

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 771**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2003** **E 11156072 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014** **EP 2319853**

54 Título: **Procedimiento para la producción de nucleósidos ramificados en 2'**

30 Prioridad:

12.12.2002 US 432766 P
28.04.2003 US 466194 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2014

73 Titular/es:

IDENIX PHARMACEUTICALS, INC (100.0%)
320 Bent Street, Floor 4
Cambridge, MA 02141, US

72 Inventor/es:

STORER, RICHARD;
MOUSSA, ADEL;
CHAUDHURI, NARAYAN y
WALIGORA, FRANK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 470 771 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

Procedimiento para la producción de nucleósidos ramificados en 2'

Campo de la invención

Esta invención es un procedimiento para preparar compuestos análogos de azúcares que tienen grupos sustituyentes para proteger el oxígeno y, en particular, la 2,3,5-(hidroxilos independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-β-D-ribofuranosa y la 2,3,5-(hidroxilos independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-D-ribonico-γ-lactona. Esta invención incluye además un procedimiento para preparar nucleósidos y, en particular, la 3',5'-(hidroxilos independiente y opcionalmente protegidos)-2'-C-metil-β-D-citidina, opcionalmente mediante el uso del azúcar preparado con los procedimientos presentados en la presente memoria y, específicamente, la síntesis de profármacos de compuestos farmacéuticos. Más en particular, se describe la síntesis de compuestos que sirven de profármacos para la administración de compuestos antiviricos procedentes de análogos nucleosídicos y nucleotídicos y, en particular, el éster 3'-O-valinílico de la 2'-C-metil-β-D-citidina.

Antecedentes de la invención

Un compuesto intermedio clave para la preparación de análogos de azúcares que se utilizan en la síntesis de los nucleósidos y las vitaminas es la 2-C-metil-D-ribonolactona. Ya en 1880, Scheibler describió un procedimiento para preparar la lactona (John Sowden, «The Saccharinic Acids» en *Adv. Carbohydrate Chem.* 12: 43-46 (1957), que cita a C. Scheibler, *Berichte* 13: 2212 (1880)). Desgraciadamente, el rendimiento de los productos fue de tan sólo aproximadamente el 10% (*ibidem*). Aproximadamente al mismo tiempo, H. Kiliani sintetizó la 2-metil-D-ribonolactona mediante el tratamiento de la D-fructosa con hidróxido de calcio (H. Kiliani, *Berichte*, 15: 2953 (1882), tal y como se cita en F. J. López-Herrera et al., *J. Carbohydrate Chemistry*, 13 (5): 767-775 (1994)). Sin embargo, el procedimiento necesitaba una ejecución que duraba meses hasta su finalización y el rendimiento del producto era sólo del 10% (*ibidem* en 768). Sin embargo, el procedimiento de Kiliani le permitió establecer las posiciones de los grupos funcionales importantes del compuesto (John Sowden, «The Saccharinic Acids» en *Adv. Carbohydrate Chem.* 12: 43-46 (1957), que cita a H. Kiliani, *Ann.* 213: 361 (1883)).

A principios de los años sesenta del siglo XX, Whistler y BeMiller intentaron mejorar la síntesis de Kiliani (Roy L. Whistler y J. N. BeMiller, «α-D-Glucosaccharino-1,4-lactone» en *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2: 484-485 (1963)). Whistler y BeMiller añadieron agua hirviendo e hidróxido de calcio a la D-fructosa, purgaron el sistema con nitrógeno gaseoso y repitieron el mismo procedimiento. Al cabo de 2 semanas; la mezcla se mantuvo durante 6 a 8 semanas, tras lo cual se trató con CO₂ y ácido oxálico dihidrato y se filtró a presión. El residuo se lavó repetidamente hasta darle una consistencia de tipo jarabe, y se combinaron los filtrados; el solvente se evaporó a baja presión y el producto resultante se dejó cristalizar en frío (*ibidem*). El rendimiento del producto final era todavía de sólo aproximadamente el 10% (*ibidem* en 485).

En un intento por mejorar el rendimiento de los productos, López-Aparicio et al. describieron la síntesis de la 2-C-metil-D-ribono-1,4-lactona a partir del 2,3-O-isopropiliden-D-gliceraldehído como alternativa a la síntesis de Kiliani (López-Aparicio et al., *Carbohydrate Res.*, 129: 99 (1984), según se cita en F. J. López-Herrera et al., *J. Carbohydrate Chemistry*, 13(5): 767-775 (1994) en 768-769). El procedimiento de López-Aparicio incluía la condensación del 2,3-O-isopropiliden-D-gliceraldehído con el (1-metoxi-carbonil-etilideno)trifenilfosforano para producir el E-(S)-4,5-dihidroxi-4,5-O-isopropiliden-2-metil-2-pentenoato de metilo; la hidrólisis (en HCl) y la isomerización fotoquímica del pentenoato; la lactonización del pentenoato producido para generar un butenólido; la tritilación del butenólido en C-5 mediante la reacción con cloruro de tritilo y piridina, seguido de *cis*-hidroxilación con permanganato de potasio y cloruro de metileno en presencia de un éter corona. La retirada final del grupo tritil(trifenilmetilo) se consiguió al hacerlo reaccionar con TFA (ácido trifluoroacético) (*ibidem* en 768). López-Aparicio et al. describieron rendimientos de producción de ribonolactonas de aproximadamente el 80%, pero otros no fueron capaces de reproducir esta cifra basándose en las cantidades de masa en gramos de los materiales dadas a conocer en el apartado experimental de su publicación. En lugar de eso, los cálculos indicaron un rendimiento porcentual de aproximadamente el 36% de ribonolactona. Además, el procedimiento de López-Aparicio et al. era mucho más complejo que la síntesis de Kiliani, requería el uso de reactantes tóxicos, tales como el permanganato de potasio, y un equipo especializado para la irradiación con la que conseguir la isomerización fotoquímica, y el tiempo de reacción mínimo que obtuvo era de 60 horas (*ibidem* en 768, 770-772).

