(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 793 957**

(51) Int. Cl.:

C07H 1/06 (2006.01)
C07H 19/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2015** **PCT/GB2015/052839**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016** **WO16055769**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2015** **E 15782005 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3204398**

(54) Título: **Métodos de separación de diastereoisómeros de fosfato de gemcitabina**

(30) Prioridad:

06.10.2014 GB 201417644

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.11.2020

(73) Titular/es:

NUCANA PLC (100.0%)
77-78 Cannon Street
London EC4N 6AF, GB

(72) Inventor/es:

GRIFFITH, HUGH

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 793 957 T3

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

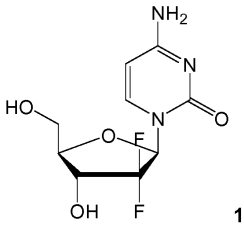
DESCRIPCIÓN

Métodos de separación de diastereoisómeros de fosfato de gemcitabina

Esta invención se relaciona con un método para separar diastereoisómeros de fosfato de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato. Más específicamente, se relaciona con métodos para preparar los diastereoisómeros de fosfato (S)- y/o (R)- en una forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

Antecedentes

La gemcitabina (1; comercializada como Gemzar®) es un análogo de nucleósido efectivo que actualmente está aprobado para tratar los cánceres de mama, pulmón no microcítico, ovario y pancreático y se usa ampliamente para tratar una variedad de otros tipos de cáncer, incluyendo vejiga, biliar, colorrectal y linfoma.

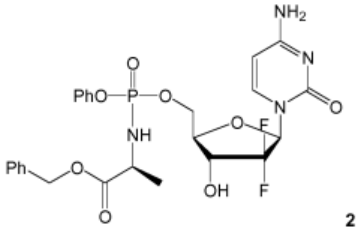


1

La utilidad clínica de la gemcitabina está limitada por una serie de mecanismos de resistencia inherentes y adquiridos. A nivel celular, la resistencia depende de tres parámetros: (i) la regulación negativa de la desoxicitidina quinasa, necesaria para la activación en el resto fosforilado; (ii) la expresión reducida de transportadores de nucleósidos, en particular, hENT1 requerida para la absorción por las células cancerosas; y (iii) la regulación positiva de enzimas catalíticas, especialmente citidina desaminasa que degrada la gemcitabina.

El documento WO2005/012327 describe una serie de derivados de fosfato de nucleótido para gemcitabina y moléculas de fármaco de nucleósido relacionadas. Entre ellos, se identifica gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato (NUC-1031; 2) como un compuesto particularmente efectivo. Estos derivados parecen evitar muchos de los mecanismos de resistencia inherentes y adquiridos que limitan la utilidad de la gemcitabina ('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'; Slusarczyk et all; J. Med. Chem.; 2014, 57, 1531-1542).

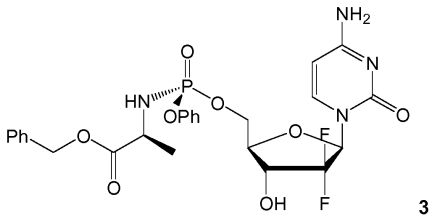
Se prepara NUC-1031 2 típicamente como una mezcla de dos diastereoisómeros, epiméricos en el centro de fosfato.



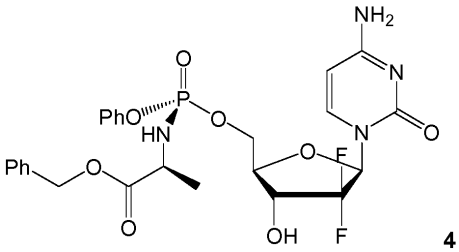
2

El NUC-1031 2 es extremadamente lipofílico y, por lo tanto, poco soluble en agua (por cálculo: <0.1 mg/mL), y los restos ionizables han calculado pKas que se encuentran fuera del intervalo de pH adecuado para la administración parenteral. Es esencialmente insoluble en agua, independientemente del contenido de sal o del pH, y esto tiene implicaciones para el desarrollo de formulaciones para administrar el compuesto a dosis suficientemente altas para un tratamiento efectivo. También tiene implicaciones para el desarrollo de procesos de fabricación eficientes que permitirán que se produzca NUC-1031 de manera rentable.

Se ha descubierto recientemente que el epímero (S) 3 de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato tiene suficiente solubilidad en mezclas de varios solventes orgánicos polares con agua para hacerlo adecuado para formulación y administración como agente terapéutico. La solubilidad del epímero (R) 4 es considerablemente menor. En ciertas mezclas de solventes, la diferencia en solubilidad entre el epímero (S) y el epímero (R) es más de 100 veces. Por lo tanto, se espera que se puedan desarrollar métodos de administración clínicamente más efectivos, prácticos y amigables para el paciente usando el epímero (S) que se pueden desarrollar usando el epímero (R) o usando la mezcla. Por lo tanto, es deseable poder proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato 3 en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.



3



4

La baja solubilidad de NUC-1031 en muchos solventes, particularmente los utilizados comúnmente en la separación de compuestos usando HPLC, indica que se necesitarían grandes volúmenes de solvente para cualquier separación con base en HPLC. Esto significa que cualquier proceso de separación a escala industrial con base en HPLC sería de alto costo, consumiría grandes cantidades de energía y material, y produciría grandes cantidades de desechos.

El documento WO2014/076490 describe una metodología para acceder selectivamente a diastereoisómeros de fosfato de derivados de fosfato de nucleótido, incluyendo NUC-1031.

Aunque parece preferible al momento de presentar esta solicitud administrar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato como el epímero (S), también se pueden concebir razones para necesitar obtener el epímero (R) en forma diastereoisoméricamente pura. Esto incluiría la realización de pruebas comparativas, para convertir el epímero (R) en el epímero (S) o porque el epímero (R) proporciona beneficios sobre el epímero (S) que supera su baja solubilidad.

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

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

Es un objetivo de ciertas realizaciones de esta invención proporcionar un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato 3 en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

Es un objetivo de ciertas realizaciones de esta invención proporcionar un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato 4 en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

Es un objetivo de ciertas realizaciones de esta invención proporcionar un método para proporcionar los epímeros (S) y/o (R) en formas sustancialmente diastereoisoméricamente puras que es escalable, económico y/o eficiente, por ejemplo, más escalable, económico y/o eficiente que los métodos que usan HPLC. Por lo tanto, es un objetivo de ciertas realizaciones de esta invención proporcionar un método para proporcionar los epímeros (S) y/o (R) en formas sustancialmente diastereoisoméricamente puras que sean adecuados para la fabricación a gran escala.

Es un objetivo de ciertas realizaciones de esta invención proporcionar un método simple, es decir, un método que implica un número mínimo de pasos de proceso y/o reactivos para proporcionar los epímeros S y/o (R) en formas sustancialmente diastereoisoméricamente puras.

Otro objetivo de ciertas realizaciones de esta invención es proporcionar un método que garantice que se proporcione el (S)- o epímero (R) separado en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura y al mismo tiempo cumpla o exceda los criterios necesarios estipulados por organizaciones como la FDA de los Estados Unidos en relación con las cantidades y la naturaleza de las impurezas que surgen de la síntesis y la separación.

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

Breve resumen de la divulgación

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para proporcionar al menos un diastereoisómero de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85%, donde el método comprende los pasos de:

suspender una mezcla de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato y gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en un solvente o una mezcla de solventes para formar una pasta; y

filtrar la pasta para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato sólida y un filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato disuelto en el solvente o mezcla de solventes;

en el que el gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato sólida es gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85% y/o el filtrado comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]- (S) -fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

Los inventores han encontrado que la diferencia en solubilidades entre los epímeros (R) y (S) es suficientemente alta para que se puedan separar los epímeros usando esta técnica simple. Sorprendentemente, este método proporciona no solo gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato enriquecida diastereoisomericamente, sino que puede formar uno o ambos epímeros en forma sustancialmente enriquecida diastereoisomericamente. En todos los solventes probados, el epímero (S) tiene una solubilidad más alta que el epímero (R). Por lo tanto, el epímero (S) está típicamente presente en forma enriquecida diastereoisoméricamente como una solución en el filtrado y el epímero (R) estará típicamente presente en forma enriquecida diastereoisoméricamente como un sólido en el filtro.

