被批准用于治疗乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌和胰腺癌,并广泛用于治疗多种其他癌症,包括膀胱癌、胆道癌、结肠直肠癌和淋巴瘤。

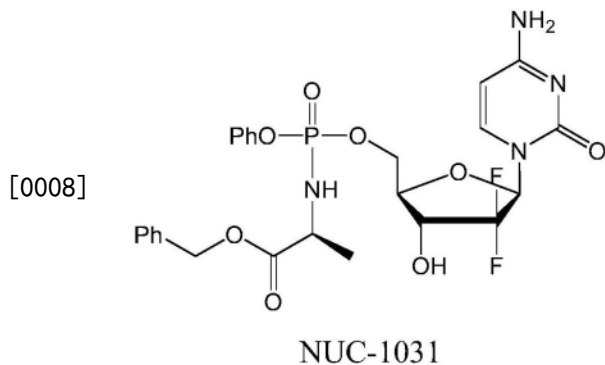
[0004] 据信,这种核苷类似物的几种独特的自增强机制是吉西他滨对实体瘤具有活性的原因。吉西他滨的二磷酸盐代谢物抑制核糖核苷酸还原酶,导致细胞内脱氧胞苷三磷酸(dCTP)的浓度较低,因此结合到DNA中的三磷酸吉西他滨代谢物增加,导致DNA合成抑制并阻断细胞分裂循环的完成。另外,dCTP浓度的降低上调酶胞苷激酶,酶胞苷激酶负责吉西他滨的初始磷酸化,吉西他滨的初始磷酸化是药物抑制DNA合成的必要步骤。最后,吉西他滨的三磷酸代谢物是胞苷脱氨酶的抑制剂,其通过转化为尿苷代谢物而负责吉西他滨失活。因此,上述因素的加成性质可以解释吉西他滨在治疗实体瘤中的功效。

[0005] 由于ProTides的亲脂性质,这些分子可以将核苷单磷酸盐直接递送到完整的肿瘤细胞中。先前的研究已经表征了核苷类似物药物及其衍生物的多细胞转运机制(综述参见Balimane等人,Adv. Drug Delivery Rev. 1999, 39, 183-209)。吉西他滨是一种相对亲水的化合物,其通过被动扩散渗透质膜的能力有限,并且一些研究已经证明,吉西他滨是平衡核苷转运蛋白和浓缩核苷转运蛋白(分别为ENT和CNT)的底物。具体地,吉西他滨通过人ENT1、ENT2、CNT1和CNT3转运,但不通过嘌呤选择性浓缩转运蛋白CNT2转运(参见Mackey等人, Cancer Res. 1998, 58, 4349-4357; Mackey等人, J. Natl. Cancer Inst. 1999, 91, 1876-1881; 和Fang等人, Biochem. J. 1996, 317, 457465)。

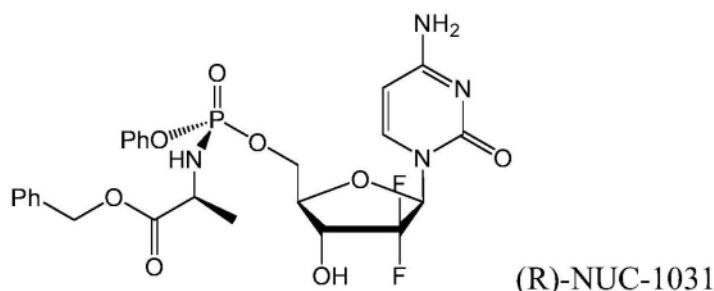
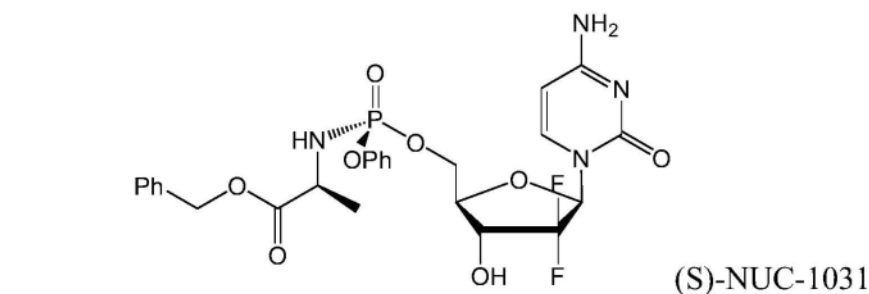
[0006] 美国专利号4,808,614公开了2,2'-二氟核苷,它们是已知的抗病毒和抗肿瘤剂,特别是2',2'-二氟-2'-脱氧胞苷(通常称为吉西他滨)。

[0007] 美国专利号7,951,787公开了核苷酸的氨基磷酸酯衍生物,例如2'-脱氧-2',2'-二氟-D-胞苷-5'-O-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯(也称为吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯或NUC-1031)。在该专利中公开了化学合成这些衍生物的方法,通过在N-甲基咪唑的存在下使吉西他滨或其结构变体与磷酸氯化物的非对映异构体混合物(如式II的苯基-(苄氧基-L-丙氨酰基)-磷酰氯)反应,然后通过柱色谱法纯化产物,用二氯甲烷/

甲醇95:5洗脱,得到纯产物,为白色泡沫状固体,产率极低,为16%。



[0009] 通常将NUC-1031制备成在磷酸酯中心差向异构的两种非对映异构体的混合物。NUC-1031的非对映异构体具有以下结构:



[0011] NUC-1031极度亲脂,因此水溶性差(通过计算: $<0.1\text{mg/mL}$),并且可电离部分的计算pKas在适合肠胃外施用的pH范围之外。无论盐含量或pH如何,它基本上不溶于水,这影响了用于以足够高的剂量递送化合物以进行有效治疗的制剂的开发。还影响了能够经济高效地生产NUC-1031的高效制造工艺的开发。

[0012] 最近发现,吉西他滨-[苯基-苄氧基-L-丙氨酰基]-磷酸酯的(S)-差向异构体在许多极性有机溶剂与水的混合物中具有足够的溶解度,使其适合于作为治疗剂配制和施用。(R)-差向异构体的溶解度相当低。在某些溶剂混合物中,(S)-差向异构体和(R)-差向异构体之间的溶解度差异超过100倍。因此,预计使用(S)-差向异构体可以开发出比使用(R)-差向异构体或使用混合物在临床上更有效的、更实用的且更具患者友好性的施用方法。因此,希望能够提供基本上非对映异构纯形式的吉西他滨-[苯基-苄氧基-L-丙氨酰基]- (S)-磷酸酯。

[0013] NUC-1031在许多溶剂中,特别是使用HPLC分离化合物中通常使用的那些溶剂中溶解度低,这意味着对于基于HPLC的任何分离都需要大量溶剂。这意味着基于HPLC的任何工业规模分离工艺都将是高成本的、消耗大量能量和材料并且产生大量废物。

[0014] 尽管在提交本申请时,似乎优选施用(S)-差向异构体形式的吉西他滨-[苯基-苄

氧基-L-丙氨酰基]-磷酸酯,但人们还是会设想需要获得非对映异构纯形式的(R)-差向异构体的理由。这些包括进行对比试验,将(R)-差向异构体转化为(S)-差向异构体,或因为(R)-差向异构体提供超越其低溶解度的优于(S)-差向异构体的益处。

[0015] 事实上,已证明在与分离的人肝细胞孵育时,(R)-差向异构体的半衰期是(S)-差向异构体的四倍。与(R)-差向异构体相关的较长半衰期表明较低的内在清除率并且应该导致与(S)-差向异构体不同的药代动力学和药效学特征,这可以提供一些益处。

[0016] (S)-和(R)-差向异构体均具有治疗活性。

[0017] WO 2014/076490公开了制备核苷前药如吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯的方法,通过在催化剂的存在下使吉西他滨或其结构变体与磷酸氯化物的非对映异构体混合物反应,所述催化剂包括金属盐,如 $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, CuCl , CuBr , CuI , $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{OC}(\text{O})\text{CF}_3)_2$, $\text{Me}(\text{OTf})_3$, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, $\text{Fe}(\text{OTf})_3$, $\text{La}(\text{OTf})_3$,产率为45%。

[0018] 本发明某些实施方案的目的是提供一种提供基本上非对映异构纯形式的吉西他滨-[苯基-苄氧基-L-丙氨酰基]- (S)-磷酸酯的方法。

[0019] 本发明某些实施方案的目的是提供一种提供基本上非对映异构纯形式的吉西他滨-[苯基-苄氧基-L-丙氨酰基]- (R)-磷酸酯的方法。

[0020] 本发明某些实施方案的目的是提供一种提供基本上非对映异构纯形式的(S)和/或(R)-差向异构体的方法,所述方法是可规模化的(scalable)、经济的和/或有效的,例如,比使用HPLC的方法更可规模化、经济和/或有效。因此,本发明某些实施方案的目的是提供一种适用于大规模生产的提供基本上非对映异构纯形式的(S)和/或(R)-差向异构体的方法。

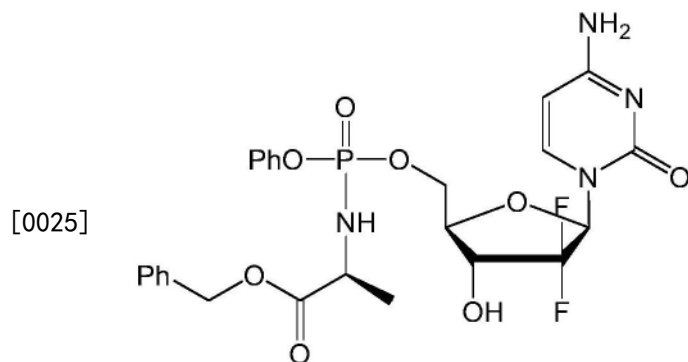
[0021] 本发明某些实施方案的目的是提供一种简单的方法,即涉及提供基本上非对映异构纯形式的(S)和/或(R)-差向异构体的最少数量的工艺步骤和/或试剂的方法。

[0022] 本发明某些实施方案的另一个目的是提供一种方法,所述方法确保以基本上非对映异构纯的形式提供分离的(S)-或(R)-差向异构体,同时达到或超过诸如美国FDA之类的组织规定的关于由合成和分离产生的任意痕量杂质的数量和性质的必要标准。

[0023] 本发明的某些实施方案满足上述目的中的一些或所有。

发明内容

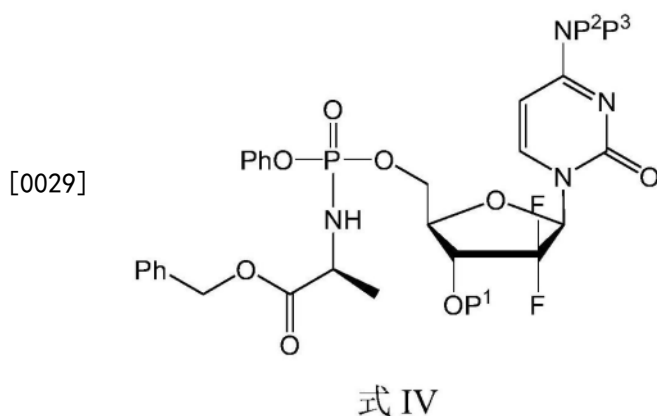
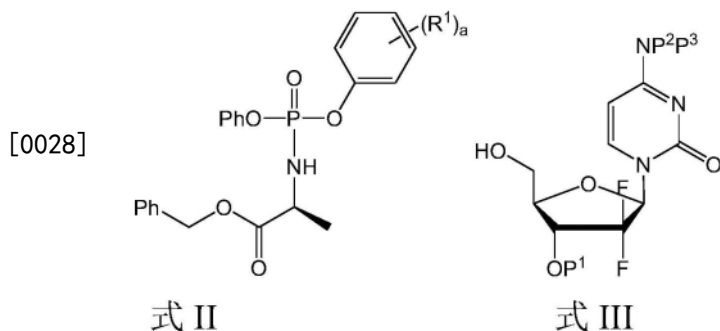
[0024] 根据本发明的第一方面,提供了制备基本上非对映异构纯形式的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯(式I)的方法:



式 I

[0026] 所述方法包括步骤a) 和任意的步骤b) :

[0027] a) 使式II化合物与式III化合物在碱(B1)的存在下反应, 以提供基本上非对映异构纯形式的式IV化合物; 其中 R^1 代表吸电子基团, a是从1至5的整数; 其中 P^1 、 P^2 和 P^3 独立地代表氢或保护基团; 并且其中式II化合物为基本上非对映异构纯的形式:



[0030] b) 其中 P^1 、 P^2 和 P^3 中的任意一个或多个是保护基团, 任选地从式IV化合物上除去保护基团 P^1 、 P^2 和 P^3 以提供基本上非对映异构纯形式的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯。

[0031] R^1 可选自由以下组成的组: 卤素基团(例如选自氟、溴、氯或碘); 三氟甲基、氰基和硝基。a是1到5之间的整数。 R^1 可以在每次出现时都是卤素, 例如氟。a可以是5。

[0032] 取代的苯氧基的取代通过磷酸盐立体化学的转化发生。因此, 前体的(S)-非对映异构体提供NUC-1031的(S)-非对映异构体, 前体的(R)-非对映异构体提供NUC-1031的(R)-非对映异构体。

[0033] 因此, 第一方面的方法可以是制备非对映异构体富集形式的NUC-1031的(S)-非对映异构体的方法, 并且式II化合物是非对映异构体富集形式的(S)-非对映异构体。

[0034] 碱(B1)可以是氮碱。氮碱包括N-烷基咪唑(例如N-甲基咪唑(NMI)), 咪唑, 任意取代的吡啶(例如可力丁(collidine), 吡啶, 2,6-二甲基吡啶)和三烷基胺(例如三乙胺和二异丙基乙胺)。或者, 碱(B1)可以是有机金属碱或金属氢化物碱(例如NaH)。因此, 碱可以是格氏试剂(Grignard reagent)(即烷基卤化镁)。示例性的格氏试剂包括叔丁基镁卤化物, 例如tBuMgCl、tBuMgBr。优选地, 碱是tBuMgCl。

[0035] 该方法可在溶剂S1中进行。

[0036] 在本发明的第二方面, 提供了一种式II化合物的非对映异构体富集方法; 所述方法包括:

[0037] c) 将式II化合物的R-非对映异构体或式II化合物的(R)-和(S)-非对映异构体混

合物悬浮或溶解在溶剂(S2)中,

[0038] d) 用碱(B2)处理溶液或悬浮液以得到基本上非对映异构纯形式的(S)-非对映异构体,以及

[0039] e) 分离式II的(S)-非对映异构体。

[0040] 本发明人惊奇地发现,用碱处理式II化合物时,它们异构化,优先形成(S)-非对映异构体而非(R)-非对映异构体。因此,(R)-非对映异构体可转化成(S)-非对映异构体,或者(R)-非对映异构体和(S)-非对映异构体的差向异构体混合物可以转化为(S)-非对映异构体。这提高了结合了第一方面的方法的制备NUC-1031的(S)-非对映异构体的任意合成顺序的净效率,因为它意味着所有式II化合物,甚至最初形成的(R)-非对映异构体均可被利用,不会废弃任何一种。

[0041] 所述方法可包括:

[0042] 形成(R)-和(S)-非对映异构体混合物形式的式II化合物;并且步骤c)包括将式II化合物的(R)-和(S)-非对映异构体混合物悬浮或溶解在溶剂(S2)中。

[0043] 在第一方面的方法中使用的式II化合物可以是根据第二方面的方法形成的(S)-非对映异构体。

[0044] 碱(B2)可以选自由以下组成的组:有机胺碱(例如伯胺,仲胺,叔胺,环胺;示例性有机胺碱包括碱包括N-烷基咪唑,(例如N-甲基咪唑(NMI),咪唑,任意取代的吡啶,(例如可力丁,吡啶,2,6-二甲基吡啶)和三烷基胺(例如三乙胺和二异丙基乙胺));或无机碱(例如碱金属氢氧化物,碱金属碳酸盐,碱金属醇盐,碱金属芳族醚(aryloxide))。优选地,B2是叔胺。因此,B2可以是三烷基胺。最优选地,B2是三乙胺。

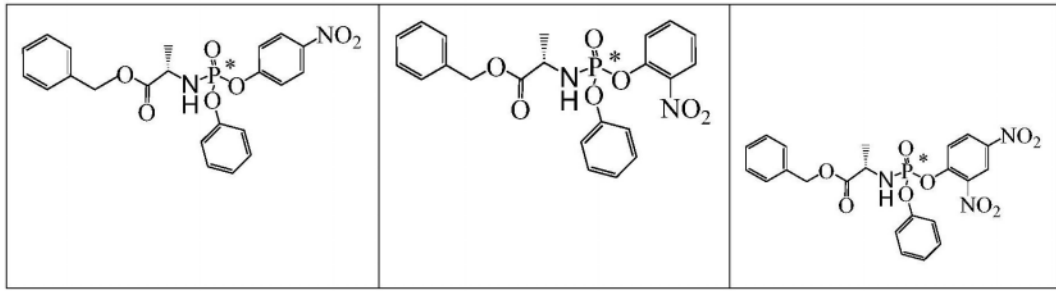
[0045] 溶剂S2可以选自由以下组成的组:酰胺,醚,酯,酮,芳烃,卤代溶剂,腈,亚砷,砷及其混合物。S2可以是有机溶剂。有机溶剂包括但不限于醚(例如四氢呋喃,二恶烷,乙醚);酮(例如丙酮和甲基异丁基酮);卤代溶剂(如二氯甲烷,氯仿和1,2-二氯乙烷);烃类(例如环己烷,戊烷,己烷,庚烷),芳族溶剂(例如苯和甲苯),酯(例如乙酸乙酯)和酰胺(例如DMF,NMP);或其混合物。优选地,S2是烃或包含烃的混合物。当S2是混合物时,它可以是包含超过50%(例如超过70%)的烃的混合物,S2可以是烃。烃可以是己烷。烃可以是庚烷。S2可以是己烷或庚烷与极性有机溶剂(例如醚,酯,醇或卤代溶剂)的混合物。S2可以是己烷或庚烷与极性有机溶剂的混合物,该混合物包含超过50体积%(例如超过70体积%)的己烷或庚烷。S2可以是己烷或庚烷和乙酸乙酯的混合物。S2可以是庚烷和乙酸乙酯的混合物。S2可以是己烷或庚烷与乙酸乙酯的混合物,该混合物包含超过50体积%(例如超过70%)的己烷或庚烷。S2可以是庚烷和乙酸乙酯的混合物,该混合物包含超过50体积%(例如超过70%)的庚烷。

[0046] 步骤d)可以涉及将式II化合物和碱B2的混合物搅拌2小时或更长时间。步骤d)可以涉及将式II化合物和碱B2的混合物搅拌6小时或更长时间。步骤d)可以涉及将式II化合物和碱B2的混合物搅拌10小时或更长时间。步骤d)可以涉及将式II化合物和碱B2的混合物搅拌16小时或更长时间。步骤d)可以涉及将式II化合物和碱B2的混合物搅拌多达36小时。

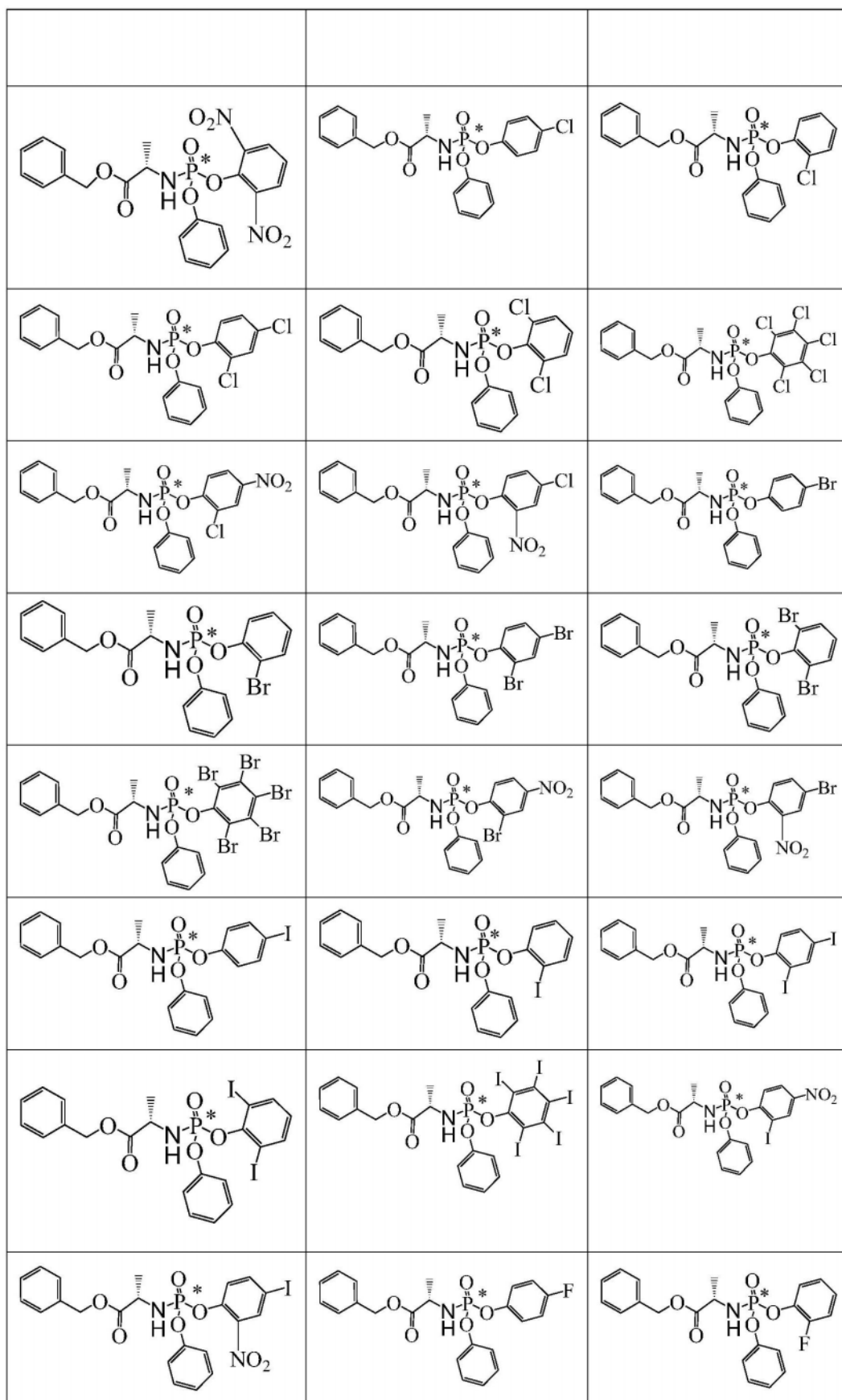
[0047] 步骤d)可以涉及在0至50°C的温度下搅拌式II化合物和碱B2的混合物。步骤d)可以涉及在10至35°C的温度下搅拌式II化合物和碱B2的混合物。