Walton et al. describieron la síntesis de la 2'-C-metiladenosina a partir de la 2-C-metil-D-ribonolactona (Walton et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (19: 4524-5 (1966)). En este caso, la lactona se convirtió en su derivado 2,3,5-tri-O-benzoílico y, a continuación, se redujo con bis(3-metil-2-butil)borano para dar a conocer una mezcla anomérica de 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribofuranosa (*ibidem*). Los intentos de separar la mezcla anomérica tanto en alúmina lavada con ácido y en gel de sílice dio lugar, al reorganizarse, al 1,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-α-D-ribofuranosa (*ibidem*). Para evitar la reorganización, se necesitaron etapas adicionales de tratamiento de la mezcla anomérica con cloruro de benzoilo en piridina para obtener la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-(α)/(β)-D-ribofuranosa, y de aislamiento del producto final por cromatografía (*ibidem*). Más tarde, Walton et al. describieron la síntesis de la 2'-C-metil-5-fluorocitidina, la 2'-C-metil-5-fluorouridina y la 2'- y 3'-C-metilcitidina, mediante la reacción de Hilbert-Johnson (Walton et al., *Antiviral Nucleosides* 12: 306-309 (1969)). Sin embargo, se formaron inesperadamente grandes

cantidades de O-glucósido cuando se sintetizó la 2'-C-metilcitidina a partir de N-acetilcitosina-mercurio, y el propio mercurio es un reactante tóxico que conviene evitar (*ibidem*). En ambos procedimientos sintéticos descritos por Walton et al., el rendimiento final del producto fue tan sólo de aproximadamente el 11%.

En 1997, Harry-O'Kuru et al. describieron una vía sintética para preparar ribonucleósidos 2'-C-ramificados (Harry-O'Kuru et al., *J. Org. Chem.*, 62: 1754-9 (1997)). Se utilizó la 1,3,5-tri-O-benzoil- α -D-ribofuranosa disponible comercialmente como material de partida, que se preparó a partir de la D-ribosa o de la D-arabinosa (D-arabinopiranososa). A la 1,3,5-tri-O-benzoil- α -D-ribofuranosa se le oxidó el 2-OH libre con el reactante peryodinano de Dess-Martin y produjo la 1,3,5-tri-O-benzoil-2-ceto-ribofuranosa, así como su hidrato correspondiente. El producto deseado y el hidrato se agitaron con un exceso de MgSO_4 y se dejaron reposar durante una noche. A continuación, la mezcla se filtró y se concentró para producir un producto cetónico esencialmente puro. El 2-cetoazúcar resultante se trató con MeMgBr/TiCl_4 (o alternativamente con MeTiCl_3 , $\text{CH}_2=\text{CHMgBr/CeCl}_3$, o TMSC=CLi/CeCl_3), lo que produjo una mezcla anómérica del alquil-, alquenil- o alquinil-ribofuranósido 1,3,5-tri-O-benzoil-2-sustituidos y sus isómeros transesterificados alquil-, alquenil- o alquinil-ribofuranósido α - y β -2,3,5-tri-O-benzoil-2-sustituidos, a una proporción de casi 5:3 entre el producto deseado y las formas isoméricas (*ibidem* en 1755). A continuación, los ribofuranósidos 2-alkilados se convirtieron a un sólo producto deseado, el 1,2,3,5-tetrabenzoil-2-alkil-ribofuranósido, mediante el tratamiento con cloruro de benzoilo, DMAP y trietilamina a aproximadamente un rendimiento del 70% con una proporción β/α de 4:1 (*ibidem*).

Beigelman et al. describieron las síntesis de los 2'-C-metil-nucleósidos a partir de D-glucosa y de D-ribosa (Beigelman et al., *Carbohydrate Research*, 166: 219-232 (1987)). Con el uso de D-glucosa como material de partida, se preparó la 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-3-C-metil- α -D-alofuranosa y se convirtió por la incorporación selectiva de un grupo *p*-metilbenzoilo a través de un derivado del 5,6-O-dibutylestannilideno (*ibidem*). A esto le siguió el tratamiento con ácido trifluoroacético acuoso al 90% y la oxidación con peryodato, la eliminación del grupo formilo en el compuesto, y la acetilación (*ibidem*). El rendimiento del producto final fue de aproximadamente el 77% (*ibidem*). Con la D-ribosa como material de partida, un derivado 2,3-dimetil-isopropilideno con una posición 5 protegida se sometió a la condensación aldólica con formaldehído, luego se trató con un exceso de cloruro de tolueno-*p*-sulfonilo en piridina (*ibidem*). Los compuestos se utilizaron posteriormente para formar una serie de productos distintos con las condiciones conocidas en la técnica, entre ellas, por ejemplo, la metilación de Kuhn, la reducción con LiAlH_4 en THF, la hidrólisis catalizada por ácido y la acetilación por hervido en exceso de Ac_2O en piridina (*ibidem*). El rendimiento medio del producto fue de aproximadamente el 75 al 80%, pero se necesitaron materiales y reactantes costosos (*ibidem*).

Novak y Sorm detallaron la preparación de la 2-C-metil-D-ribosa cristalina y los compuestos derivados de la 2-C-metil-D-ribonolactona mediante la reducción con borohidruro de sodio (J. J. K. Novak y F. Sorm, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 34: 857-866 (1969)). Caracterizaron la naturaleza del grupo hidroxilo en la posición 2 del 2-C-metil-ribofuranósido, en particular en comparación con el grupo hidroxilo situado de forma similar en la correspondiente lactona (*ibidem*). Mientras que el grupo hidroxilo en la lactona se acetiló con facilidad en las condiciones conocidas por los expertos en la técnica para generar las 2,3,5-tri-O-acetil- y 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribonolactona, las condiciones análogas produjeron sólo 3,5-di-O-acetil- y 3,5-di-O-benzoil-2-C-metil-D-ribofuranósidos a partir de los 2-C-metil-ribofuranósidos (*ibidem*).