Ciertas realizaciones de la invención proporcionan un filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85% y un producto sólido que es una mezcla de diastereoisómeros. Ciertas realizaciones de la invención proporcionan un sólido que es gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85% y un filtrado que comprende una mezcla de diastereoisómeros. Ciertas realizaciones de la invención proporcionan tanto un sólido que es gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85% como un filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

Se puede llevar a cabo la formación de la pasta a temperatura ambiente (es decir, de 20 °C a 30 °C). Los inventores han encontrado que se pueden obtener buenas purezas diastereoisoméricas para los respectivos epímeros sin realizar ningún paso de calentamiento o enfriamiento.

Sin embargo, preferiblemente, se calienta la pasta durante al menos una porción del paso de formación de la pasta. Por lo tanto, puede ser que se caliente la pasta una vez formada. Se puede calentar la pasta a una temperatura desde aproximadamente 30 °C hasta aproximadamente 80 °C, por ejemplo, desde aproximadamente 40 °C hasta aproximadamente 70 °C. En ciertas realizaciones preferidas, se calienta la pasta a una temperatura desde aproximadamente 50 °C hasta aproximadamente 60 °C. Se puede calentar la pasta durante un día o menos. Se puede calentar la pasta durante 30 minutos o más. Puede ser apropiado un período de 1 a 3 horas.

Se puede también agitar la pasta durante al menos una porción del paso de formación de la pasta. Se puede agitar la pasta durante 3 días o menos, por ejemplo, un día o menos. Se puede agitar la pasta durante 30 minutos o más. Puede ser apropiado un período de 1 a 6 horas. La agitación puede incluir agitar, batir o ambos. La pasta se puede calentar y agitar simultáneamente o sustancialmente de manera simultánea.

Si se ha calentado la pasta, preferiblemente no se enfría la pasta antes de la filtración.

El método puede comprender además el paso de lavar la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato sólida. Este paso ocurre después de la separación por filtración. Esto normalmente se hará con el mismo solvente o mezcla de solventes que se usó para formar la pasta, aunque es concebible que se pueda usar un solvente diferente para lavar el sólido o, cuando se forma la pasta a partir de una mezcla de solventes, se usa solo uno de los solventes en la mezcla para lavar el sólido. Cuando se ha calentado la pasta, se puede realizar este paso de lavado usando solvente o una mezcla de solventes que están a temperatura elevada, por ejemplo, desde aproximadamente 40 °C hasta aproximadamente 70 °C, aunque esto no siempre será el caso. El solvente o la mezcla de solventes pueden estar a la misma temperatura que la pasta.

Se realiza generalmente este paso de lavado mencionado en el párrafo anterior mientras el sólido está en el filtro para obtener un filtrado de lavado. Típicamente, se combina el filtrado de lavado con el primer filtrado. A lo largo de esta especificación, cuando se usa junto con el procesamiento del filtrado después de la filtración, el término 'filtrado' pretende abarcar tanto un filtrado combinado obtenido combinando un primer filtrado como un filtrado de lavado formado de esta manera, y también, donde el primer filtrado no se combina con un filtrado de lavado, el término se refiere al primer filtrado por sí solo.

Se define 'sustancialmente diastereoméricamente puro' para los propósitos de esta invención como una pureza diastereoisomérica de más de aproximadamente 85%. Ciertas realizaciones de la presente invención logran el aislamiento de (R)- y/o (S)-gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en purezas diastereoisoméricas considerablemente superiores al 85%. Por lo tanto, el o cada epímero de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato obtenido por el método de la reacción puede tener una pureza diastereoisomérica mayor que aproximadamente 90%. La pureza diastereoisomérica de uno o ambos de los epímeros obtenidos por los métodos de la invención puede ser superior al 95%, 98%, 99%, o incluso 99.5%.

Para que se obtenga un epímero en una 'forma enriquecida diastereoisoméricamente' se define para los fines de esta invención, que una mayor proporción del gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato es ese epímero que estaba presente en la mezcla de partida. Por lo general, la mezcla de partida será el producto de la síntesis original de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato. Puede ser que la relación de epímeros (R):(S) en el material de partida esté entre 10: 1 y 1:10. Preferiblemente, la relación de epímeros (R) :(S) está entre 5: 1 y 1: 5, por ejemplo, entre 3:1 y 1:3 o entre 2:1 y 1:2.

Se observó cierta separación de diastereoisómeros para todos los solventes probados.

Puede ser que el solvente sea o que la mezcla de solventes comprenda un solvente seleccionado entre un solvente prótico polar y un solvente aprótico polar. Otros solventes que podrían estar presentes en la mezcla de solventes incluyen solventes próticos polares, solventes apróticos polares, solventes no polares y agua. Puede ser que el solvente sea tolueno o que la mezcla de solventes comprenda tolueno. Puede ser que el solvente sea un solvente seleccionado de: un alcohol C_2-C_4, acetonitrilo (ACN), tolueno, acetona, metiletilcetona (MEK) y mezclas de los mismos, o puede ser que la mezcla de solventes comprenda uno o más de esos solventes junto con otro solvente o solventes. En ciertos casos, el solvente es un solvente seleccionado de: alcohol C_3-C_4 (por ejemplo, n-propanol, iso-propanol (IPA), n-butanol), acetonitrilo y mezclas de los mismos, o que la mezcla de solventes comprende uno o más de esos solventes. Puede ser que el solvente sea o que la mezcla de solvente comprenda un alcohol C_3-C_4 (por ejemplo, n-propanol, IPA, n-butanol). En ciertas realizaciones preferidas, el solvente es o la mezcla de solventes comprende IPA. En otras realizaciones preferidas, el solvente es o la mezcla de solvente comprende acetonitrilo.

Puede ser que el solvente sea un alcohol C_3-C_4 (por ejemplo, n-propanol, IPA, n-butanol). En ciertas realizaciones preferidas, el solvente es IPA. En otras realizaciones preferidas, el solvente es acetonitrilo.

Los términos 'alcohol C_2-C_4' y 'alcohol C_3-C_4' pretenden abarcar tanto alcoholes de cadena lineal como ramificados. Por lo tanto, para completar, el término alcohol C2-C4 indica un alcohol seleccionado de etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol y tert-butanol.

La mezcla de solventes puede comprender agua. Puede ser que las proporciones relativas del solvente y el agua sean tales que el agua y el solvente sean miscibles. En este caso, el agua puede actuar como un antisolvente, disminuyendo la solubilidad de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en el sistema de solventes. Si hay agua presente, puede ser el 20% o menos del volumen total de la mezcla de solventes (es decir, el volumen del solvente más el volumen del agua), por ejemplo 10% o menos o 5% o menos. Puede ser 0.1% o mayor del volumen total de la mezcla de solventes.

La mezcla de solventes puede comprender otro solvente prótico polar y/o solvente aprótico polar. La mezcla de solventes puede comprender un solvente no polar, por ejemplo, un alcano o cicloalcano. Los ejemplos de alcanos y cicloalcanos incluyen: pentanos, hexanos, heptanos, octanos y ciclohexano. Cuando la mezcla de solvente comprende un solvente no polar, típicamente será el caso que ese solvente no polar esté presente en una cantidad menor al 50% de la mezcla de solvente. Sin embargo, este no siempre será el caso, y es concebible que el solvente no polar represente hasta el 90% de la mezcla de solventes.

Puede ser que el solvente no esté presente en una mezcla y se use sustancialmente puro, excepto por impurezas menores (es decir, que tiene una pureza superior al 95%, por ejemplo, superior al 99%).

El solvente puede ser sustancialmente puro (es decir, tener una pureza superior al 95%) de alcohol C3-C4 (por ejemplo, n-propanol, IPA, n-butanol) o acetonitrilo. En ciertas realizaciones preferidas, el solvente es IPA sustancialmente puro (es decir, tiene una pureza superior al 95%). En otras realizaciones preferidas, el solvente es acetonitrilo sustancialmente puro (es decir, que tiene una pureza superior al 95%).