[0048] 在某些具体实施方案中,式II化合物是选自以下的化合物:

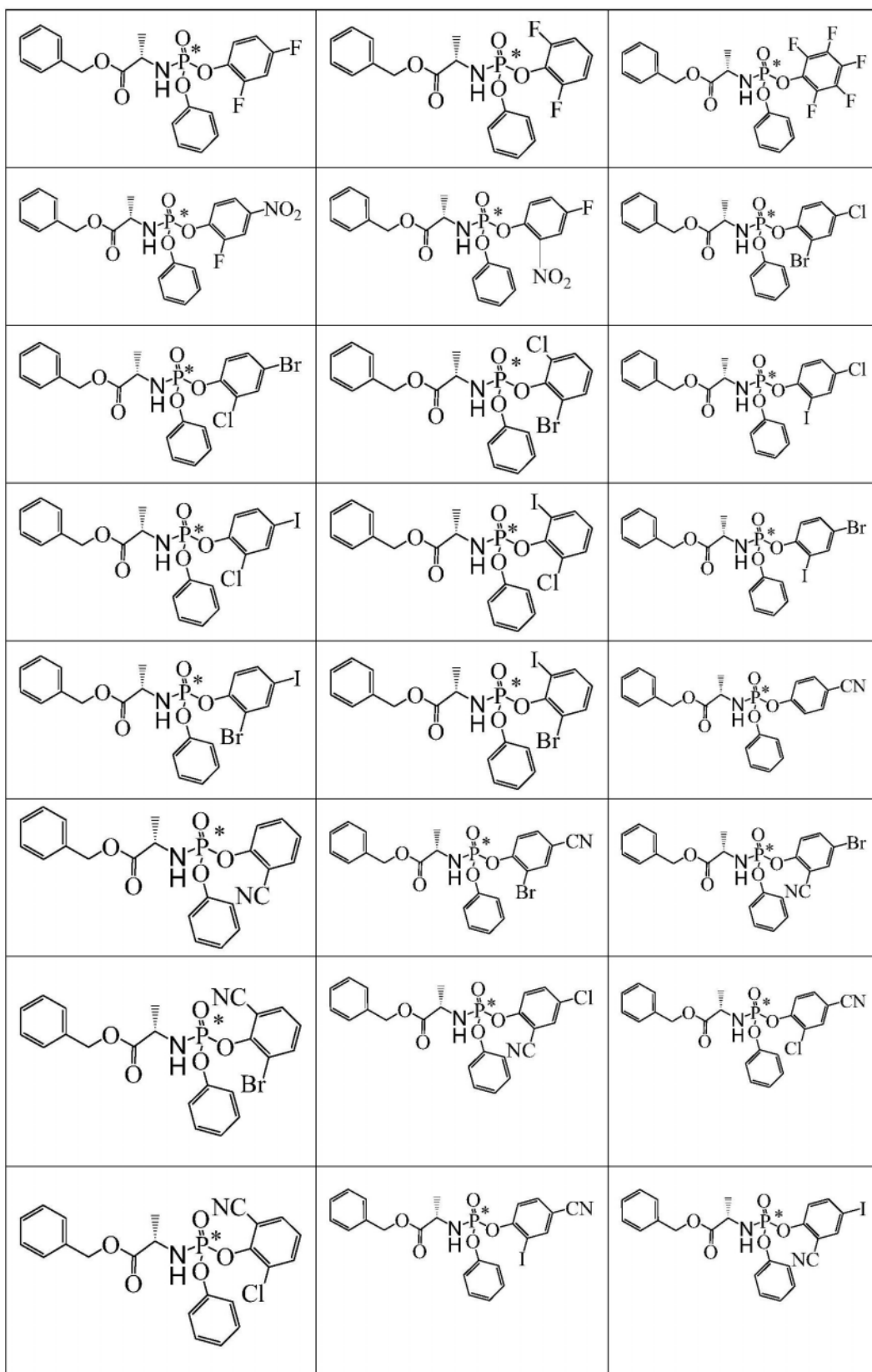
[0049]



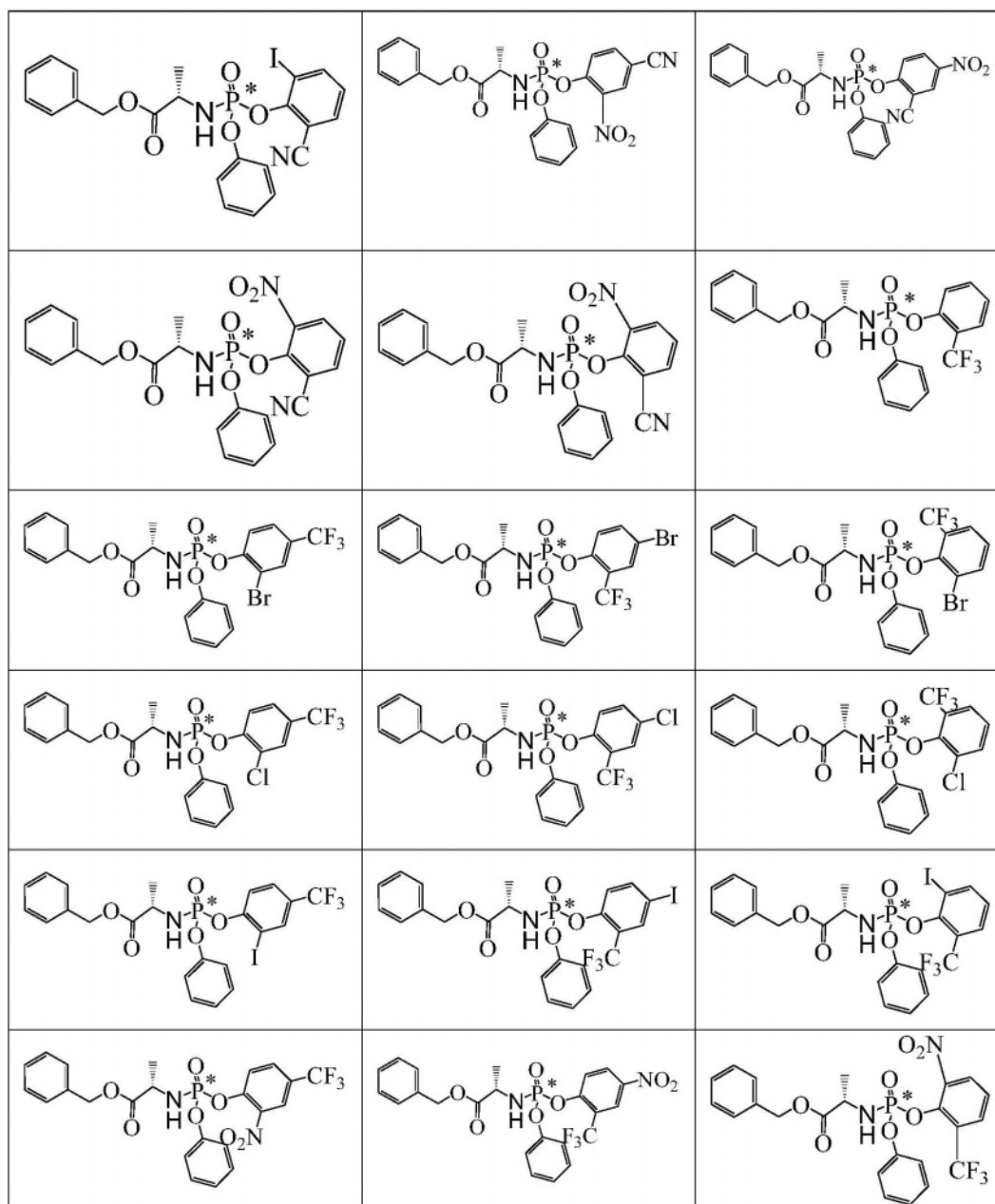
[0050]



[0051]



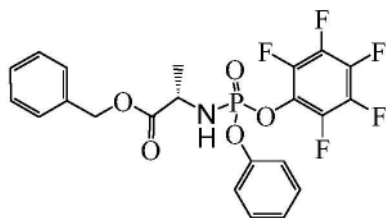
[0052]



[0053] *代表手性中心

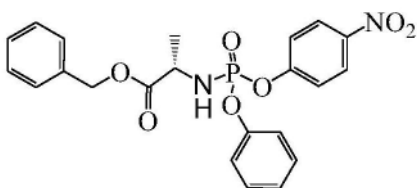
[0054] 式II化合物可以是：

[0055]



[0056] 式II化合物可以是：

[0057]



[0058] 羟基的保护基团(例如 P^1)可以独立地选自任意取代的 $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})_3$,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})$ -芳基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{OC}_1-\text{C}_6$ -烷基, $-\text{C}(\text{O})$ -0-烯丙基, $-\text{C}(\text{O})$ -0- CH_2 -苄基,任意取代的 $-\text{CH}(\text{芳基})_3$,任意取代的 $-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-亚烷基})$ -芳基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基和 $-\text{C}_1-\text{C}_4$ -烷基-0- C_1-C_4 -烷基。

[0059] 氨基的保护基团(例如 P^2 和 P^3)可以在每次出现时独立地选自 $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基, $-\text{C}(\text{O})$ -0-烯丙基, $-\text{C}(\text{O})$ -0- CH_2 -苄基,任意取代的 $-\text{CH}(\text{芳基})_3$,任意取代的 $-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-亚烷基})$ -芳基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})$ -芳基, $-\text{S}(\text{O})_2-\text{C}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{S}(\text{O})_2$ -芳基和任意取代的 $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})_3$ 。

[0060] 许多受保护的起始式III化合物是本领域已知的和/或可以通过已知方法制备。例如,可以通过用合适的保护基团保护3'-羟基和4-氨基,来从吉西他滨合成起始式III化合物。通常可以使用常规保护基团方法来添加和除去保护基团,例如,如“Protective Groups in Organic Chemistry,”由J W F McOmie编辑(1973);“Protective Groups in Organic Synthesis,”第二版,T W Greene(1991);和“Protecting Groups”,第三版P.J Koscienski(1995)中所描述的。

[0061] 为了制备3'-羟基和4-氨基保护的化合物,通常需要首先用与将来保护3'-羟基和4-氨基的保护基团不相关的保护基团(即可以在不除去所需的3'-羟基和4-氨基的情况下除去的基团)来保护吉西他滨的5'-羟基。同时或随后,用所需的保护基团保护3'-羟基和4-氨基,并且可以除去5'-羟基保护基团以产生式III化合物。某些保护基团可以同时引入到3'-羟基和5'-羟基和任选的4-氨基上,然后从5'羟基上选择性地除去,而不从3'-羟基和4-氨基上除去。