Más tarde, Novak describió propiedades quiroópticas de las 2-C-metil-1,4-lactonas, que se habían preparado a partir de D-lixosa y D-xilosa mediante la oxidación con hipoyodito, y que tenía grupos *p*-toluilo protectores en C3 y C5 de la lactona (J. J. K. Novak, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 39: 869-882 (1974)). En particular, se sintetizó una 2- CH_3 -ribono-1,4-lactona mediante hidrólisis de la 3,5-*p*-toluilo-2-Br, 2- CH_3 -ribono-1,4-lactona (*ibidem*). Sin embargo, Novak describió que era difícil separar los productos de lactona protegidos de los otros, y que se obtenían productos de tipo jarabe cuando se intentaba desbloquear las lactonas mediante la alcoholisis alcalina (*ibidem* en 871).

Tanto Tokyo Tanabe Co., Ltd. (patente japonesa JP 61-212592) como BASF Aktiengesellschaft (patente europea EP 0 288 847) describieron los procedimientos de epimerización para preparar D-ribosa sin proteger a partir de D-arabinosa, un material de partida corriente para la producción de ribosa.

Tokyo Tanabe Co., Ltd., enseña la epimerización de la D-arabinosa acuosa en un solvente orgánico en presencia de una composición preferiblemente de ácido molibdico (VI) y ácido bórico, recogida y paso del líquido de reacción a través de un material de intercambio de cationes de tipo metal bi- o trivalente (se prefirió una resina de intercambio iónico fuertemente ácida de tipo ácido poliestirenosulfónico convertida en un tipo de Ca), elución con agua para separar la ribosa sin proteger y recogida del compuesto de ribosa (patente japonesa JP 61-212592, Resumen).

BASF enseña un procedimiento continuo en el que una solución acuosa/alcohólica de D-arabinosa se calentó en un solvente en presencia de un intercambiador de aniones básicos cargados con un compuesto de molibdeno (VI). El eluido se recogió y se secó, se le añadió metanol o etanol al eluido seco y la mezcla se enfrió a aproximadamente 0 °C para cristalizar la D-arabinosa sin convertir para luego separarla y reciclarla. El filtrado restante se concentra y se purifica de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica sobre un intercambiador de iones fuertemente ácido en la forma de Ca^{2+} , y toda arabinosa/ribosa libre de subproductos se recicló en arabinosa en la etapa de cristalización (patente europea EP 0288847).

Los procedimientos de Tokyo Tanabe Co., Ltd., y BASF requieren equipos y reactantes sofisticados y caros, y al compuesto producido todavía hay que añadirle los grupos protectores.

Japan Tobacco, Inc., preparó 3-DPA-lactona mediante la protección del grupo 5-OH de una γ -ribonolactona, mediante el uso de un cloruro ácido o un anhídrido ácido con una amina terciaria para provocar la β -eliminación del 3-OH y la formación de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, mientras que simultáneamente se acila el grupo 2-OH, y finalmente, de forma catalítica, se hidrogena el doble enlace entre C-2 y C-3 y se retira el grupo protector para regenerar el 5-OH. Véase las patentes europeas EP O 526 655 A1, EP O 553 358 A1 y EP O 553 358 B1, así como sus equivalentes de EE.UU. U.S 5.322.955 y U.S. 5.391.769.

Otro trabajo relacionado con la síntesis de las ribonolactonas y de los análogos de azúcares con sustituyentes protegidos incluyen lo que viene a continuación.

En Li et al., *Organic Letters*, 3(7): 1025-28 (2001), se sintetizó un 2'-C- β -trifluorometil ribonucleósido de pirimidina a partir de la 1,3,5-tri-O-benzoil- α -D-ribofuranosa, y entonces se convirtió en el bromuro de 3,5-di-O-benzoil-2-C- β -trifluorometil- α -D-1-ribofuranosilo. El último compuesto, el bromuro derivado, se encontró que era un intermedio de la reacción que era eficaz para la formación de nucleósidos.

En Beigelman et al., *Bioorg. Khim*, 12 (10): 1359-65 (1986), se sintetizaron compuestos derivados de la 2-C-metil-D-ribosa a través de la bencilación de la 1,2:5,6-di-O-isopropiliden-3-C-metil- α -D-alofuranosa para formar un primer intermedio; se hidrolizó y aciló selectivamente el primer intermedio para formar la 3-O-bencil-1,2-O-isopropiliden-3-C-metil-6-O-toluoil- α -D-alofuranosa; y de forma secuencial se desisopropilidenó, se oxidó (con ácido peryódico), se desformiló, se acetiló, se debenciló y se acetiló de nuevo para generar el producto final, la 1,2,3-tri-O-acetil-2-C-metil-5-O-toluoil- β -D-ribofuranosa.

En Feast et al., *Acta Chemica Scandinavica* 19: 1127-34 (1965), se describe la preparación del ácido α -D-glucosacárico, que se demostró que era el ácido 2-C-metil-D-ribo-pentónico, mediante el tratamiento alcalino de la D-fructosa o de la D-fructosa 1-O-sustituída a través de un intermedio 1,4-lactónico.

En Kohn et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87 (23): 5475-80 (1965), se describió una vía corta para obtener un derivado de furanosa a partir de una aldosa mediante la reducción de una tetraaciclohexono- γ -lactona en su correspondiente tetraacilhexofuranosa con el uso del disiamilborano como reductor. La reacción es particularmente importante para la formación de intermedios de la síntesis de nucleósidos C-1'-furanosílicos.

En Kempe et al., *Nucleic Acids Res.*, 10 (21): 6695-6714 (1982), se describió la 2'-benzoilación selectiva en los *cis* 2',3'-dioles de los ribonucleósidos protegidos y la isomerización de los 2'-benzoatos en 3'-benzoatos. Estos nucleósidos protegidos se utilizaron para sintetizar oligorribonucleótidos sobre un soporte sólido de gel de sílice, y la posterior desprotección proporcionó la ventaja de una casi inexistente escisión nucleotídica interna.

En la patente de los EE.UU. U.S 4.294.766 de Schmidt et al. se detallaba la síntesis de ribonolactona pura a partir de una mezcla de ribonolactona y arabonolactona. La ribonolactona es un intermedio de la formación de la riboflavina (vitamina B₂). Se «lactonizó» una mezcla de arabonato de potasio y ribonato de potasio, y la mezcla lactónica resultante, de la cual era ribonolactona aproximadamente el 70%, se separó por cristalización fraccionada con dioxano o éter monometílico de etilenglicol. La lactonización se realizó mediante los métodos conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, con el uso de intercambiadores iónicos, o por la concentración de la lactona en presencia de H₂SO₄ o K₂SO₄ y separación del precipitado por filtración.