Puede ser que el solvente no se seleccione entre: etanol, glicerol, propilenglicol, PEG 400 (polietilenglicol), NMP y DMSO. Cuando se forma la pasta usando una mezcla de solventes, puede ser que la mezcla de solventes no comprenda un solvente seleccionado entre: etanol, glicerol, propilenglicol, PEG 400 (polietilenglicol), NMP y DMSO.

Puede haber circunstancias en las que sea apropiado incluir uno o más solventes marcados isotópicamente con el fin de facilitar el análisis posterior, etc.

El método puede ser un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en forma diastereoisoméricamente pura.

Si este es el caso, el método puede comprender además el paso de eliminar los solventes del filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida en una forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

Si este es el caso, el método puede comprender además el paso de eliminar los solventes del filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida en una forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

El paso de eliminar el solvente o la mezcla de solventes puede comprender:

eliminar una porción del solvente o mezcla de solventes del filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato por evaporación, por ejemplo, por destilación o evaporación bajo presión reducida, para proporcionar un filtrado concentrado que comprende gemcitabina sólida [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato;

opcionalmente agitar el filtrado concentrado; y

filtrar el filtrado concentrado para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato como un sólido en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

El filtrado concentrado contiene un sólido suspendido.

A medida que la solución se concentra, se cristaliza gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato y los inventores han descubierto sorprendentemente que estos cristales a menudo tienen una pureza diastereoisomérica mejorada en relación con el filtrado obtenido en el primer paso de filtración. Típicamente, agitar la solución una vez que se concentra permite que se formen más cristales y aumenta el rendimiento. El epímero (S) es más soluble que el epímero (R) y, por lo tanto, es sorprendente que el epímero (S) se libere con mayor pureza.

Puede ser que la porción de solvente que se elimina es del 10% al 90% del volumen obtenido del primer paso de filtración. Preferiblemente, es del 25% al 75% del volumen obtenido del primer paso de filtración, por ejemplo, del 40% al 60%.

Los pasos de concentración y los pasos de agitación (si están presentes) pueden ocurrir simultáneamente durante al menos una parte de la duración de cada paso.

Si se agita el filtrado concentrado, se puede agitar durante 7 días o menos, por ejemplo 5 días o menos. Puede agitarse durante 1 hora o más, por ejemplo 6 horas o más, 12 horas o más o 1 día o más.

El paso de eliminar el solvente puede comprender eliminar sustancialmente todos los solventes de la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato mediante un proceso de recristalización/filtración para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida en una forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura. Esto es particularmente preferido cuando se mantuvo la pasta a una temperatura elevada durante la formación de la pasta y los pasos de filtración.

El paso de eliminar el solvente puede comprender:

enfriar el filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato para proporcionar un filtrado enfriado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida;

opcionalmente agitar el filtrado enfriado; y

filtrar el filtrado enfriado para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato como un sólido en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura.

El filtrado enfriado contiene un sólido suspendido.

Se puede enfriar el filtrado a una temperatura desde aproximadamente -10 ºC hasta aproximadamente 45 ºC, por ejemplo, desde aproximadamente 5 °C hasta aproximadamente 40 °C. Preferiblemente, se enfría el filtrado a una temperatura desde aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 35 °C. Se puede enfriar el filtrado gradualmente o por etapas. Puede, por ejemplo, enfriarse a una temperatura (por ejemplo, una temperatura desde aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 35 °C) mantenido a esa temperatura durante un período de tiempo (por ejemplo, desde aproximadamente una hora hasta aproximadamente 2 días) y luego enfriarse a otra temperatura más baja (por ejemplo, una temperatura desde aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 25 °C) y mantenida a esa temperatura durante un período de tiempo adicional (por ejemplo, desde aproximadamente una hora hasta aproximadamente 2 días).

El método puede comprender los pasos de agregar material semilla al filtrado. Esto podría ocurrir antes de que se enfríe el filtrado, a medida que se enfría el filtrado o después de que se haya enfriado el filtrado. Preferiblemente, sin embargo, se agrega una vez que el filtrado se ha enfriado. El material semilla típicamente tomará la forma de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato de alta pureza diastereoisomérica (por ejemplo, 90% o más o 95% o más). Se puede agregar el material de semilla como un sólido, pero más convenientemente se puede agregar como una pasta o suspensión. La pasta o suspensión puede comprender el mismo solvente o mezcla de solventes que el filtrado. Cuando el filtrado comprende una mezcla de solventes, la pasta o suspensión de material de semilla puede comprender gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en uno de esos solventes. Alternativamente, la pasta o suspensión de material semilla puede comprender gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en un solvente que no está presente en el filtrado.

El método puede comprender el paso de añadir solvente adicional al filtrado. Esto podría ocurrir antes de que el filtrado se enfríe, a medida que se enfría el filtrado o después de que el filtrado se haya enfriado. Preferiblemente, sin embargo, se agrega una vez que el filtrado se ha enfriado. La adición del solvente adicional servirá típicamente para disminuir

la solubilidad de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en el filtrado modificado en relación con su solubilidad en el solvente del filtrado no modificado o la mezcla de solventes. El solvente adicional puede ser agua. El solvente adicional puede ser un no polar, por ejemplo, un alcano o cicloalcano o mezclas de los mismos. Cuando el filtrado comprende una mezcla de solventes, el solvente adicional puede ser uno o más de esos solventes en la mezcla en la cual la solubilidad de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato es menor de lo que es para otros solventes en la mezcla. Por lo tanto, cuando el filtrado comprende un solvente prótico polar o aprótico mezclado con agua, el solvente adicional puede ser agua.

Si se agita el filtrado enfriado, se puede agitar durante 7 días o menos, por ejemplo 5 días o menos. Puede agitarse durante 1 hora o más, por ejemplo 6 horas o más, 12 horas o más o 1 día o más.

Los pasos de enfriamiento y los pasos de agitación (si están presentes) pueden ocurrir simultáneamente durante al menos una porción de la duración de cada paso.

El método puede comprender además el paso de lavar la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida sustancialmente diastereoisoméricamente pura. Esto se hará típicamente con el mismo solvente o mezcla de solventes de los que estaba compuesto el filtrado, aunque es concebible que se pueda usar un solvente diferente para lavar el sólido o, cuando el filtrado comprenda una mezcla de solventes, que se usa solo uno de los solventes en esa mezcla para lavar el sólido. Se realiza típicamente este proceso de lavado mientras el sólido está en el filtro. Se realiza típicamente este paso de lavado usando un solvente frío (por ejemplo, una temperatura desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20ºC) o una mezcla de solventes.

Se pueden eliminar los solventes residuales de la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida en forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura, por ejemplo, calentando el sólido al vacío.

El método puede ser un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato en forma diastereoisoméricamente pura.

Si este es el caso, el método puede comprender además los pasos:

suspender gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato sólida obtenida de la primera filtración en un segundo solvente o una segunda mezcla de solventes para formar una segunda pasta; y

filtrar la segunda pasta para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato sólida sustancialmente diastereoisomérica.

El segundo solvente o la segunda mezcla de solventes pueden ser iguales o diferentes a los utilizados en el primer paso de suspensión.

Puede ser que el segundo solvente sea o que la segunda mezcla de solventes comprenda un solvente seleccionado entre un solvente prótico polar y un solvente aprótico polar. Puede ser que el segundo solvente sea o que la segunda mezcla de solvente comprenda tolueno. Otros solventes que podrían estar presentes en la segunda mezcla de solventes incluyen solventes próticos polares, solventes apróticos polares, solventes no polares y agua. Puede ser que el segundo solvente sea o que la segunda mezcla de solventes comprenda un solvente seleccionado entre: un alcohol C_2-C_4, acetonitrilo (ACN), tolueno, acetona, metil etil cetona (MEK) y mezclas de los mismos. Puede ser que el segundo solvente sea o que la segunda mezcla de solventes comprenda un solvente seleccionado entre: alcohol C_3-C_4 (por ejemplo, n-propanol, iso-propanol (IPA), n-butanol), acetonitrilo y mezclas de los mismos. Puede ser que el segundo solvente sea o que la segunda mezcla de solventes comprenda un alcohol C_3-C_4 (por ejemplo, n-propanol, IPA, n-butanol). En ciertas realizaciones preferidas, el segundo solvente es o la segunda mezcla de solvente comprende IPA. En otras realizaciones preferidas, el segundo solvente es o la segunda mezcla de solventes comprende acetonitrilo.