[0062] 根据一些实施方案, P^1 独立地选自任意取代的 $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})_3$,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})$ -芳基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{OC}_1-\text{C}_6$ -烷基, $-\text{C}(\text{O})$ -0-烯丙基, $-\text{C}(\text{O})$ -0- CH_2 -苄基,任意取代的 $-\text{CH}(\text{芳基})_3$,任意取代的 $-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-亚烷基})$ -芳基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基和 $-\text{C}_1-\text{C}_4$ -烷基-0- C_1-C_4 -烷基。

[0063] P^1 可以独立地选自任意取代的 $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})_3$,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{OC}_1-\text{C}_6$ -烷基和任意取代的 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基, $-\text{C}(\text{O})$ -0-烯丙基。优选地, P^1 选自 $-\text{C}(\text{O})$ 0-tBu, $-\text{C}(\text{O})$ 0-苄基和 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -烯丙基。因此, P^1 可以是 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基。 P^1 可以是 $-\text{C}(\text{O})$ 0-tBu。

[0064] 或者, P^1 可以独立地选自任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ -烷基和任意取代的 $-\text{C}(\text{O})$ -芳基,例如, P^1 可以独立地选自苄氧基和乙酰基。

[0065] P^2 可以独立地选自 $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基, $-\text{C}(\text{O})$ -0-烯丙基, $-\text{C}(\text{O})$ -0- CH_2 -苄基,任意取代的 $-\text{CH}(\text{芳基})_3$,任意取代的 $-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-亚烷基})$ -芳基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})$ -芳基, $-\text{S}(\text{O})_2-\text{C}_1-\text{C}_6$ 烷基,任意取代的 $-\text{S}(\text{O})_2$ -芳基和任意取代的 $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})_3$ 。

[0066] P^2 可以独立地选自 $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1-\text{C}_6$ -烷基,任意取代的 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基, $-\text{C}(\text{O})$ -0-烯丙基,任意取代的 $-\text{CH}(\text{芳基})_3$,和任意取代的 $-\text{Si}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})_3$ 。优选地, P^2 选自 $-\text{C}(\text{O})$ 0-tBu, $-\text{C}(\text{O})$ 0-苄基和 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -烯丙基。因此, P^2 可以是 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2$ -芳基。

[0067] 或者, P^2 可以独立地选自任意取代的 $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ -烷基和任意取代的 $-\text{C}(\text{O})$ -芳基,例如, P^2 可以独立地选自苄氧基和乙酰基。

[0068] 在另一个替代方案中, P^2 是H。

[0069] 同样, P^3 可以独立地选自H, $-C(O)OC_1-C_6$ -烷基, 任意取代的 $-C(O)OCH_2$ -芳基, $-C(O)-O$ -烯丙基, $-C(O)-O-CH_2$ -苄基, 任意取代的 $-CH(芳基)_3$, 任意取代的 $-(C_1-C_3-亚烷基)-芳基$, 任意取代的 $-C(O)-C_1-C_6$ -烷基, 任意取代的 $-C(O)-芳基$, $-S(O)_2-C_1-C_6$ -烷基, 任意取代的 $-S(O)_2$ -芳基和任意取代的 $-Si(C_{1-6}烷基)_3$ 。

[0070] 优选地, P^3 是H。

[0071] 任意取代的 $-Si(C_{1-6}烷基)_3$ 基团可以是 $-Si(C_{1-4}烷基)_3$ 基团。该基团(即烷基)优选是未取代的。说明性实例包括三乙基甲硅烷基和叔丁基二甲基甲硅烷基。

[0072] 任意取代的 $-C(O)-C_1-C_6$ -烷基基团可以是 $-C(O)-C_1-C_6$ -烷基。该基团(即烷基)优选是未取代的。说明性实例包括乙酰基和丙酰基。

[0073] 任意取代的 $-C(O)-芳基$ 基团可以是 $-C(O)-苯基$ 基团。该基团(即苯基)优选是未取代的。说明性实例包括苄氧基。

[0074] 任意取代的 $-C(O)-OC_1-C_6$ -烷基基团可以是 $-C(O)-OC_1-C_4$ -烷基。该基团(即烷基)优选是未取代的。说明性实例包括 $-C(O)-O$ -甲基和 $-C(O)-O$ -乙基。特别优选的实例是 $C(O)OtBu$ 。

[0075] 任意取代的 $-(C_1-C_3-亚烷基)-芳基$ 基团优选是任意取代的苄基。说明性实例包括苄基, 苄乙基, 4-甲氧基苄基, 4-硝基苄基, 4-溴苄基, 2,3-二甲氧基苄基和2,4-二甲氧基苄基。

[0076] 任意取代的 $-C(O)OCH_2$ -芳基基团优选是任意取代的 $-C(O)O$ 苄基基团。说明性实例包括 $-C(O)O$ 苄基和 $-C(O)O$ -(4-甲氧基苄基)。

[0077] 任意取代的 $-C_1-C_4$ -烷基- $O-C_1-C_4$ 烷基基团可以是 $-C_1-C_2$ -烷基- $O-C_1-C_2$ -烷基基团。该基团(即烷基)优选是未取代的。说明性实例包括甲氧基-甲基(MOM)和2-甲氧基-乙氧基-甲基(MEM)。

[0078] 任意取代的 $-S(O)_2-C_1-C_6$ -烷基基团可以是 $-S(O)_2-C_1-C_4$ -烷基。该基团(即烷基)优选是未取代的。说明性实例包括甲磺酸酯。

[0079] 任意取代的 $-S(O)_2$ -芳基基团可以是 $-S(O)_2$ -苯基基团。说明性实例包括苯基磺酸酯, 4-甲基苯基磺酸酯和4-硝基苯基磺酸酯。

[0080] 任意取代的 $-CH(芳基)_3$ 基团基团可以是 $-CH(苯基)_3$ 基团。说明性实例包括三苯甲基。

[0081] 当 P^1 、 P^2 和 P^3 中的两个或多个是保护基团时, 脱保护步骤可包括两个或三个单独的脱保护反应。这是使用两个或三个不同保护基团并且那些两个或三个保护基团不能在相同条件下除去的情况。

[0082] 然而, 脱保护步骤可包括除去所有保护基团的单一脱保护反应。因此, P^1 和 P^2 可以是在相同条件下除去的保护基团。 P^1 和 P^2 可能是相同的。

[0083] P^1 和 P^2 都可以是选自以下的基团: 任意取代的 $-C(O)OC_1-C_6$ -烷基, $-C(O)-O$ -烯丙基和任意取代的 $-C(O)OCH_2$ -芳基。因此, P^1 和 P^2 都可以是选自以下的基团: $C(O)OtBu$, $-C(O)-O$ -烯丙基和 $C(O)O$ -苄基。在一些实施方案中, P^1 和 P^2 都是 $C(O)OtBu$ 基团。

[0084] 优选地, P^3 是氢。因此, 在一个具体实施方案中, P^1 和 P^2 是相同的基团, 并且 P^3 是氢。因此, 在一个具体实施方案中, P^1 和 P^2 都是 $C(O)OtBu$ 基团, 并且 P^3 是氢。

[0085] P^2 和 P^3 可以各自为H, P^1 是保护基团。 P^2 和 P^3 可以各自为H, P^1 是选自以下的保护基

团： $-C(O)O-tBu$ 、 $-C(O)O$ -苄基和 $-C(O)OCH_2$ -烯丙基。 P^2 和 P^3 可以各自为H， P^1 为 $-C(O)O-tBu$ 。

[0086] 在整篇说明书中，“非对映异构体富集形式”和“基本上非对映异构纯形式”是指非对映异构纯度大于95%。“非对映异构体富集形式”和“基本上非对映异构纯形式”可以指非对映异构纯度大于98%、大于99%或大于99.5%。

[0087] 任意上述烷基和芳基(例如苯基,包括苄基中的苯基)基团,在化学上可能的情况下,任选地被1至3个取代基取代,所述取代基在每次出现时各自独立地选自以下组成的组:氧代, $=NR^a$, $=NOR^a$,卤素,硝基,氰基, 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 , $SO_2NR^aR^a$, $CO_2R^aC(O)R^a$, $CONR^aR^a$, C_1-C_4 烷基, C_2-C_4 链烯基, C_2-C_4 链烯基和 C_1-C_4 卤代烷基;其中 R^a 在每次出现时独立地选自H、 C_1-C_4 烷基和 C_1-C_4 卤代烷基。

[0088] 任意上述烷基均可以是未取代的。

[0089] 任意上述芳基(例如苯基,包括苄基中的苯基),在化学上可能的情况下,可以任选地被1至3个取代基取代,所述取代基在每次出现时各自独立地选自以下组成的组:卤素,硝基,氰基, 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 , $SO_2NR^aR^a$, $CO_2R^aC(O)R^a$, $CONR^aR^a$, C_1-C_4 烷基, C_2-C_4 链烯基, C_2-C_4 链烯基和 C_1-C_4 卤代烷基;其中 R^a 在每次出现时独立地选自H、 C_1-C_4 烷基和 C_1-C_4 卤代烷基。

[0090] 任意上述芳基(例如苯基,包括苄基中的苯基)可以任选地被1至3个取代基取代,所述取代基在每次出现时各自独立地选自以下组成的组:卤素,硝基, OR^a ; C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 卤代烷基;其中 R^a 在每次出现时独立地选自H、 C_1-C_4 烷基和 C_1-C_4 卤代烷基。

[0091] 芳基具有6-20个碳原子,以满足化合价要求。芳基是满足Huckel规则的碳环基团(即它们含有包含 $2(2n+1)$ π 电子的碳环系统)。芳基可以是任意取代的苯基,任意取代的联苯基,任意取代的萘基或任意取代的蒽基。同样,芳基可包括非芳族碳环部分。优选地,芳基是任意取代的苯基。

[0092] 烷基可以是直链或支链的。因此,例如, C_4 烷基可以是正丁基、异丁基或叔丁基。

[0093] 第一方面的步骤a)可以在有机溶剂(S1)中进行。有机溶剂包括但不限于醚(例如四氢呋喃、二恶烷、乙醚);酮(例如丙酮和甲基异丁基酮);卤代溶剂(例如二氯甲烷、氯仿和1,2-二氯乙烷);和酰胺(例如DMF、NMP);或其混合物。当步骤a)在格氏试剂的存在下进行,有机溶剂优选为醚。最优选地,溶剂是四氢呋喃。

[0094] 当第一方面的步骤a)在氮碱的存在下进行,有机溶剂最优选是卤代溶剂或酰胺。

[0095] 反应通常在合适的温度下进行,例如,从约 -5°C 至约 40°C 。优选地,反应温度为约 25°C 至约 30°C 。可以将反应搅拌约15分钟至约16小时,优选约30分钟至约60分钟。

[0096] 所得的含有式II的保护的氨基磷酸酯的有机层可以在相同的反应容器中直接处理,以形成式I的吉西他滨-[苄基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯。或者,可以在反应结束时,通过本领域已知的任意方法浓缩有机层中的溶剂,以获得粗产物残余物,例如蒸馏、蒸发、旋转干燥(例如使用Buchi旋转蒸发器)、冷冻干燥、流化床干燥、急骤干燥、旋转闪蒸干燥。优选地,通过真空蒸馏来除去溶剂。