Conjugación de nucleósidos

Walton describió la síntesis de nucleósidos de cadena ramificada mediante una preparación en la que se hacían reaccionar haluros de 2,3,5-tri-O-acil-2-(o 3)-C-alquilo-ribofuranosilo con compuestos de purina o pirimidina cloromercúricos (patente de los EE.UU. US 3.480.613). Se prepararon intermedios de haluro de 3-alquilo inferior-D-ribofuranosilo comenzando desde la 1,2-O-isopropiliden-5-O-acil- α -D-eritropentofuran-3-ulosa al hacer reaccionar este compuesto con un reactivo de Grignard para añadir un grupo alquilo inferior en C3. A continuación se siguió una de las dos vías: en la primera vía, la 5-O-acil-1,2-O-isopropiliden-3-alquilo inferior-D-ribofuranosa se sometió a la alcoholisis ácida para formar un 5-O-acil-3-alquilo inferior-D-ribofuranósido; después, el último compuesto se aciló a 2,3,5-tri-O-acil-3-alquilo inferior-D-ribofuranósido; y el ribofuranósido resultante se pudo convertir entonces en un azúcar libre al someterlo a una solvólisis básica y a una posterior hidrólisis en ácido fuerte en medio acuoso, o se convirtió en una halogenosa mediante una reacción de reemplazo con halógeno en el solvente apropiado. En la segunda vía, la 5-O-acil-1,2-O-isopropiliden-3-alquilo inferior-D-ribofuranosa se aciló en condiciones básicas (piridina) en un solvente inerte para formar la 3,5-di-O-acil-1,2-O-isopropiliden-3-alquilo inferior-D-ribofuranosa, que luego se hidrolizó en ácido fuerte y se aciló adicionalmente para dar a conocer los intermedios deseados. Los nucleósidos de purina 2-sustituídos, 6-sustituídos o 2,6-disustituídos que tienen una cadena ramificada en la posición 2' o en la posición 3' del resto glucídico se prepararon después al hacer reaccionar el haluro de 2,3,5-tri-O-acil-D-ribofuranosilo con una purina 2,6-disustituída cloromercúrica a la temperatura de 100 °C a 140 °C en un solvente tal como tolueno o xileno. Los nucleósidos que tienen una base de pirimidina deseada se obtuvieron a partir del haluro de 2,3,5-tri-O-acil-2 (o 3)-C-alquilo inferior-D-ribofuranosilo al hacerlo reaccionar con una 2,4-dialcoxi-pirimidina para formar la 1-(2,3,5-tri-O-acil-2 (o 3)-C-alquilo inferior-D-ribofuranosilo)-4-alcóxi-2(1H)-pirimidina, que a

continuación se hizo reaccionar con amoníaco, o con una amina primaria o secundaria, para generar compuestos que tienen un sustituyente amino en el C-4 de la pirimidinona, o se hidrolizaron en condiciones básicas o ácidas para producir una base de pirimidinona que tiene un grupo hidroxilo en el C-4. Desgraciadamente, las síntesis de Walton conllevan muchas etapas, condiciones especiales y numerosos reactantes tóxicos.

- 5 Tal y como se muestra en la figura 5, la técnica anterior enseña la conjugación de la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa (4) con la N⁴-benzoil-citosina mediante el uso de BSA en acetonitrilo. La mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante aproximadamente 30 minutos, tras lo cual se añadió el ácido de Lewis, SnCl₄, y la solución se calentó de nuevo a reflujo durante aproximadamente 3,5 horas, para generar la 4-NH-benzoil-2',3',5'-tri-O-benzoil-β-D-2'-C-metil-citidina (5a). Se obtuvo el compuesto (5a) mediante la dilución con acetato de etilo y
- 10 bicarbonato de sodio saturado y acuoso, y la purificación cromatográfica exhaustiva. La retirada de los grupos benzoilo protectores se consiguió mediante el tratamiento de (5a) durante una noche con una solución de metanol saturada previamente con amoníaco para dar a conocer la β-D-2'-C-metil-citidina (6).

Profármacos

- 15 Los compuestos farmacéuticamente activos a veces se administran en forma de profármaco esterificado. Se utilizan con más frecuencia los ésteres de ácido carboxílico, mientras que los ésteres de fosfonato y de fosfato se utilizan con menos frecuencia porque no se consigue hidrolizarlos *in vivo* y pueden generar subproductos tóxicos (véase la patente de los EE.UU. n.º US 6.312.662 de Erion et al.). A veces se utilizan como profármacos los ésteres aciloxialquílicos para los compuestos de fosfato y de fosfonato, ya que son ésteres de fosfonato y ésteres arílicos
- 20 los EE.UU. n.º US 6.312.662 de Erion et al.). Al igual que los nucleósidos, los ácidos fosfónicos tales como, por ejemplo, el ácido fosfonofórmico y el PMEAs (Adefovir; 9-(2-fosfonilmetoxi-etil)adenina) muestran actividad antiviral al igual que los profármacos de los nucleósidos por esterificación con lípidos o de ácido carboxílico (patente de los EE.UU. n.º 6.458.773 de Gosselin et al.).

- 25 Históricamente, las síntesis y formulaciones de los profármacos han actuado típicamente sobre la posición 5' de un nucleósido o análogo nucleosídico. Gosselin et al., *ibidem*, describieron nucleósidos en los que la H del grupo 5'-OH está reemplazada por cualquiera de los siguientes: un grupo acilo que incluye aquéllos en los que el resto no carbonilo del grupo éster se selecciona de alquilo(C₁-C₂₀) de cadena lineal, ramificado o cíclico, fenilo o bencilo; un aminoácido que se encuentra de forma natural o no natural; un 5'-éter lipídico o un 5'-fosfoéter lipídico; alcoxialquilo que incluye metoximetilo; aralquilo que incluye bencilo; ariloxialquilo tal como, por ejemplo, fenoximetilo; arilo que
- 30 incluye fenilo, opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo(C₁-C₄) o alcoxi(C₁-C₄); un ácido dicarboxílico tal como, por ejemplo, ácido succínico; un éster de sulfonato tal como, por ejemplo, sulfonilo de alquilo o aralquilo que incluye metanosulfonilo; o mono-, di- o trifosfoéster.