Puede ser que el segundo solvente sea un alcohol C_3-C_4 (por ejemplo, n-propanol, IPA, n-butanol). En ciertas realizaciones preferidas, el segundo solvente es IPA. En otras realizaciones preferidas, el segundo solvente es acetonitrilo.

La segunda mezcla de solventes puede comprender agua. Puede ser que las proporciones relativas del solvente y el agua sean tales que el agua y el solvente sean miscibles. En este caso, el agua puede actuar como un antisolvente, reduciendo la solubilidad de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en el segundo sistema de solvente. Si hay agua presente, puede ser el 20% o menos del volumen total de la segunda mezcla de solventes (es decir, el volumen del solvente más el volumen del agua), por ejemplo 10% o menos o 5% o menos. Puede ser 0.1% o mayor del volumen total de la segunda mezcla de solventes.

La segunda mezcla de solventes puede comprender otro solvente prótico polar y/o solvente aprótico polar. La segunda mezcla de solventes puede comprender un solvente no polar, por ejemplo, un alcano o cicloalcano. Los ejemplos de alcanos y cicloalcanos incluyen: pentanos, hexanos, heptanos, octanos y ciclohexano. Cuando la segunda mezcla de solvente comprende un solvente no polar, típicamente será el caso que ese solvente no polar esté presente en una

cantidad menor al 50% de la segunda mezcla de solvente. Sin embargo, este no siempre será el caso, y es concebible que el solvente no polar represente hasta el 90% de la segunda mezcla de solventes.

Puede ser que el segundo solvente no esté presente en una mezcla y se use sustancialmente puro, excepto por impurezas menores (es decir, que tiene una pureza superior al 95%, por ejemplo, superior al 99%).

El segundo solvente puede ser sustancialmente puro (es decir, tener una pureza superior al 95%) de alcohol C_3-C_4 (por ejemplo, n-propanol, IPA, n-butanol) o acetonitrilo. En ciertas realizaciones preferidas, el segundo solvente es IPA sustancialmente puro (es decir, que tiene una pureza superior al 95%). En otras realizaciones preferidas, el segundo solvente es acetonitrilo sustancialmente puro (es decir, que tiene una pureza superior al 95%).

La divulgación también se refiere a una forma cristalina de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato, siendo la forma cristalina la forma I. Se puede caracterizar dicha forma cristalina (es decir, la Forma 1) porque dicha forma tiene un patrón XRPD con al menos dos picos (por ejemplo, al menos cuatro picos) en 2θ seleccionados entre 5.0, 6.7, 8.0, 11.3, 20.2 y 21.4 cuando se mide usando radiación Cu con una relación $K_{\alpha2}/K_{\alpha1}$ de 0.5. Puede ser que dicha forma cristalina tenga un patrón XRPD con picos en 2θ 5.0, 6.7, 8.0, 11.3, 20.2 y 21.4 cuando se mide usando radiación Cu con una relación $K_{\alpha2}/K_{\alpha1}$ de 0.5. Puede ser que dicha forma cristalina tenga un patrón XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 1. Puede ser que dicha forma cristalina tenga un patrón FTIR, cuando se mide como una suspensión en Nujol, sustancialmente como se muestra en la Figura 2.

Breve descripción de los dibujos

Se describen adicionalmente las realizaciones de la invención a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es un espectro XRPD de la forma I cristalina de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato.

La Figura 2 es un espectro FTIR de la forma I cristalina de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato obtenida de los métodos de la invención puede existir en una forma de cristal único o en una mezcla de formas de cristal o puede ser amorfa.

Se pueden usar también los métodos de la presente invención para proporcionar todas las formas de compuestos 3 o 4 marcadas isotópicamente farmacéuticamente aceptables en las que se reemplazan uno o más átomos por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o un número de masa diferente a partir de la masa atómica o número de masa del isótopo predominante que usualmente se encuentra en la naturaleza.

Entre los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos usados y obtenidos por la invención se incluyen isótopos de hidrógeno, tal como ^{2}H y ^{3}H, carbono, tal como ^{11}C, ^{13}C y ^{14}C, cloro, tal como ^{36}Cl, flúor, tal como ^{18}F, yodo, tal como ^{123}I y ^{125}I, nitrógeno, tal como ^{13}N y ^{15}N, oxígeno, tal como ^{15}O, ^{17}O y ^{18}O, fósforo, tal como ^{32}P, y azufre, tal como ^{35}S.

Ciertos compuestos marcados isotópicamente, por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o tejidos de sustrato. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ^{3}H, y carbono-14, es decir, ^{14}C, son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios de detección listos.

La sustitución por isótopos más pesados como el deuterio, es decir, ^{2}H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una vida media in vivo aumentada o requisitos de dosificación reducidos, y por lo tanto puede ser preferible en algunas circunstancias.

La sustitución con isótopos emisores de positrones, tales como ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O y ^{13}N, puede ser útil en estudios de Topografía por Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato.

Se pueden preparar los compuestos marcados isotópicamente generalmente mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado previamente empleado.

Se sabe en la técnica que se puede obtener un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene uno o más errores de medición dependiendo de las condiciones de medición (tales como equipo, preparación de muestra o máquina utilizada). En particular, se sabe que las intensidades en un patrón de difracción de rayos X en polvo pueden fluctuar dependiendo de las condiciones de medición y la preparación de la muestra. Por ejemplo, las personas expertas en la técnica de difracción de rayos X en polvo se darán cuenta de que las intensidades relativas de los picos pueden variar de acuerdo con la orientación de la muestra bajo prueba y el tipo y la configuración del instrumento utilizado. La persona experta también se dará cuenta de que la posición de los reflejos puede verse afectada por la altura precisa a la que se encuentra la muestra en el difractómetro y la calibración a cero del difractómetro. La planitud de la superficie de la muestra también puede tener un pequeño efecto. Por lo tanto, una persona experta en la técnica apreciará que

no se deben interpretar los datos del patrón de difracción presentados aquí como absolutos y que cualquier forma cristalina que proporcione un patrón de difracción de potencia sustancialmente idéntico a los divulgados aquí está dentro del alcance de la presente divulgación (para más información, véase Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons, 1996)."

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, las palabras "comprenden" y "contienen" y las variaciones de las mismas indican "incluido pero no limitado a", y no están destinadas a excluir (y no) otras fracciones, aditivos, componentes, enteros o pasos. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, la especificación debe entenderse como contemplar la pluralidad y la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Debe entenderse que se pueden aplicar las características, los números enteros, los rasos, los compuestos, las fracciones químicas o los grupos descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito aquí, a menos que sea incompatible con ellos. Todas las características divulgadas en esta especificación (incluyendo las reivindicaciones, resúmenes y dibujos adjuntos), y/o todos los pasos de cualquier método o proceso así divulgado, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos algunas de dichas características y/o los pasos son mutuamente excluyentes. La invención no está restringida a los detalles de ninguna de las realizaciones anteriores. La invención se extiende a cualquier novedad, o cualquier combinación novedosa, de las características divulgadas en esta especificación (incluyendo las reivindicaciones, resumen y dibujos adjuntos), o cualquier novedad, o cualquier combinación novedosa, de los pasos de cualquier método o proceso así divulgado.

La atención del lector se dirige a todos los artículos y documentos que se presentan de manera concurrente o anterior a esta especificación en relación con esta aplicación y que están abiertos a inspección pública con esta especificación.