[0097] 本发明的方法还可以涉及羟基和氨基保护基团的脱保护。

[0098] 可以在不纯化步骤a)的产物的情况下进行脱保护步骤(步骤b))。

[0099] 当保护基团对酸敏感时,例如三苯甲基、 $C(O)OtBu$ 、MOM、MEM、2,4-二甲氧基苄基、

2,3-二甲氧基苄基,脱保护步骤可以使用合适的酸进行。酸可以是布朗斯台德酸(Bronsted acid)(例如TFA、磷酸、HCl或甲酸)或路易斯酸(Lewis acid)(例如 $ZnBr_2$ 、 $CeCl_3$)。路易斯酸(例如 $ZnBr_2$)是不太优选的。同样不太优选HCl。优选地,酸是TFA。

[0100] 当保护基团对碱敏感时,例如乙酰基、苄氧基,脱保护步骤可以使用合适的碱进行,例如 NH_3 水溶液或NaOH水溶液。碱敏感基团可能不太优选。

[0101] 当保护基团是甲硅烷基(例如三乙基甲硅烷基或叔丁基二甲基甲硅烷基)时,脱保护步骤可以使用合适的酸(例如TFA)或使用合适的氟源(例如四丁基氟化铵、氟硅酸、HF)进行。

[0102] 当保护基团是苄基或C(O)O苄基时,脱保护步骤可以使用 H_2 和合适的催化剂(例如Pd/C)进行。这种保护基团可能不太优选。

[0103] 当保护基团是4-甲氧基苄基、2,3-二甲氧基苄基、2,4-二甲氧基苄基或C(O)O-(4-甲氧基苄基)时,脱保护步骤可以使用合适的氧化剂(例如间氯过苯甲酸)进行。

[0104] 当保护基团是-C(O)-O-烯丙基时,脱保护步骤可以使用 $(PPh_3)_4Pd$ 进行。

[0105] 当保护基团是-C(O)-O- CH_2 -苄基时,脱保护步骤可以使用哌啶进行。

[0106] 当 P^1 是C(O)OtBu时,可以使用 C_1-C_4 -醇和/或水来实现脱保护。当 P^1 是C(O)OtBu时,可以使用 C_1-C_4 -醇和水的混合物来实现脱保护。可以使用异丙醇(IPA)和水的混合物来实现脱保护。

[0107] 脱保护步骤可以在有机溶剂或其混合物中进行。示例性有机溶剂包括但不限于卤代溶剂(例如二氯甲烷、氯仿、二氯乙烷);醇(如甲醇、乙醇、异丙醇)和醚(如四氢呋喃、乙醚)。

[0108] 当脱保护步骤在酸(例如TFA)的存在下进行,有机溶剂优选是卤代溶剂,例如二氯甲烷。

[0109] 脱保护反应可以在例如-10°C至约30°C,例如至约10°C的温度范围下进行。进行反应的合适温度为-5°C至5°C。可以将反应搅拌约15分钟至约16小时,优选约1小时至约4小时,更优选约2小时至约3小时。

[0110] 当使用 C_1-C_4 -醇和/或水(例如异丙醇(IPA)和水的混合物)来实现步骤b)时,可以加热反应混合物,例如,加热至温度为30°C至90°C或温度为60°C至85°C。

[0111] 当脱保护在酸(例如TFA)的存在下进行,脱保护后得到的产物的分离通常通过如下操作进行:淬灭脱保护步骤中使用的过量酸,并用与水不混溶的有机溶剂萃取产物,并通过蒸发有机溶剂回收产物。

[0112] 用于萃取的与水不混溶的有机溶剂的实例包括酯,如乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙酸异丙酯等;氯化溶剂,如二氯甲烷、氯仿等;芳烃溶剂,如甲苯、二甲苯等;优选乙酸乙酯。

[0113] P^1 和 P^2 可以都是C(O)OtBu基团且 P^3 是氢,步骤a)在tBuMgCl的存在下(例如在THF中)进行,步骤b)使用TFA进行(例如在DCM中)。

[0114] P^1 可以是C(O)OtBu基团, P^2 和 P^3 各自为氢,步骤a)在tBuMgCl的存在下进行(例如在THF中)。可以在不分离步骤a)的产物的情况下进行步骤b),例如通过在步骤a)的反应完成后,向步骤a)反应混合物中加入IPA和水的混合物。

[0115] 在某些实施方案中,仍然需要纯化从本发明第一方面的方法获得的吉西他滨-[苄基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯。同样,仍然需要纯化从本发明第二方面的方法获得的式

II化合物。纯化方法是本领域技术人员熟知的,包括色谱(例如柱色谱)、重结晶和蒸馏。在其它实施方案中,不需要纯化。

[0116] 在整篇说明书中使用以下缩写:

[0117] DCM-二氯甲烷 DIPE-二异丙基醚

[0118] DMF-N,N-二甲基甲酰胺 DMSO-二甲基亚砷

[0119] IPA-异丙醇 MTBE-甲基叔丁基醚

[0120] NMP-N-甲基吡咯烷酮 TBDMS-叔丁基二甲基甲硅烷基

[0121] TEA-三乙胺 TFA-三氟乙酸

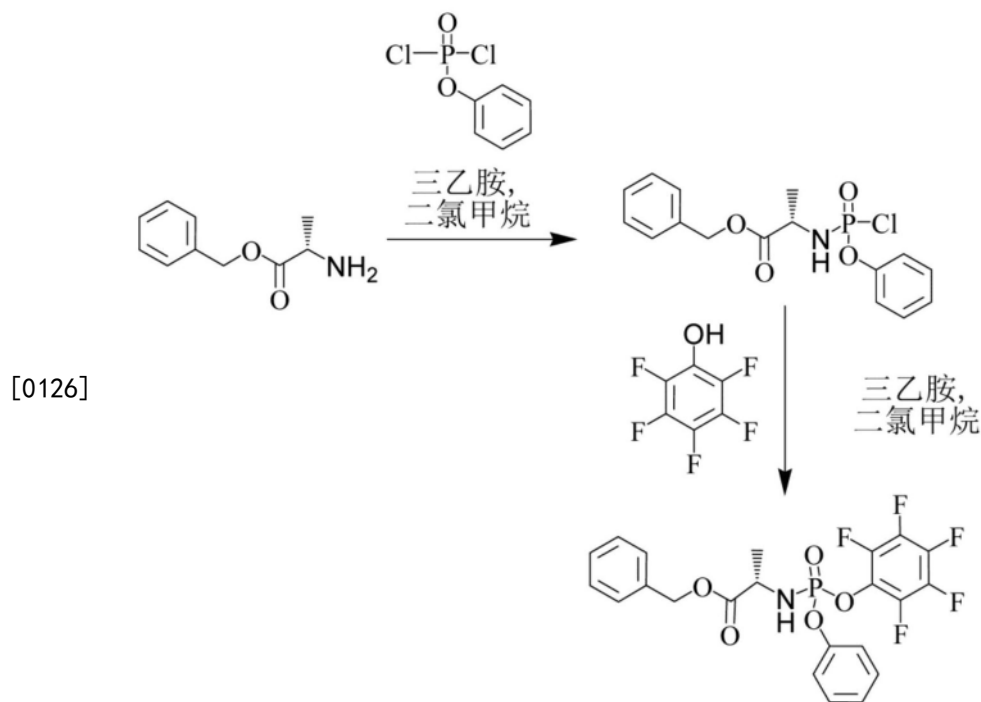
[0122] THF-四氢呋喃

实施例

[0123] 本发明通过以下实施例进一步说明,这些实施例仅以说明的方式提供,不应解释为限制本发明的范围。

[0124] 实施例1:

[0125] 2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苄氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯(式IIa)的非对映异构体混合物的制备



式IIa (Sp和Rp混合物)

[0127] 在25-35°C下,向搅拌的L-丙氨酸苄酯盐酸盐(100gms)在二氯甲烷(1升)中的混合物中,加入二氯磷酸苯酯(77ml),将所得混合物冷却至-70°C至-78°C,加入三乙胺(130.5ml)并在相同温度下搅拌1小时。将反应物质温度升至25-35°C并搅拌2小时。反应完成后,将反应物质在低于35°C的真空下浓缩,得到残余物。在25-35°C下向所得残余物中加入二异丙醚(2升),并在相同温度下搅拌30分钟。过滤反应物质,用二异丙醚(500ml)洗涤,然后在低于35°C的真空下浓缩滤液,得到苯基-(苄氧基-L-丙氨酰基)-氯磷酸酯。将得到的化合物在25-35°C下溶于二氯甲烷(1升)中并冷却至-5°C至-10°C。在相同温度下向反应物

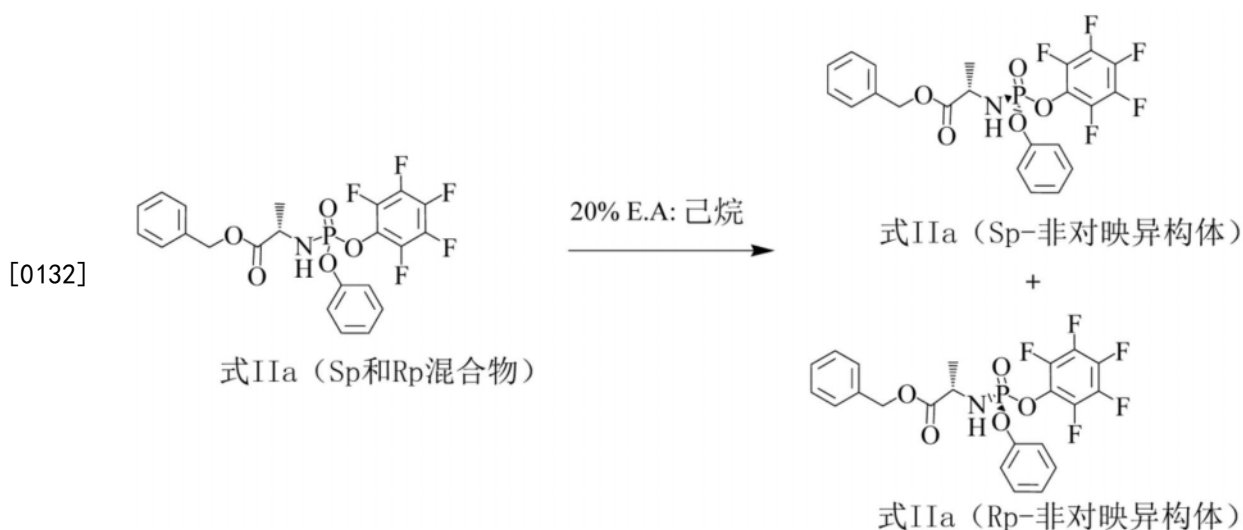
质中加入五氟苯酚 (85.5gms)、三乙胺 (65.2ml) 并搅拌2小时。反应完成后,将反应物质在低于35°C的真空下浓缩,并在25-35°C下加入乙酸乙酯(1升),并在相同温度下搅拌30分钟。过滤固体并用乙酸乙酯(1升)洗涤。向滤液中加入水(1升)、10%碳酸钠(2×1升)、盐水(1升)洗涤液,用无水硫酸钠干燥有机层,在35-45°C下真空浓缩,得到标题化合物的非对映异构体混合物,为白色半固体。

[0128] 产量:210gms

[0129] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):33.74:66.26% ($R_p:S_p$)

[0130] 实施例2:

[0131] 2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯(式IIa)的 S_p -非对映异构体的分离



[0133] 在25-35°C下,向上述得到的式IIa的非对映异构体混合物($R_p:S_p$ -33.74:66.26%)中加入20%乙酸乙酯的己烷溶液(1.2升),并搅拌1小时。过滤固体,用20%乙酸乙酯的己烷溶液(300ml)洗涤,得到式IIa化合物的混合物。