- 35 Matulic-Adamic et al. (patente de los EE.UU. n.º 6.248.878) describieron la síntesis de análogos nucleosídicos que comprenden un anillo de ribofuranosa con un grupo que contiene fósforo unido a la posición 3' mediante un átomo de oxígeno y una base de pirimidina sustituida. El grupo que contiene fósforo incluye ditioatos o fosforamiditas, o puede ser parte de un oligonucleótido. Estos compuestos son profármacos porque reaccionan adicionalmente para dar a conocer los nucleósidos y análogos nucleosídicos finales deseados. Los compuestos se sintetizan en un procedimiento con varias etapas en el que se conjugan, como materiales de partida, una ribofuranosa que tiene un grupo hidroxilo o acetoxi en C-1 y grupos benzoilo protectores en C-2, C-3 y C-5, y una 4-OSiMe₃ pirimidina para
- 40 producir una 1-(2,3,5-tri-O-benzoil-ribofuranosil)-pirimidin-4-ona; luego se añade amoníaco en metanol al producto de la primera reacción para retirar los grupos benzoilo protectores; a continuación se hace reaccionar DMT-Cl/Pyr con el compuesto del producto sin proteger, que da lugar a la adición de DMT en la posición 5'-O de la ribofuranosa; a continuación se hace reaccionar TBDMS-Cl, AgNO₃ y Pyr/THF con la ribofuranosa sustituida con 5'-O-DMT; y finalmente se realiza la fosfitilación estándar para producir el grupo que contiene fósforo localizado en la 3'-O. Cada
- 45 una de las síntesis presentadas incluye al menos de 4 a 7 etapas.

- 50 Chu et al. describieron profármacos que son compuestos y composiciones modificados con azida, entre ellos análogos nucleosídicos fosforilados y nucleósidos (patente de los EE.UU. US 6.271.212). Tales profármacos de azida tienen como ventajas su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, proporcionar una mayor semivida y ofrecer una mayor biodisponibilidad y una mejor estabilidad de la forma activa del fármaco sobre la observada con anterioridad. Sin embargo, Chu et al. describieron una larga síntesis en varias etapas para preparar sus profármacos de azida.

- 55 Borretzen et al. describieron profármacos antivirales que eran nucleósidos y análogos nucleosídicos. Describieron algunos ésteres de ácidos grasos con nucleósidos y análogos nucleosídicos antivirales, en donde el ácido graso de un ácido graso monoinsaturado de 18 o 20 carbonos se fijaba a la posición 5' del nucleósido o del análogo nucleosídico a través de un procedimiento de acilación (patente de los EE.UU. US 6.153.594). El procedimiento se llevó a cabo en presencia de un catalizador y se dejó que continuara durante 24 a 60 horas. El aislamiento del producto se llevó a cabo mediante la extracción con un solvente orgánico, y la purificación mediante cromatografía y/o retrocristalización desde un solvente adecuado. El rendimiento porcentual del producto varió ampliamente del 15 al 82%. Borretzen et al., sin embargo, no utilizaron la terminología «profármaco».

En 1999, McCornick et al. describieron la formación del carbonato en el 3'-OH de la guanosina mediante el uso de una ribosa sin proteger a modo de material de partida (McCornick et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121 (24): 5661-5). McCornick fue capaz de sintetizar el compuesto mediante la introducción secuencial y escalonada de los enlaces O- y N-glucosídicos, la aplicación de determinados grupos protectores, la sulfonación y la desprotección final. En una de las etapas de su procedimiento, McCornick et al. hicieron reaccionar la guanosina sin proteger con BOC-anhídrido, DMAP, Et₃N y DMSO a la temperatura ambiental durante 4 horas para obtener directamente un carbonato en el 3'-OH de la guanosina.

De igual forma, en 1999, Tang et al. describieron un procedimiento para preparar profármacos fosforamidíticos de 2'-C-β-metil-ribonucleósidos de citidina (Tang et al., *J. Org. Chem.* 1999, 64: 747-754). Al igual que muchos de sus colegas, Tang et al. hicieron reaccionar la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa con la 4-N-benzoilcitosina persililada en presencia del ácido de Lewis SnCl₄ a modo de primera etapa de síntesis (*ibidem* en 748, esquema 1.º).

En el año 2000, en Novirio Pharmaceuticals (ahora Idenix) se descubrió que la estabilidad y biodisponibilidad de los análogos nucleosídicos antivíricos mejoraba mediante la administración de formas esterificadas con aminoácidos de los nucleósidos antivíricos (n.º de serie de los EE.UU. 09/864.078, pendiente; n.º de serie de los EE.UU. 10/261.327, pendiente; patente internacional n.º WO 01/90121; y las solicitudes provisionales de los EE.UU. n.º 60/377.983 y 60/392.351). Los procedimientos utilizados para preparar estos ésteres de aminoácidos de nucleósidos y de análogos nucleosídicos comenzaron con los β-D- o β-L-nucleósidos de ramificación adecuada que opcionalmente podían estar protegidos por un grupo protector adecuado tal como, por ejemplo, un grupo sililo, y posteriormente ser desprotegidos mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica (Zhang et al., *Tetrahedron Letters*, 1992, 33: 1177-80; Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 2.ª edición (1991); Kerr et al., *J. Pharmaceutical Sciences*, 1994, 83: 582-6; Tang et al., *J. Org. Chem.*, 1999, 64(3): 747-754; y Cavelier et al., *Tetrahedron Letters*, 1996, 37: 5131-4). A continuación, el nucleósido ramificado opcionalmente protegido se conjugó con un donante de acilo adecuado, tal como un cloruro de acilo y/o un anhídrido de acilo o un ácido activado, en un solvente aprótico o prótico adecuado y a una temperatura de reacción adecuada, para generar el profármaco en 2' o 3' de un β-D- o β-L-nucleósido ramificado en 1', 2', 3' o 4', opcionalmente en presencia de un agente de conjugación adecuado (véase *Synthetic Communications*, 1978, 8(5): 327-33; *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121 (24): 5661-5; Bryant et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45, 229-235; Standing et al., *Antiviral Chem & Chemother.*, 2001, 12 (supl. 1), 119-129; Benzaria et al., *Antiviral Res.* 2001, 50, A79; Pierra et al., *Antiviral Res.*, 2001, 50, A79; y Cretton-Scott et al., *Antiviral Res.*, 2001, 50, A44). Los posibles reactantes de conjugación son todo reactante que permita que los compuestos o restos se unan entre sí incluyen, pero sin limitarse a ellos, varias carbodiimidas, CDI, BOP y carbonildiimidazol. Por ejemplo, para un profármaco en 3' de un nucleósido ramificado en 2', es preferible que el nucleósido no esté protegido, pero que se conjugue directamente a un resto de aminoácido o alcanólico mediante un reactante de conjugación carbodiimídico.