Las siguientes abreviaturas se utilizan en esta especificación:

ACN - acetonitrilo	DMF - N,N-dimetilformamida
DMSO -dimetilsulfóxido	IPA - alcohol isopropílico
MEK - metil etil cetona	MIBK - metil isobutil cetona
NMP - N-metilpirrolinona	PEG - polietilenglicol
TBDMS - tert-butildimetilsilil	TBME - tert-butil metil éter
TFA - ácido trifluoroacético	
FDA - Administración de alimentos y medicamentos	

Se pueden caracterizar los isómeros individuales de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato usando los siguientes métodos de caracterización:

Se registraron los espectros de RMN de protón (^{1}H), carbono (^{13}C), fósforo (^{31}P) y flúor (^{19}F) en un espectrómetro Bruker Avance 500 a 25 °C. Se autocalibraron los espectros al pico de solvente deuterado y se desacoplaron todos los ^{13}C RMN y ^{31}P RMN con protones. Se comprobó que la pureza de los compuestos finales era> 95% mediante análisis por HPLC usando Varian Polaris C18-A (10 µM) como una columna analítica con un gradiente de elución de H_2O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 35 minutos. El análisis de HPLC fue realizado por Varian Prostar (detector de LC Workstation-Varian prostar 335 LC).

2'-desoxi-2', 2'-difluoro-D-citidina-5'-O- [fenil(benciloxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato 3

(ES+) *m/z,* hallado: (M + Na^+) 603.14. $C_{25}H_{27}F_2N_4O_8NaP$ requerido: (M^+) 580.47. ^{31}P NMR (202 MHz, MeOD): δ_P3.66

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): δ_H 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-6), 7.38 - 7.32 (m, 7H, ArH), 7.26 - 7.20 (m, 3H, ArH), 6.24 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 5.84 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-5), 5.20 (sistema AB, J_{AB} = 12.0 Hz, 2H, OCH_2Ph), 4.46 - 4.43 (m, 1H, H-5'), 4.36 - 4.31 (m, 1H, H-5'), 4.25 - 4.19 (m, 1H, H-3'), 4.07 - 4.00 (m, 2H, H-4', $CHCH_3$), 1.38 (d, J= 7.2 Hz, 3H, $CHCH_3$).

^{19}F NMR (470 MHz, MeOD): δ_F - 118.0 (d, *J* = 241 Hz, *F*), - 120.24 (ancho d, *J* = 241 Hz, *F).*

^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): δ_C 174.61 (d, $^{3}J_{C\text{-}P}$ = 5.0 Hz, *C*=O, éster), 167.63 (*C*-NH_2), 157.74 (base *C*=O), 152.10 (d, $^{2}J_{C\text{-}P}$ = 7.0 Hz, *C*-Ar), 142.40 (base CH), 137.22 (*C*-Ar), 130.90, 129.63, 129.39, 129.32, 126.32 (*C*H-Ar), 124.51 (d, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 257 Hz, CF_2), 121.47, 121.43 (*C*H-Ar), 96.67 (base *C*H), 85.92 (señal ancha, *C*-1'), 80.31 (*C*-4'), 71.27

(aparente t, $^2J_{C-F}$ = 23.7 Hz, *C*-3'), 68.03 (O*C*H$_2$Ph), 65.73 (d, $^2J_{C-P}$ = 5.30 Hz, *C*-5'), 51.66 (*C*HCH$_3$), 20.42 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.25 Hz, CH*C*H$_3$).

La HPLC inversa, eluyendo con H2O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 35 min, mostró un pico de diastereoisómero con t_R = 22.53 min.

2'-desoxi-2', 2'-difluoro-D-citidina-5'-O-[fenil(benciloxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato 4.

(ES+) m/z, hallado: (M + Na+) 603.14. $C_{25}H_{27}F_2N_4O_8NaP$ requerido: (M+) 580.47.

^{31}P NMR (202 MHz, MeOD): δ_P 3.83

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): δ_H 7.56 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-6), 7.38 - 7.31 (m, 7H, ArH), 7.23 - 7.19 (m, 3H, ArH), 6.26 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 5.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-5), 5.20 (s, 2H, OCH$_2$Ph), 4.49 - 4.46 (m, 1H, H-5'), 4.38 - 4.34 (m, 1H, H-5'), 4.23 - 4.17 (m, 1H, H-3'), 4.07 - 4.01 (m, 2H, H-4', CHCH$_3$), 1.38 (d, J= 7.2 Hz, 3H, CHCH$_3$).

^{19}F NMR (470 MHz, MeOD): δ_F - 118.3 (d, J = 241 Hz, F), - 120.38 (ancho d, J = 241 Hz, F).

^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): δ_C 174.65 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.0 Hz, C=O, éster), 167.65 (C-NH$_2$), 157.75 (C=O base), 152.10 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.0 Hz, C-Ar), 142.28 (base CH), 137.50 (C-Ar), 130.86, 129.63, 129.40, 129.32, 126.31 (CH-Ar), 124.50 (d, $^1J_{C-F}$ = 257 Hz, CF2), 121.44, 121.40 (CH-Ar), 96.67 (base CH), 85.90 (señal ancha, C-1'), 80.27 (C-4'), 71.30 (t aparente, $^2J_{C-F}$ = 23.7 Hz, C-3'), 68.02 (OCH$_2$Ph), 65.50 (C-5'), 51.83 (CHCH$_3$), 20.22 (d, $^3J_{C-P}$= 7.5 Hz, CHCH$_3$).

La HPLC inversa, eluyendo con H$_2$O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 35 min, mostró un pico de diastereoisómero con t_R = 21.87 min.

Ejemplo 1 - Cribado con solvente

En primer lugar, se realizó un cribado con 17 solventes diferentes (véase la Tabla 1). Aproximadamente se suspendieron 25 mg de una mezcla diastereomérica (33:67 (R):(S)) de NUC-1031 en los solventes listados (1 mL) y se agitó durante la noche. En caso de que ocurriera la disolución, se añadió más sólido. Se sedimentaron las suspensiones y se determinaron las cantidades relativas de los dos diastereoisómeros en solución por HPLC.

Tabla 1: Los porcentajes **en negrilla** indican un enriquecimiento diastereoisomérico alto (> 85%) en la solución.

Solvente	Epímero (R) [%]	Epímero (S) [%]	Epímero (R) [mg/ml]	Epímero (S) [mg/ml]
TBME	39.4	60.6	0.1	0.1
acetona	12.3	**87.7**	2.2	7.7
THF	18.6	81.4	3.0	6.6
MeOH	24.5	75.5	22.8	35.1
EtOAc	24.9	75.1	0.7	1.1
EtOH	13.5	**86.5**	4.9	15.7
IPA	5.8	**94.2**	1.6	13.0
MEK	12.4	**87.6**	0.9	3.2
ACN	5.4	**94.6**	1.1	10.0
iPrOAc	31.8	68.2	0.6	0.6
nPrOH	9.1	**90.9**	2.2	10.8
neptano	31.8	68.2	0.4	0.4
H_2O	23.2	76.8	0.5	0.9
tolueno	10.8	**89.2**	0.2	0.7

MIBK	25.6	74.4	0.7	1.0
nBuOH	5.2	**94.8**	1.6	14.4
MeTHF	19.9	80.1	0.6	1.2

Por lo tanto, varios solventes (acetona, EtOH, IPA, MEK, CAN, nPrOH, tolueno, nBuOH) exhibieron un alto enriquecimiento diastereoisomérico del epímero (S) en la solución. El cribado identificó tres solventes que condujeron a un excelente enriquecimiento (> 94%) del diastereoisómero (S) en la solución: isopropanol, acetonitrilo y n-butanol.

Ejemplo 2 - Optimización de la cristalización

Se evaluaron el enriquecimiento proporcionado por acetonitrilo e isopropanol en un intervalo de concentraciones y temperaturas (véase la Tabla 2). Se realizaron dos tipos de experimentos: pastas simples (20 °C) en diferentes volúmenes y pastas/recristalizaciones a 80 °C. Para los experimentos, se suspendieron 200 mg de la mezcla diastereomérica (33:67 (R) :(S)) en los solventes y el volumen indicado a continuación y opcionalmente se calentó a reflujo y se enfrió a 20 °C. Las pastas se agitaron durante la noche y se aislaron. La HPLC determinó las proporciones relativas de los dos epímeros presentes tanto en la solución como en la torta sólida.