[0134] 产量:112gms

[0135] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):22.13:77.87% ($R_p:S_p$)

[0136] 将滤液真空浓缩,得到式IIa的非对映异构体混合物(75gm; $R_p:S_p$ -65.43:34.57%)。

[0137] 在25-35°C下,向上述得到的式IIa的非对映异构体混合物($R_p:S_p$ -22.13:77.87%)中加入20%乙酸乙酯的己烷溶液(1.2升),并搅拌1小时。过滤固体,用20%乙酸乙酯的己烷溶液(300ml)洗涤,得到式IIa化合物的纯 S_p -非对映异构体。

[0138] 产量:80gms

[0139] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):0.20:99.80% ($R_p:S_p$)

[0140] ^1H NMR (300MHz, 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)

[0141] ESI-MS (m/z): 524 (M+1)

[0142] 将滤液真空浓缩,得到式IIa的非对映异构体混合物(28gm; $R_p:S_p$ -80.77:19.23%)。

[0143] 实施例3:

[0144] 2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯(式IIa)的异构化

[0145] 在25-35℃下,向上述得到的式IIa的2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯(75gms; $R_p:S_p$ -65.43:34.57%) 在20%乙酸乙酯的己烷(1.1升)的搅拌溶液中,加入三乙胺(7.5ml),并在相同温度下搅拌6小时。反应完成后,将反应物质在水中(750ml)中淬灭,并用乙酸乙酯(750ml)萃取。用无水硫酸钠干燥有机层,并在真空下浓缩,得到标题化合物,为固体。

[0146] 产量:45gms

[0147] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):91.29:8.71% ($S_p:R_p$)

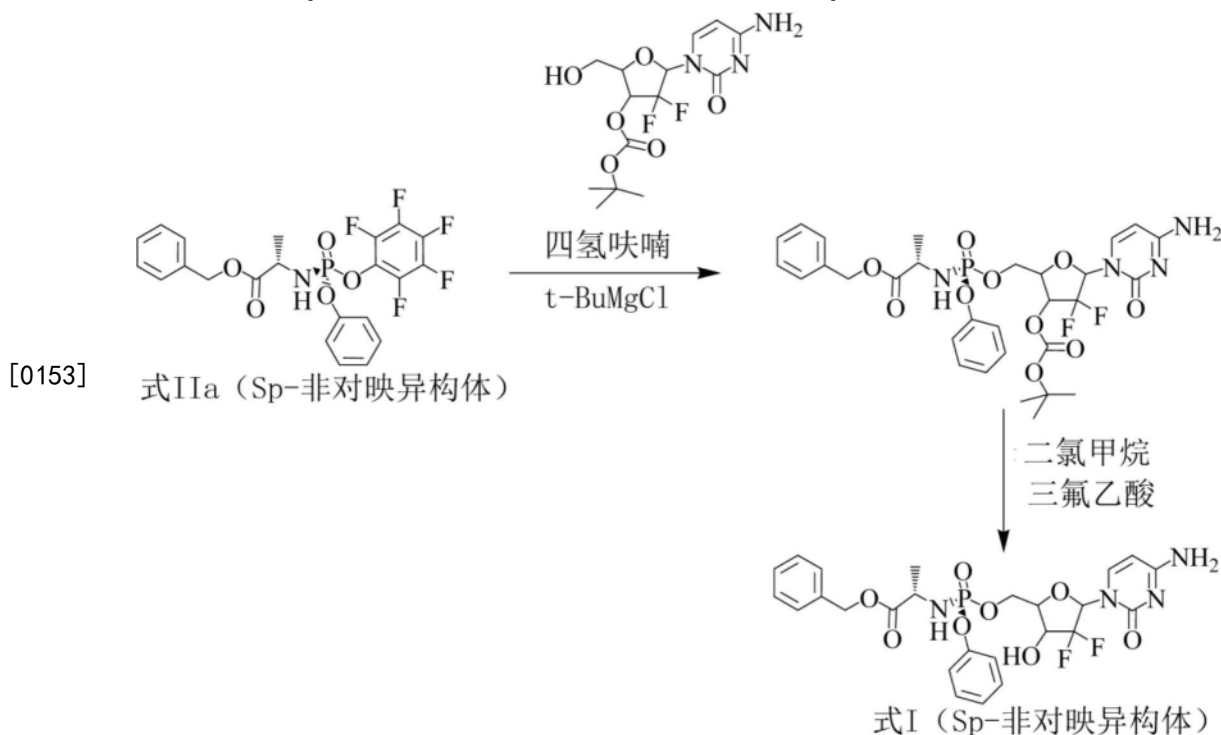
[0148] 在25-30℃下,使上述得到的式IIa的2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯的 R_p 和 S_p -非对映异构体混合物(45gms; $R_p:S_p$ -8.71:91.29%) 在20%乙酸乙酯的己烷溶液(1.1升)中浆化,并在相同温度下搅拌1小时。过滤固体,用20%乙酸乙酯的己烷溶液(225ml)洗涤,得到标题化合物的 S_p -非对映异构体,为固体。

[0149] 产量:19gms

[0150] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):99.92:0.08% ($S_p:R_p$)

[0151] 实施例4:

[0152] NUC-1031的 S_p -非对映异构体的制备(使用式IIa的 S_p -非对映异构体)



[0154] 在0℃至-5℃下,向搅拌的3'-O-(叔丁氧基羰基)吉西他滨(5gms)在四氢呋喃(75ml)中的混合物中,加入叔丁基氯化镁(15.2ml的2.0M四氢呋喃溶液)和式IIa的2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯的 S_p -非对映异构体(8.3gms,稀释于50ml四氢呋喃中),并将温度升至25-30℃,并在相同温度下搅拌30分钟。反应完成后,将反应物质在0.5N盐酸(50ml)中淬灭,并用乙酸乙酯(2×75ml)萃取。依次向有机层中加入10%碳酸钠(2×50ml)、盐水溶液(50ml)洗涤液。分离有机层,用硫酸钠干燥,真空浓缩,得到残余物。

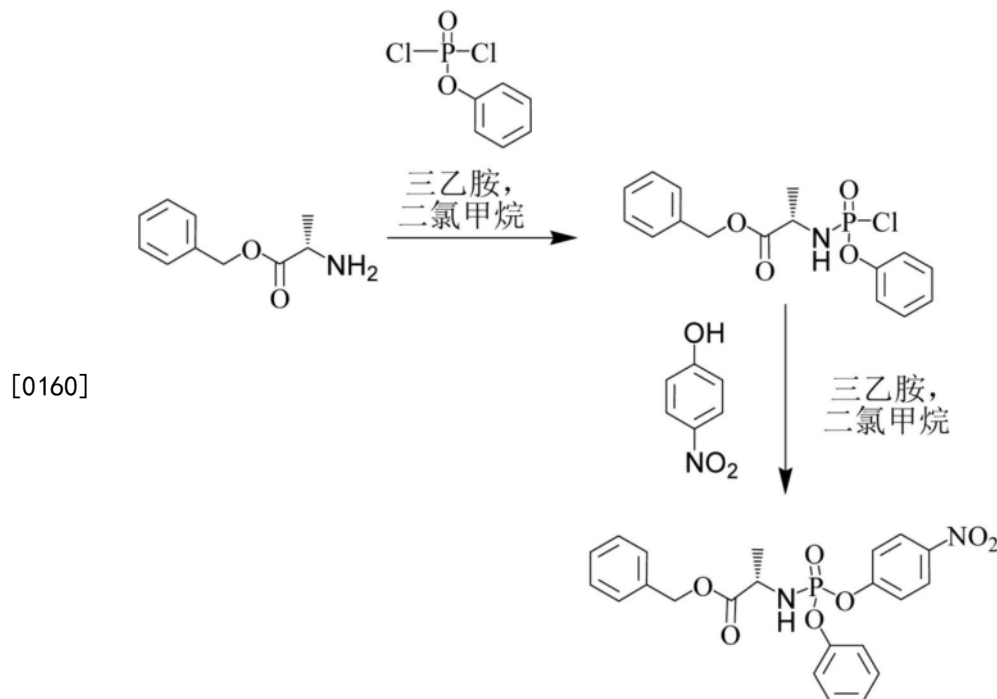
[0155] 将得到的残余物溶于二氯甲烷 (50ml) 中,并在0℃至5℃下加入三氟乙酸 (18.5ml)。将反应物质在25-35℃保持2小时,并在20%碳酸钠溶液 (125ml) 中淬灭。用乙酸乙酯 (165ml) 萃取,用硫酸钠干燥有机层,并在40-45℃下真空蒸发。将得到的残余物在50%乙酸乙酯的庚烷 (150ml) 混合物中浆化,得到标题化合物。

[0156] 产量:4.8gms

[0157] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):99.4% (S_p -非对映异构体)

[0158] 实施例5:

[0159] 式IIb的2-[(4-硝基苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯的非对映异构体混合物的制备



式IIb (S_p 和 R_p 混合物)

[0161] 在25-35℃下,向搅拌的L-丙氨酸苄酯盐酸盐 (50gms) 在二氯甲烷 (500ml) 中的混合物中,加入二氯磷酸苯酯 (54gms),将所得混合物冷却至-70℃至-78℃,加入三乙胺 (65.2ml) 并在相同温度下搅拌1小时。将反应物质温度升至25-35℃并搅拌2小时。反应完成后,将反应物质在低于35℃的真空下浓缩,得到残余物。在25-35℃下向所得残余物中加入二异丙醚 (1升),并在相同温度下搅拌30分钟。过滤反应物质,用二异丙醚 (250ml) 洗涤,然后在低于35℃的真空下浓缩滤液,得到苯基-(苄氧基-L-丙氨酰基)-氯磷酸酯。将得到的化合物在25-35℃下溶于二氯甲烷 (500ml) 中并冷却至-5℃至-10℃。在相同温度下向反应物质中加入五氟苯酚 (27.5gms)、三乙胺 (65.2ml) 并搅拌2小时。反应完成后,将反应物质在低于35℃的真空下浓缩,并在25-35℃下加入乙酸乙酯 (500ml),并在相同温度下搅拌30分钟。过滤固体并用乙酸乙酯 (500ml) 洗涤。向滤液中加入水 (500ml)、10%碳酸钠 (2×500ml)、盐水 (500ml) 洗涤液,用无水硫酸钠干燥有机层,在35-40℃下真空浓缩,得到标题化合物的非对映异构体混合物,为稠油状液体。

[0162] 产量:90gms

[0163] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):45.6:54.94% (R_p : S_p)

[0164] 通过制备型HPLC将上述得到的式IIb的2-[(4-硝基苯氧基)-苯氧基-磷酸基氨基]丙酸苄酯的非对映异构体混合物(40gms; $R_p:S_p$ -45.6:54.94%)分离成纯的 S_p 和 R_p 非对映异构体,并在真空下浓缩纯级分,分别得到 S_p 和 R_p 非对映异构体。

[0165] 产量: S_p -非对映异构体:8gms,

[0166] $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3): -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)

[0167] ESI-MS (m/z): -479 (M+Na)