El procedimiento de la técnica anterior mostrado en la figura 5 incluía la siguiente secuencia de reacción para preparar un profármaco de nucleósido de citidina por esterificación en 3' con valinilo: se añadió la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa (4) a una mezcla de BSA y N⁴-benzoil-citosina en acetonitrilo y se calentó a reflujo durante aproximadamente 30 minutos, tras lo cual se añadió el ácido de Lewis, SnCl₄, y la solución se calentó de nuevo a reflujo durante aproximadamente 3,5 horas, para generar la 4-NH-benzoil-2',3',5'-tri-O-benzoil-β-D-2'-C-metil-citidina (5a). El compuesto (5a) se obtuvo mediante la dilución con acetato de etilo y bicarbonato de sodio saturado y acuoso, y la purificación cromatográfica exhaustiva. La retirada de los grupos benzoilo protectores se llevó a cabo mediante un tratamiento durante una noche de (5a) con una solución de metanol saturada previamente con amoníaco para generar la β-D-2'-C-metil-citidina (6). El compuesto (6) en DMF se hizo reaccionar con dimetilacetato de N,N-dimetilformamida a la temperatura ambiente durante aproximadamente 1,5 horas para generar citidina con un grupo amino protegido en C4, la N⁴-[(dimetilamino)metilen]-β-D-2'-C-metil-citidina (7); una solución de citidina con los aminos protegidos (7) en pirimidina seca se hizo reaccionar luego con imidazol y TBDPSCI a la temperatura ambiente durante aproximadamente 6 horas para generar citidina cuyo 5'-O estaba protegido con sililo (8); se añadió N-Boc-L-valina en presencia de DEC, DMAP y THF/DMF a la β-D-2'-C-metil-citidina protegida en 4 y en 5' (8) a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 días para producir un éster 3'-O-L-N-BOC-valinílico protegido en 4 y 5' de la β-D-2'-C-metil-citidina (9); el éster 3'-O-L-N-BOC-valinílico protegido en 4 y 5' de la β-D-2'-C-metil-citidina (9) se recogió en metanol seco al cual se había añadido fluoruro de amonio y la mezcla se llevó a reflujo para retirar los grupos protectores 5'-sililo y 4-amino, lo que produce el éster 3'-O-L-N-(tert-butoxicarbonil)valinílico de la β-D-2'-C-metil-citidina (10), que se purificó mediante cromatografía en columna; y, finalmente, a una solución del éster 3'-O-L-N-(tert-butoxicarbonil)valinílico de la β-D-2'-C-metil-citidina (10) en acetato de etilo seco se le añadió una solución al 20% de HCl/acetato de etilo y la mezcla se agitó durante aproximadamente 2 horas para retirar el grupo BOC protector, lo que genera la sal hidrocloreuro del éster 3'-O-valinílico de la β-D-2'-C-metil-citidina como producto final (11). La síntesis de la técnica anterior mostrada en la figura 6 utilizó el uracilo en vez de benzoil-citosina para preparar el compuesto (11), la β-D-2'-C-metil-citidina.

A la vista de lo anterior, sería ventajoso contar con un procedimiento eficaz para preparar un nucleósido o un análogo nucleosídico, tal como un 2'-metil-nucleósido o un 2'-metil-3'-O-valinil-nucleósido o, sus intermedios, que incluyen la 2-C-metil-ribonolactona y la 2-C-metil-D-ribofuranosa, y sus sales y/o los profármacos de los mismos.

Otro objeto de la presente invención es dar a conocer un procedimiento para la adición selectiva de un grupo en el

3'-OH de un nucleósido que daría el profármaco procedente de un compuesto.

Aún otro objeto de la presente invención es tener un procedimiento eficaz para preparar compuestos protegidos de análogos de azúcares que requieran el menor número posible de etapas, y que utilice un material de partida barato.

Otro objeto de la presente invención es disminuir significativamente el tiempo que se necesita para preparar los
5 intermedios protegidos de los azúcares en comparación con los otros procedimientos para sintetizar productos parecidos.

Además, otro objeto de la invención es tener un procedimiento que se lleve a cabo a término en cuestión de horas y que genere un producto final con un rendimiento y pureza elevados.

Otro objeto de la invención es tener un procedimiento que emplea reactantes que no sean tóxicos y sean fáciles de
10 usar, cuyo producto final se aisle con facilidad mediante las técnicas corrientes que se conocen en la técnica y que sean fácilmente escalables.

Aún otro objeto de la presente invención es obtener el compuesto final producido con un rendimiento y una pureza elevados que superen al menos el 90 o el 95%.

Otro objeto más de la presente invención es emplear reactantes de manipulación fácil y que no sean tóxicos.

15 Compendio de la invención

La presente invención describe un procedimiento nuevo y mejorado para preparar nucleósidos y análogos nucleosídicos, tales como β -D- y β -L-2'-C-metil-nucleósidos y nucleósidos 2'-C-metil-3'-O-esterificados, y sus sales
20 y/o los profármacos de los mismos, mediante el uso de una o más cantidades menores de reactantes en menos tiempo con las etapas de purificación más sencillas y con un mayor rendimiento del producto que el encontrado en la técnica anterior. Además, el procedimiento de la presente invención se puede escalar ventajosamente para satisfacer los requisitos de la producción industrial.