Tabla 2

Temp. [°C]	Solvente (sólido/ solución)	Volumen [vol]	Epímero (R) [%]	Epímero (S) [%]	Epímero (R) [mg/ml]	Epímero (S) [mg/ml]	Torta [mg]
20°C	Sólido de ACN	25	44.6	55.4			125
20°C	Solución de ACN	25	6.9	**93.1**	0.67	9.04	
20°C	Sólido de ACN	50	63.7	36.3			83
20°C	Solución de ACN	50	6.2	**93.8**	0.59	8.85	
20°C	Sólido de ACN	75	**91.8**	8.2			59
20°C	Solución de ACN	75	6.1	**93.9**	0.63	9.74	
20°C	Sólido de IPA	25	77.6	22.4			68
20°C	Solución de IPA	25	4.2	**95.8**	0.77	17.75	
20°C	Sólido de IPA	50	91.7	8.3			59
20°C	Solución de IPA	50	5.6	**94.4**	0.77	12.98	
20°C	Sólido de IPA	75	**91.8**	8.2			72
20°C	Solución de IPA	75	7.5	**92.5**	0.58	7.16	
83°C	Sólido de ACN	25	41.7	58.3			161
83°C	Solución de ACN	25	8.4	**91.6**	1.01	11.03	
83°C	Sólido de ACN	50	65.6	34.4			80
83°C	Solución de ACN	50	9.0	**91.0**	1.09	11.00	
83°C	Sólido de ACN	75	**90.1**	9.9			74

83°C	Solución de ACN	75	10.0	**90.0**	1.19	10.67	
83°C	Sólido de IPA	25	74.3	25.7			96
83°C	Solución de IPA	25	7.2	**92.8**	1.42	18.20	
83°C	Sólido de IPA	50	88.0	12.0			147
83°C	Solución de IPA	50	20.8	79.2	3.38	12.83	

Para cada muestra, se repitió el tratamiento pero esto no condujo a un enriquecimiento adicional. Esto demuestra que la disolución simple de la mezcla diastereoisomérica, como se describe en la declaración del primer aspecto, puede proporcionar un excelente enriquecimiento diastereoisomérico, particularmente del epímero (S). Este efecto no se ve afectado sustancialmente por la concentración del solvente con respecto a la masa de NUC-1031 y tampoco se ve afectado sustancialmente por la temperatura. Por lo tanto, el proceso proporciona una técnica eficiente de separación a temperatura ambiente.

Ejemplo 3 - Escalamiento

Se disolvieron 2 x 25 g de una mezcla diastereomérica de los epímeros (R) y (S) (33:67 (R):(S)) cada uno en acetonitrilo de 75 vol a 25 °C. Se combinaron las suspensiones durante la filtración. La primera filtración proporcionó una solución A2 y un sólido A1. Se volvió a suspender la torta del filtro y la suspensión resultante se filtró para obtener una segunda solución B2 y una segunda torta sólida B1 (véase la Tabla 3).

Tabla 3

	Epímero (R) [%]	Epímero (S) [%]	Torta [g]
Sólido A1 (después de la primera filtración)	73.7	26.3	18.43
Solución A2 (obtenido de la primera filtración)	5.2	**94.8**	aprox. 31
Sólido B1 (después de la segunda filtración)	**91.6**	8.4	14.9
Solución B2 (obtenido de la segunda filtración)	6.5	**93.5**	aprox. 4

Ejemplo 4 - Enriquecimiento adicional de la pureza diastereoisomérica del epímero (S)

Se combinaron el resto de las dos soluciones A2 y B2 del escalamiento en acetonitrilo (aprox. 2.6 L), se concentraron hasta aproximadamente el 50% del volumen original y se agitaron durante 3 días. La suspensión formada se filtró y esto dio como resultado una muestra sólida altamente enriquecida diastereoisomérica del epímero (S) en el filtro (Tabla 4).

Tabla 4

	Epímero (R) [%]	Epímero (S) [%]	Torta [g]

Sólido obtenido del proceso de concentración/filtración.	0.2	**99.8**	19.0

Por lo tanto, se puede obtener el epímero (S) en excelente pureza diastereoisomérica a gran escala usando los procesos de la invención. Esto representa una ventaja sustancial para la fabricación a gran escala ya que el proceso evita la necesidad de un paso cromatográfico con todas sus dificultades concomitantes.

Ejemplo 5 - Enriquecimiento adicional de la pureza diastereoisomérica del epímero (R)

Para obtener un alto enriquecimiento diastereoisomérico del epímero (R), se suspendieron muestras de sólido B1 en mezclas de solventes (50 mg del sólido en 1 mL de las mezclas de solventes indicadas en la Tabla 5) y se filtraron. Se enriquecieron los sólidos resultantes en el epímero (R), como se indica en la Tabla 5, obteniéndose el mejor resultado con agua añadida al acetonitrilo como antisolvente.

Tabla 5

Solvente	Epímero (R) [%]	(Epímero (S) [%]	Torta [mg]
IPA/H_2O 9:1	**97.2**	2.8	50
ACN/IPA 9:1	**94.5**	5.5	35
ACN/H_2O 9:1	**99.2**	0.8	20
IPA	**93.7**	6.3	34

El rendimiento de la mezcla de acetonitrilo/agua fue bajo y, por lo tanto, se repitió el experimento con una cantidad menor de agua en la mezcla de solventes. Los resultados mostraron una recuperación mejorada y algo de enriquecimiento diastereoisomérico (Tabla 6).

Tabla 6

Solvente	Epímero (R) [%]	(Epímero (S) [%]	Torta [mg]
ACN + 2% de H_2O	94	6	42
ACN + 1% de H_2O	93.3	6.7	43
ACN + 0.5% de H_2O	93	7	43

Se resuspendió el material que contenía principalmente el epímero (R) (sólido B2) en 20 volúmenes de ACN/agua 10/1 durante 18 h y se filtró y se lavó el sólido obtenido con acetonitrilo. El sólido resultante contenía el epímero (R) en excelente pureza diastereoisomérica (Tabla 7).

Tabla 7

	Epímero (R) [%]	Epímero (S) [%]	Torta [%]
Sólido	**97.1**	2.9	**11.6**
Solución	65	35	-

Por lo tanto, se puede obtener el epímero (R) en excelente pureza diastereoisomérica a gran escala usando los procesos de la invención. Nuevamente, esto representa una ventaja sustancial para la fabricación a gran escala, ya que el proceso evita la necesidad de un paso cromatográfico con todas sus dificultades concomitantes.

Ejemplo 6 - Proceso optimizado adicional para el aislamiento de epímero (S) usando IPA

Se añadió 2'-desoxi-2', 2'-difluoro-D-citidina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] fosfato (120 g; 4:6 (R):(S); también contenía 5% en peso de impurezas desconocidas resultantes del proceso por el cual se preparó el compuesto) a IPA (600 ml) para formar una pasta. Se calentó la pasta a 50-54 ºC y se agitó a esa temperatura durante 2 horas. Se filtró la pasta mientras estaba caliente. Se lavó la torta con una porción adicional de IPA caliente (50-52 °C) (60 ml) mientras todavía estaba en el filtro. Se enfrió lentamente el filtrado (durante aproximadamente 2 horas) a 26-30 °C durante aproximadamente 2 horas y el material semilla (600 mg o 95% de isómero s de pureza diastereoisomérica como una pasta en 12 ml de IPA). Se agitó la mezcla durante 18 horas a 26-30 °C. Lugo se enfrió la mezcla a 18-22ºC y se agitó durante 8 horas más. Se filtro la suspensión y se lavó la torta con IPA enfriada (aproximadamente 15 °C) (120 ml). Se secó el producto sólido al vacío a aproximadamente 42 °C para proporcionar el epímero (S) (25% de rendimiento con base en la cantidad total de material de partida de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato; pureza diastereoisomérica final: 96-98%).