[0168] R_p -非对映异构体:6gms,

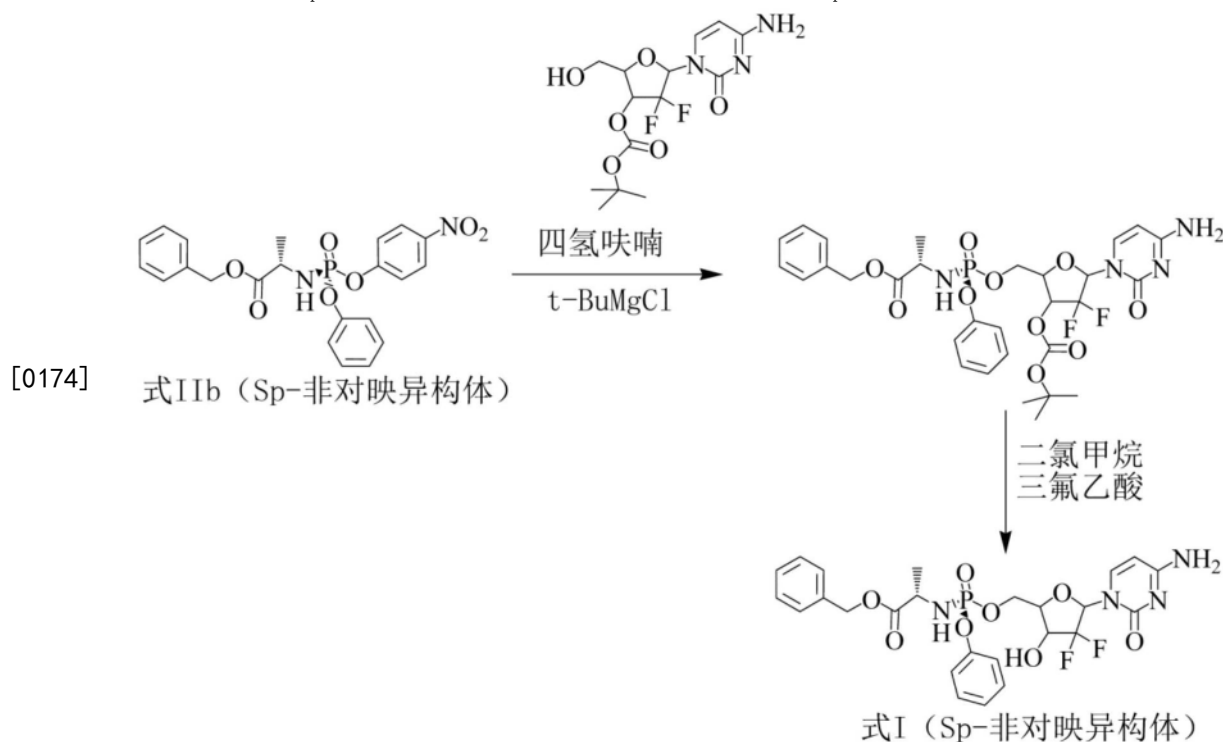
[0169] $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3): -8.08-8.13 (d, 2H), 7.15-7.34 (m, 12H), 5.10 (s, 2H), 4.48-4.56 (m, 1H), 4.11-4.20 (m, 1H), 1.39-1.41 (d, 3H)

[0170] ESI-MS (m/z): -457 (M+1)⁺

[0171] S_p & R_p -非对映异构体混合物:20gms

[0172] 实施例6:

[0173] NUC-1031的 S_p -非对映异构体的制备(使用式IIb的 S_p -非对映异构体)



[0175] 在0℃至-5℃下,向搅拌的3'-O-(叔丁氧基羰基)吉西他滨(2gms)在四氢呋喃(30ml)中的混合物中,加入N-甲基吡啶(2ml)、叔丁基氯化镁(5.5ml的2.0M四氢呋喃溶液)和式IIb的2-[(4-硝基苯氧基)-苯氧基-磷酸基氨基]丙酸苄酯的 S_p -非对映异构体(4gms,稀释于20ml四氢呋喃中),并将温度升至25-30℃,并在相同温度下搅拌30分钟。反应完成后,将反应物质在0.5N盐酸(20ml)中淬灭,并用乙酸乙酯(2×30ml)萃取。依次向有机层中加入10%碳酸钠(2×20ml)、盐水溶液(20ml)洗涤液。分离有机层,用硫酸钠干燥,真空浓缩,得到残余物。

[0176] 将得到的残余物溶于二氯甲烷(20ml)中,并在0℃至5℃下加入三氟乙酸(7.4ml)。将反应物质在25-35℃保持2小时,并在20%碳酸钠溶液(30ml)中淬灭。用乙酸乙酯(66ml)

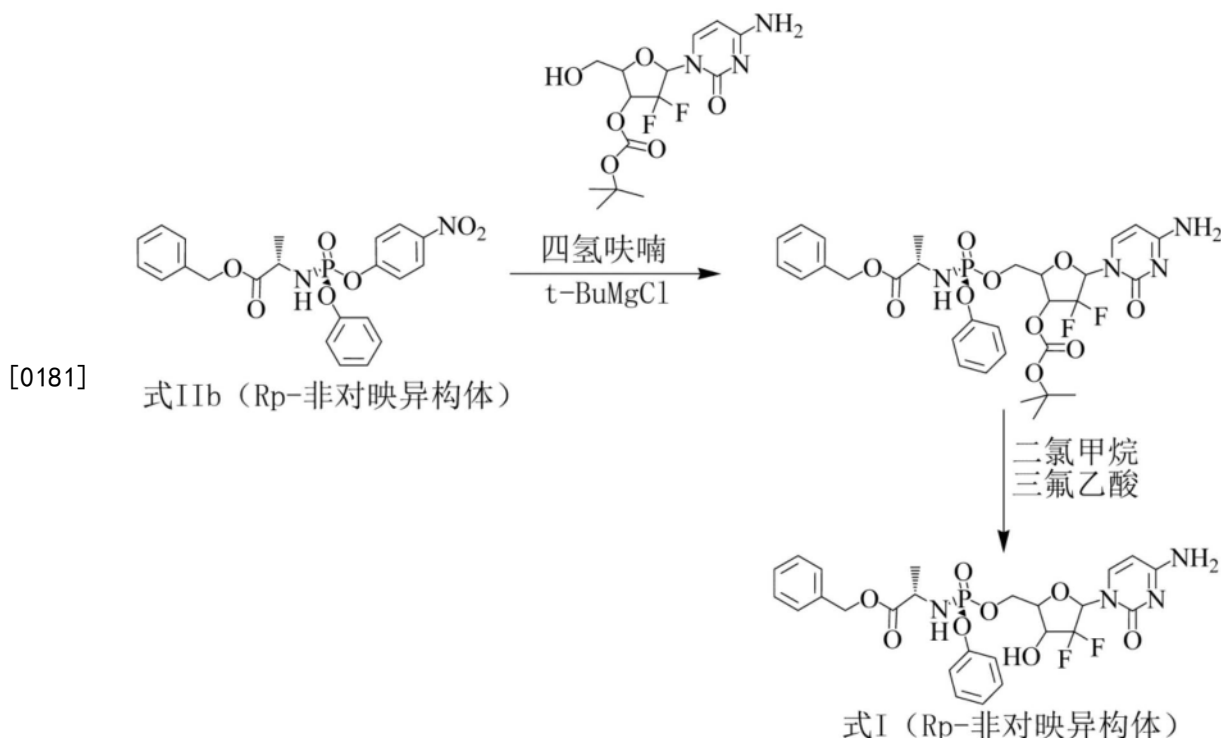
萃取,用硫酸钠干燥有机层,并在40-45℃下真空蒸发。所得残余物(3gms; S_p -85.98%)用柱色谱法纯化,用2-10%异丙醇的二氯甲烷混合物溶液洗脱。收集含有产物的级分并在真空下浓缩,得到标题化合物,为固体。

[0177] 产量:1.1gms

[0178] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):97.88:0.48% (S_p : R_p)

[0179] 实施例7:

[0180] 式I的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯的 R_p -非对映异构体的制备(使用式IIb的 R_p -非对映异构体)



[0182] 在0℃至-5℃下,向搅拌的3'-O-(叔丁氧基羰基)吉西他滨(2gms)在四氢呋喃(30ml)中的混合物中,加入N-甲基吡啶(2ml)、叔丁基氯化镁(5.5ml的2.0M四氢呋喃溶液)和式IIb的2-[4-硝基苯氧基]-苄氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯的 R_p -非对映异构体(4gms,稀释于20ml四氢呋喃中),并将温度升至25-30℃,并在相同温度下搅拌30分钟。反应完成后,将反应物质在0.5N盐酸(20ml)中淬灭,并用乙酸乙酯(2×30ml)萃取。依次向有机层中加入10%碳酸钠(2×20ml)、盐水溶液(20ml)洗涤液。分离有机层,用硫酸钠干燥,真空浓缩,得到残余物。

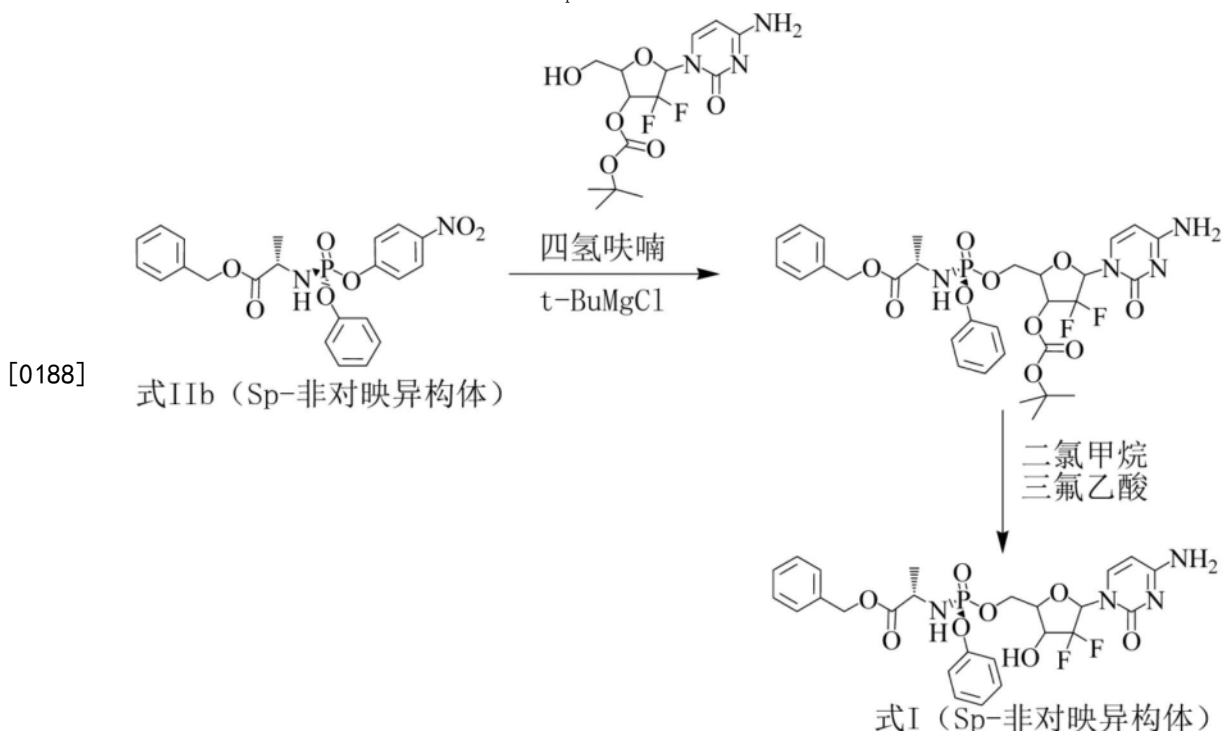
[0183] 将得到的残余物溶于二氯甲烷(20ml)中,并在0℃至5℃下加入三氟乙酸(7.4ml)。将反应物质在25-35℃保持2小时,并在20%碳酸钠溶液(30ml)中淬灭。用乙酸乙酯(66ml)萃取,用硫酸钠干燥有机层,并在40-45℃下真空蒸发。所得残余物(2.9gms; R_p -84.05%)用柱色谱法纯化,用2-10%异丙醇的二氯甲烷混合物溶液洗脱。收集含有产物的级分并在真空下浓缩,得到标题化合物,为固体。