Las realizaciones de la presente invención incluyen específicamente procedimientos que incluyen las etapas de (a) hacer reaccionar una D-fructosa con CaO para obtener una 2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona; y/o (b) hacer reaccionar una 2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona opcionalmente protegida con un reductor adecuado, tal como Red-Al,
25 opcionalmente en un solvente, tal como etanol, para obtener una 2-C-metil-D-ribofuranosa opcionalmente protegida; y/o (c) conjugar una 2-C-metil-D-ribofuranosa opcionalmente protegida con una base sin proteger, tal como citosina, en presencia de un agente activador, tal como un sililante (p. ej. BSA), opcionalmente en presencia de un ácido de Lewis, tal como SnCl_4 , para obtener un 2'-C-metil-nucleósido opcionalmente protegido, por ejemplo, una 2'-C-metil-citidina; y/o (d) generar un éster en 3' de un 2'-C-metil-nucleósido, tal como 2'-C-metil-citidina, mediante el uso de
30 reactivos, condiciones de reacción (solventes, tiempos de reacción, etc.) y técnicas de extracción/purificación optimizados. En una realización particular de la invención, los procedimientos se ejemplifican en las figuras 1 y 4.

También se dan a conocer procedimientos sintéticos escalables y eficaces para preparar un profármaco de nucleósido con alto rendimiento que tiene un resto escindible en la posición 3' del nucleósido. Se dan a conocer
35 adicionalmente procedimientos rentables que emplean reactantes no tóxicos para preparar un nucleósido, análogo nucleosídico, su sal o un profármaco de los mismos. La comparación de la figura 4, un procedimiento de la presente invención, con la figura 5, un procedimiento de la técnica anterior, demuestra que se ahorra más con las etapas de los procedimientos mejorados.

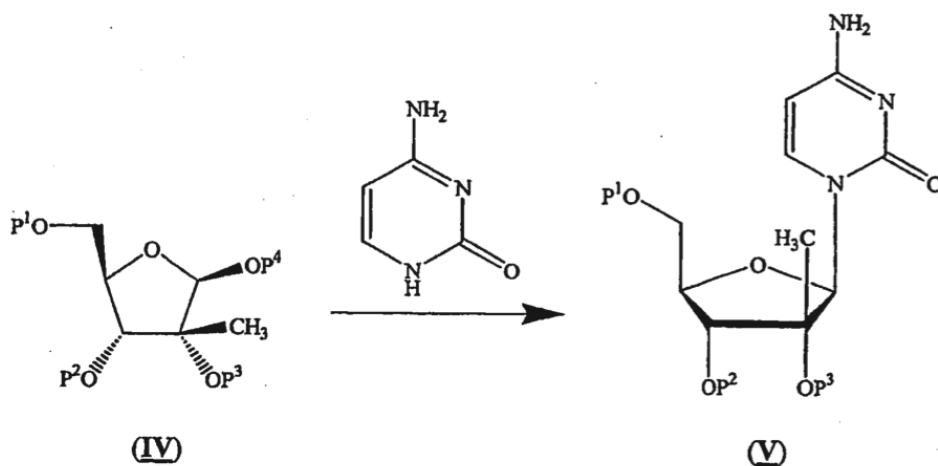
También se dan a conocer procedimientos sintéticos escalables y eficaces para preparar un intermedio glucídico 2-C-metilado, tal como de forma independiente 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona sin proteger (también denominada 2-C-metil-ribonolactona) y de forma independiente 1,2,3,5-
40 (independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribofuranosa sin proteger, mediante el uso de uno o más reactantes baratos en menos tiempo con etapas de purificación más sencillas y con un mayor rendimiento del producto que el hallado en la técnica anterior.

Un nuevo aspecto de la presente invención reside en el uso de combinaciones específicas de reactantes que
45 eliminan la necesidad de la separación, aislamiento y/o purificación en las etapas intermedias en la síntesis. La selección de reactantes específicos que convierten una cantidad predominante del material de partida en producto, que reducen la racemización y que se retiran con facilidad del producto final, proporciona un procedimiento sintético que es más eficaz que el conocido hasta ahora. El resultado global es una disminución del tiempo necesario para la formación del producto del profármaco final, así como un incremento del rendimiento porcentual del producto
50 deseado. Además, al necesitarse menos tiempo y menos reactantes, se obtiene una rentabilidad total mayor y se da a conocer un procedimiento seguro que se puede llevar a escala industrial, si así se desea.

En una realización, el procedimiento de la presente invención se refiere a la preparación de un nucleósido que está disustituido en 2'-C, tal como un 2'-metil-nucleósido o un 2'-metil-3'-O-valinil-nucleósido, sus intermedios, tal como
55 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona sin proteger (también denominada 2-C-metil-ribonolactona) y 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribofuranosa sin

proteger, y sus sales y/o los profármacos de las mismas. En una realización preferida, la presente invención se utiliza para preparar 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) o 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona sin proteger. En otra realización preferida, la presente invención se utiliza para preparar 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) o 2-C-metil-D-ribofuranosa sin proteger. Aún en otra realización preferida, la presente invención se utiliza para preparar β-D-2'-C-metil-citidina (4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona). En otra realización preferida, la presente invención se lleva a cabo para preparar el 3'-O-aminoácido (que incluye, pero sin limitarse a éste, un éster valínico) de la β-D-2'-C-metil-citidina (2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-4-C-metil-2-hidroximetil-tetrahydro-furan-3-ilo) o su forma de sal de hidrocloreto preferida. Los nucleósidos, análogos de nucleósidos, sales o profármacos esterificados preparados por la presente invención se pueden utilizar como intermedios de la preparación de una amplia gama de análogos nucleosídicos diferentes, o se pueden utilizar directamente como antivíricos y/o antineoplásicos.