Ejemplo 7 - Polimorfo I del epímero (S) de NUC-1031

El proceso descrito en el Ejemplo 6 proporciona el epímero (S) de NUC-1031 como la forma cristalina, Forma I. La Forma I es un polimorfo de la base libre sin solvatar del epímero (S). Esta forma difiere de la que se ha observado que el epímero (S) adopta cuando se aísla después de la separación de los epímeros por técnicas cromatográficas y también la forma que se ha observado que el epímero (S) adopta cuando se obtiene como parte de una mezcla de los dos isómeros. Se ha encontrado que el polimorfo I es la forma polimórfica termodinámicamente más estable del isómero (S).

Difracción de rayos X en polvo (XRPD)

[0100] Se escaneó Una muestra del Polimorfo I del epímero (S) de NUC-1031 entre 3 y 35 ° 2θ. Se comprimió suavemente el material en un pozo montado sobre una película de Kapton. La muestra se cargó luego en un difractómetro PANalytical X'Pert Pro que funcionaba en modo de transmisión y se analizó utilizando las siguientes condiciones experimentales:

Datos de origen sin procesar	Medición XRD (*.XRDML)
Posición de inicio [°2θ]	3.0066
Posición final [°2θ]	34.9866
Tamaño del paso [°2θ]	0.0130
Tiempo de paso del Escaneado [s]	67.9377
Tipo de escaneado	Continuo
Modo PSD	Escaneado
Longitud de PSD [°2θ]	3.35
Offset [°2θ]	0.0000
Tipo de hendidura de divergencia	1.0000
Tamaño de hendidura de divergencia fija [°]	
Longitud del espécimen [mm]	10.00
Temperatura de medición [°C]	25.00
Material de ánodo	Cu
$K_{\alpha 1}$ [Å]	1.54060
$K_{\alpha 2}$ [Å]	1.54443
Relación de $K_{\alpha 2}$ / Kα1	0.50000
Ajustes del generador	40 mA, 40 kV
Radio del goniómetro [mm]:	240.00
Tamaño de ranura de Divergencia del tipo ranura de divergencia [mm]	91.00

Monocromador de haz incidente	No
Hilado	No

El espectro resultante se muestra en la Figura 1. Los picos observados fueron los siguientes:

No.	Pos. [°2Th.]	Espaciado d [Å]	Rel. Int. [%]
1	5.0	17.6	100
2	6.7	13.1	47
3	8.0	11.0	99
4	11.3	7.8	20
5	12.3	7.2	49
6	12.8	6.9	17
7	13.1	6.8	48
8	13.3	6.7	44
9	14.2	6.2	22
10	14.5	6.1	36
11	15.1	5.9	19
12	16.1	5.5	12
13	16.4	5.4	12
14	17.3	5.1	22
15	17.6	5.0	39
16	19.4	4.6	24
17	20.2	4.4	67
18	21.4	4.2	50
°2Th.= °2θ. Típicamente un error de ± 0.2° 2θ está presente en las posiciones de pico de XRPD.			

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Se llevó a cabo la espectroscopia infrarroja del Polimorfo I del epímero (S) de NUC-1031 en un espectrómetro Bruker ALPHA P. Se midió una muestra como una suspensión en Nujol (un aceite de parafina), que tiene picos importantes a 2950 - 2800 cm^{-1}, 1465 - 1450 cm^{-1} y 1380 - 1370 cm^{-1}. Por lo tanto, los espectros registrados mostraron estas absorciones además de los picos de absorción del material. Se colocaron las suspensiones en el centro de la placa del espectrómetro y se obtuvieron los espectros utilizando los siguientes parámetros:

Resolución:	4 cm^{-1}
Tiempo de escaneo en segundo plano:	16 escaneos
Tiempo de escaneo de muestra:	16 escaneos
Recolección de datos:	4000 a 400 cm^{-1}
Espectro de resultados:	Transmitancia
Software:	OPUS versión 6

El espectro resultante se muestra en la Figura 2. Los picos observados fueron los siguientes:

No.	Número de onda [cm^{-1}]	Rel. Int. [%]	Ancho [cm^{-1}]
1	425.7392	0.021	7.4353
2	448.5075	0.026	219.8878
3	463.8758	0.080	21.4726
4	525.8831	0.233	26.2914
5	549.5826	0.015	9.4326
6	586.0468	0.143	32.4597
7	600.7830	0.027	31.8945
8	627.2445	0.023	381.6600
9	644.8066	0.036	8.3719
10	688.9070	0.166	26.6137
11	698.6981	0.016	17.5876
12	724.9307	0.036	9.2117
13	753.7883	0.120	39.1492
14	770.4498	0.048	10.5722
15	791.0419	0.055	9.3795
16	817.0425	0.034	556.0071
17	837.8835	0.030	296.7700
18	893.7064	0.047	333.1303
19	904.0403	0.016	5.0158
20	942.5805	0.283	48.3700
21	1010.0664	0.065	9.4593
22	1031.9486	0.124	85.9780
23	1065.9395	0.079	22.7902
24	1093.1437	0.152	21.7363
25	1149.3243	0.189	30.0541
26	1196.3871	0.133	30.4226
27	1250.1776	0.127	13.7038
28	1291.5686	0.068	17.8539
29	1335.1966	0.013	17.5460
30	1409.8531	0.039	10.4020
31	1488.6895	0.072	608.5739
32	1521.4792	0.044	1460.2810
33	1619.6333	0.232	57.7815

34	1654.7923	0.070	11.9699
35	1733.6353	0.131	12.0269
36	3203.2904	0.061	100.4941
37	3425.8598	0.019	18.5688
38	3467.9918	0.007	9.6384

REIVINDICACIONES

1. Un método para proporcionar al menos un diastereoisómero de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85%, donde el método comprende los pasos de:

suspender una mezcla de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato y gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en un solvente o una mezcla de solventes para formar una pasta; y

filtrar la pasta para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato sólida y un filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato disuelto en el solvente o mezcla de solventes;

en el que la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato sólida es gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85% y/o el filtrado comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

2. Un método de la reivindicación 1, en el que se calienta la pasta una vez formada; opcionalmente a una temperatura de 30 °C a 80 °C.

3. Un método de la reivindicación 2, en el que no se enfría la pasta antes de la filtración.

4. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además el paso de lavar la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil]- fosfato sólida.

5. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método es un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85% y en el que el método comprende además el paso de eliminar los solventes del filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

6. Un método de la reivindicación 5, en el que el paso de eliminar el solvente o la mezcla de solventes comprende:

eliminar una porción del solvente o mezcla de solventes del filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato por evaporación, por ejemplo por destilación o evaporación bajo presión reducida, para proporcionar un filtrado concentrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida;

opcionalmente agitar el filtrado concentrado; y

filtrar el filtrado concentrado para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato como un sólido en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

7. Un método de la reivindicación 5, en el que el paso de eliminar el solvente o la mezcla de solventes comprende:

enfriar el filtrado que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato para proporcionar un filtrado enfriado que comprende gemcitabina-[[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida;

opcionalmente agitar el filtrado enfriado; y

filtrar el filtrado enfriado para obtener gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato como un sólido en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

8. Un método de la reivindicación 7, que comprende además el paso de añadir material de semilla al filtrado.

9. Un método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, que comprende además el paso de añadir solvente adicional al filtrado.

10. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además lavar el gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato sólida en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

11. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método es un método para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato en una pureza diastereoisomérica superior al 85%;

opcionalmente en el que el método comprende además los pasos:

suspender gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato sólida obtenida de la primera filtración en un segundo solvente o una segunda mezcla de solventes para formar una segunda pasta; y

filtrar la segunda pasta para proporcionar gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato sólida en una pureza diastereoisomérica superior al 85%.

12. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el solvente es o la mezcla de solventes comprende un solvente seleccionado de un solvente prótico polar y un solvente aprótico polar.