[0184] 产量:1.4gms

[0185] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):97.99:0.86% (R_p : S_p)

[0186] 实施例8:

[0187] 式I的吉西他滨-[苯基(苄氧基-L-丙氨酰基)]磷酸酯的 S_p -非对映异构体的制备(使用来自实施例-3的异构化的式IIa的 S_p -非对映异构体)



[0189] 在 0°C 至 -5°C 下,向搅拌的3'-O-(叔丁氧基羰基)吉西他滨(5gms)在四氢呋喃(75ml)中的混合物中,加入叔丁基氯化镁(15.2ml的2.0M四氢呋喃溶液)和式IIa的2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯的 S_p -非对映异构体(8.3gms,来自实施例-3(99.92%)),稀释于50ml四氢呋喃中),并将温度升至 $25\text{-}30^{\circ}\text{C}$,并在相同温度下搅拌30分钟。反应完成后,将反应物质在0.5N盐酸(50ml)中淬灭,并用乙酸乙酯($2\times 75\text{ml}$)萃取。依次向有机层中加入10%碳酸钠($2\times 50\text{ml}$)、盐水溶液(50ml)洗涤液。分离有机层,用硫酸钠干燥,真空浓缩,得到残余物。

[0190] 将得到的残余物溶于二氯甲烷(50ml)中,并在 0°C 至 5°C 下加入三氟乙酸(18.5ml)。将反应物质在 $25\text{-}35^{\circ}\text{C}$ 保持2小时,并在20%碳酸钠溶液(125ml)中淬灭。用乙酸乙酯(165ml)萃取,用硫酸钠干燥有机层,并在 $40\text{-}45^{\circ}\text{C}$ 下真空蒸发。将得到的残余物在50%乙酸乙酯的庚烷(150ml)混合物中浆化,得到标题化合物。

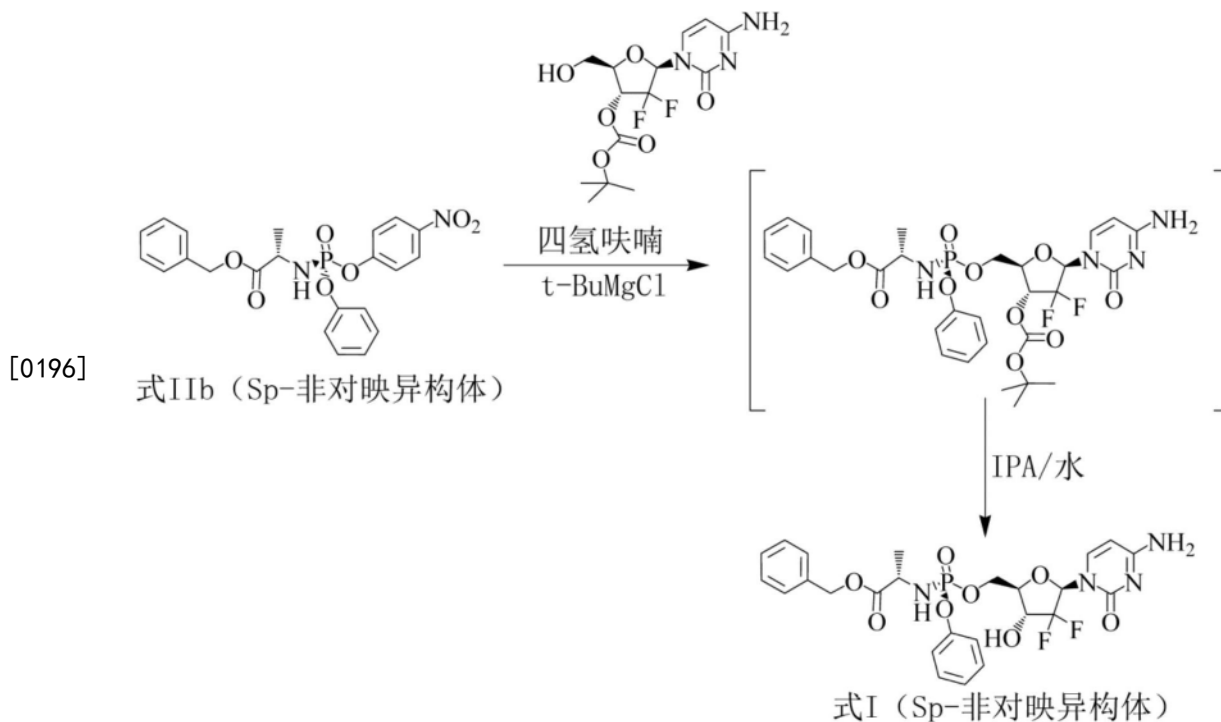
[0191] 产量:4.9gms

[0192] 通过HPLC测定手性纯度(%面积):99.72% (S_p -非对映异构体)

[0193] 应该理解,可以对本文公开的实施方案进行各种修改。因此,以上描述不应被解释为限制,而仅作为优选实施方案的示例。例如,作为执行本发明的最佳模式而实现的上述功能仅用于说明目的。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本领域技术人员可以实现其他安排和方法。此外,本领域技术人员将设想在所附说明书的范围和精神内的其他修改。

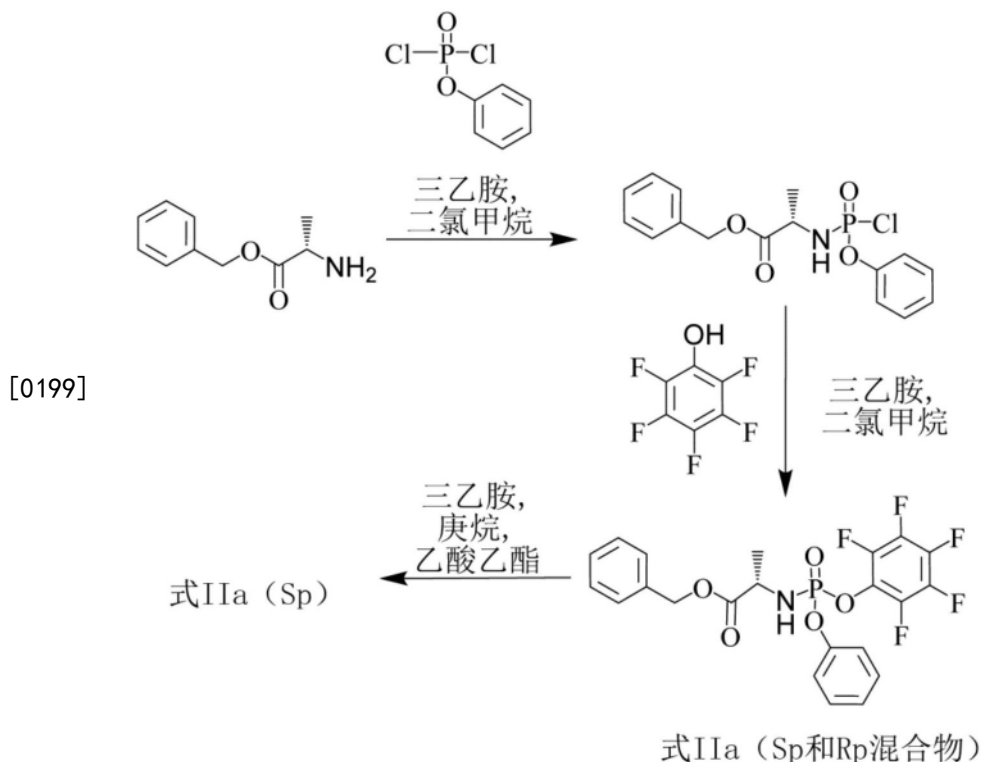
[0194] 实施例9:

[0195] 使用IPA/水进行脱保护来制备NUC-1031的 S_p -非对映异构体(使用式IIb的 S_p -非对映异构体)



[0197] 在 -5°C 至 0°C 下,向搅拌的3'-O-(叔丁氧基羰基)吉西他滨(100gms)在四氢呋喃(1升)中的混合物中,加入叔丁基氯化镁(292ml的2.0M四氢呋喃溶液)和式IIb的2-[(4-硝基苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯的 S_p -非对映异构体(166gms,稀释于700mL四氢呋喃中),升温至 $25-30^{\circ}\text{C}$,并在相同的温度下搅拌3小时。反应完成后,将反应物质在0.5N盐酸(1L)中淬灭,并用乙酸乙酯萃取。依次用10%碳酸钠、水和盐水溶液洗涤液洗涤有机层。分离有机层并在真空下浓缩,得到残余物。向残余物中加入异丙醇(IPA;850mL)和水(2.5L),将混合物加热至 75°C ,保持3小时,然后加入更多的水(2.5L),将混合物冷却至 25°C 并过滤。将得到的固体用乙酸乙酯洗涤并干燥。获得124g产物(78%)。通过HPLC测定手性纯度(%面积):99.95%(S_p -非对映异构体)

[0198] 实施例10—(Sp)-2-[(2,3,4,5,6-五氟苯氧基)-苯氧基-磷酰基氨基]丙酸苄酯的制备(式IIa)



[0200] 在30℃下,向搅拌的L-丙氨酸苄酯·HCl(100g)在1000mL二氯甲烷中的混合物中,向反应物质中加入二氯磷酸苯酯(97.8g)。将混合物冷却至-20℃,并缓慢加入三乙胺(93.8g),保持温度在-20℃。将反应在-20℃下搅拌1小时,然后温热至10℃(10±5),并再搅拌1.5小时。

[0201] 在10℃下加入五氟苯酚(85.3g)在100mL二氯甲烷中的溶液,然后缓慢加入三甲胺(46.8g),保持温度在10℃。在氮气氛下,在10℃(10±5)下,向反应物质中缓慢加入46.9g三乙胺。将混合物在10℃下搅拌2小时,然后通过缓慢加入0.5N HCl溶液淬灭,保持温度在10℃。升温至室温后,分离混合物,用饱和碳酸氢盐溶液、蒸馏水和盐水洗涤有机相,然后真空浓缩。

[0202] 在25℃下,将粗混合物悬浮于1500mL 20%乙酸乙酯的正庚烷溶液中。在25℃下加入三乙胺(12.2g)并搅拌混合物。过滤混合物,将固体溶于2500mL乙酸乙酯中,用水和盐水洗涤,真空浓缩。将固体悬浮于1200mL 20%乙酸乙酯的正庚烷溶液中,搅拌45-60分钟并过滤。将该物质在真空下干燥,得到所需产物。产率范围为40至80%,非对映异构纯度超过99%。