13. Un método de la reivindicación 12, en el que el solvente es o la mezcla de solventes comprende alcohol isopropílico.

14. Un método de la reivindicación 13, en el que el solvente es alcohol isopropílico.

15. Un método de la reivindicación 12, en el que el solvente es o la mezcla de solvente comprende acetonitrilo.

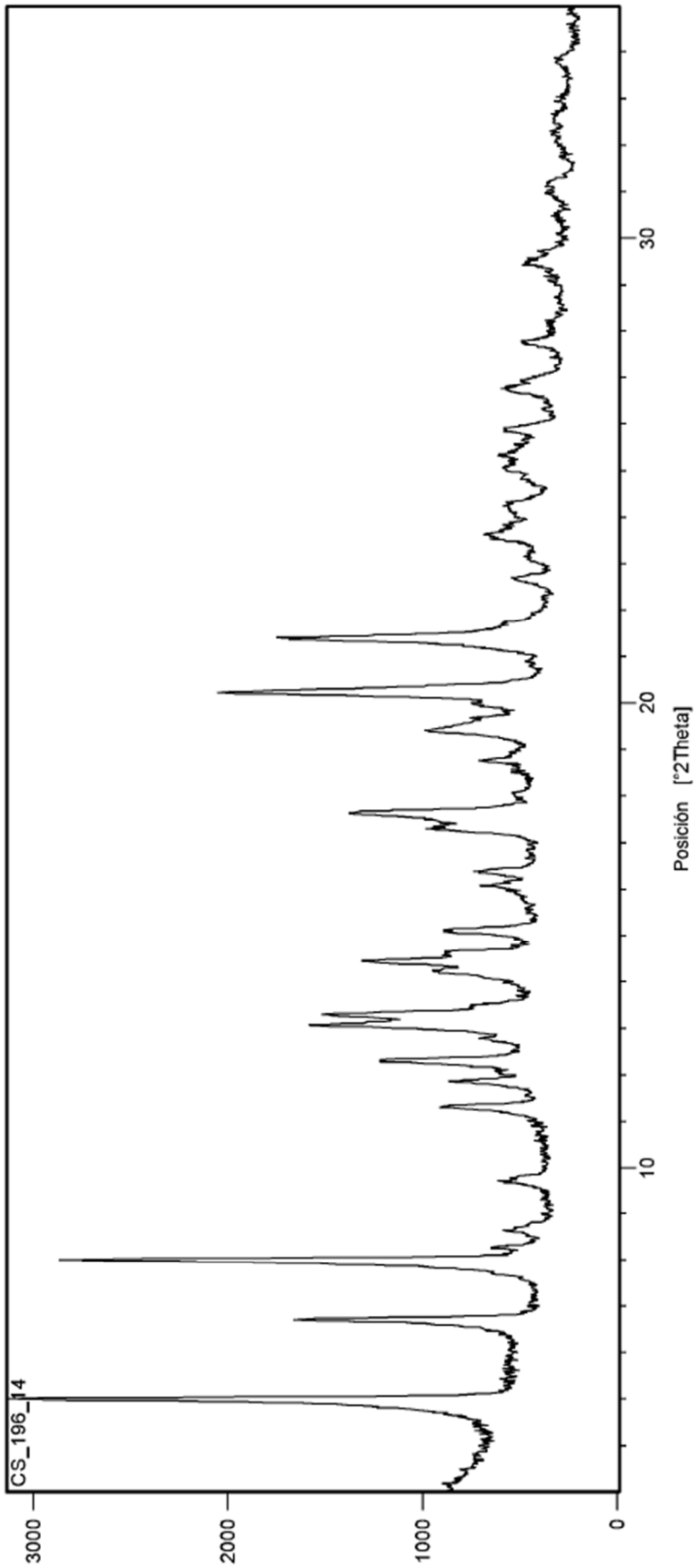


Figura 1

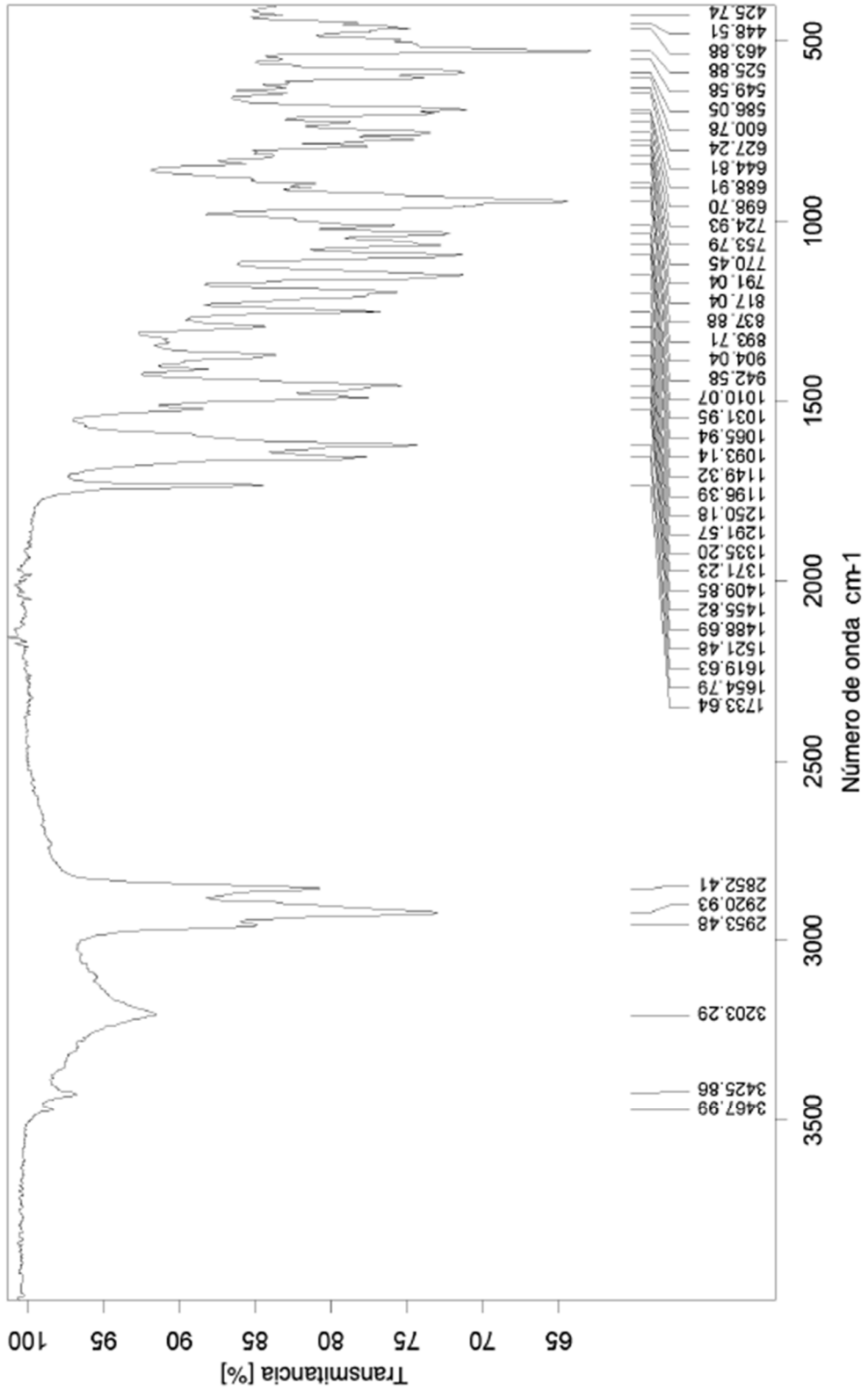

Transmitancia [%]
100
95
90
85
80
75
70
65
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Número de onda cm-1
3467.99
3425.86
3203.29
2953.48
2920.93
2852.41
1733.64
1654.79
1619.63
1521.48
1488.69
1455.82
1409.85
1371.23
1335.20
1291.57
1250.18
1196.39
1149.32
1093.14
1065.94
1031.95
1010.07
942.58
904.04
893.71
837.88
817.04
791.04
770.45
753.79
724.93
698.70
688.91
644.81
627.24
600.78
586.05
549.58
525.88
463.88
448.51
425.74

Figura 2