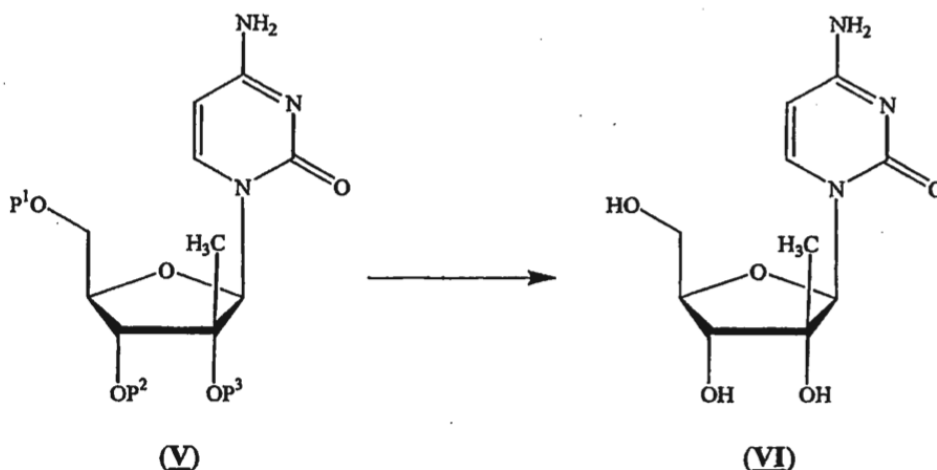
En una realización, el procedimiento mejorado de la presente invención incluye hacer reaccionar la citosina y un activador, tal como BSA, opcionalmente en presencia de un ácido de Lewis, por ejemplo el SnCl₄, con 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) o 2-C-metil-β-D-ribofuranosa sin proteger para formar la 4-amino-1-(3,4-(hidroxilos independiente y opcionalmente protegidos)-5-O-protegido-hidroximetileno-3-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (véase la figura 4).



en donde cada P¹, P², P³ y P⁴ es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un acilo, y preferiblemente un benzoílo;

20 y luego

desproteger opcionalmente el 4-amino-1-(3,4-(hidroxilos independiente y opcionalmente protegidos)-5-(hidroximetileno opcionalmente O-protegido)-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona de la etapa anterior para formar la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (6) si fuera necesario.



25

Por ejemplo, si P¹, P² y P³ del intermedio (V) es benzoílo, entonces el compuesto se puede hacer reaccionar con

NaOMe/MeOH para generar la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona (VI), también conocida como β -D-2'-C-metil-citidina, que opcionalmente se puede retrocristalizar, por ejemplo, desde etanol, para obtener la β -D-2'-C-metil-citidina en forma pura. Este compuesto puede, si se desea, utilizarse tal cual como un antivirico o se puede modificar adicionalmente para dar un profármaco para la administración.

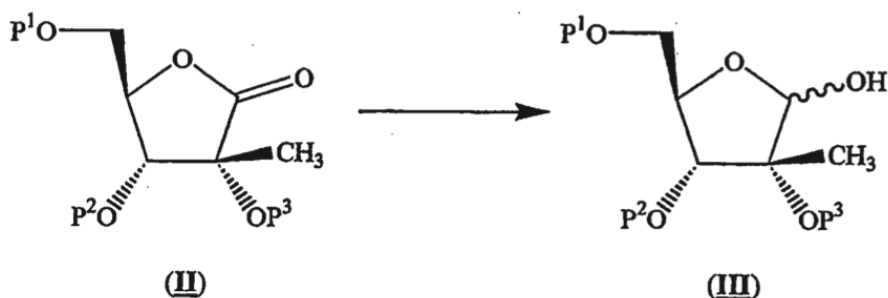
- 5 A continuación, el intermedio (VI) se puede proteger de manera selectiva y optativa, esterificar, por ejemplo, en la posición 3', y opcionalmente desproteger mediante cualquier medio conocido en la técnica para obtener el profármaco por esterificación en 3' de la β -D-2'-C-metil-citidina, tal como el éster 3'-O-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina (2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-4-C-metil-2-hidroximetil-tetrahidro-furan-3-ilo) o su forma de sal de hidrocloreuro preferida.
- 10 Como un ejemplo no limitante de la invención, si se prefiere el éster 3'-valinílico, el procedimiento de esterificación puede incluir las etapas descritas en la figura 4, a saber: hacer reaccionar la β -D-2'-C-metil-citidina con el $\text{Me}_2\text{NCH}(\text{OMe})_2$ en DMF para formar (7), la *N*-[1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetil-formamidina, que es la forma aminoprotegida de (VI); hacer reaccionar (7) con TBDPSCI e imidazol en DCM para generar la forma protegida en 5' con sililo de (7) como *N*'-[1-[5-(*tert*-butil-difenil-silaniloximetil)-3,4-dihidroxi-3-metil-tetrahidro-furan-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetil-formamidina (8);
- 15 hacer reaccionar (8) con *N*-Boc-L-valina, EDC y DMAP en DCM para formar el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 2-(*tert*-butil-difenil-silaniloximetil)-5-[4-(dimetilamino-metilenamino)-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il]-4-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (9); retirar los grupos sililo y aminoprotectores al hacer reaccionar (9) con NH_4F en MeOH con la adición de acetato de etilo (para impedir la escisión del éster 3'-O-valinílico por el amoníaco liberado), y
- 20 someter a reflujo la mezcla para generar el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (10), que se purifica mediante cristalización simple; y, finalmente, hacer reaccionar (10) con HCl en EtOH para generar la sal dihidrocloreuro de 2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (11) como producto final.

- El uso de la citosina en vez de la benzoil-citosina u otra citosina protegida, tal y como se halló en la técnica anterior,
- 25 mejora la economía de los átomos y simplifica los procedimientos de purificación.

- El procedimiento de la presente invención es ventajoso por utilizar hasta aproximadamente el 50% menos de reactivos que un procedimiento similar hallado en la técnica anterior. Incluso con el uso de menos reactivos, una comparación con el procedimiento de la técnica anterior más cercana revela que en un ejemplo se produjo un incremento global del rendimiento del producto del 12% al 38%. Una ventaja más se halla en la disminución de la
- 30 duración del ciclo requerido para completar la síntesis del profármaco. En comparación con la síntesis de la técnica anterior que se muestra, el procedimiento mejorado de la presente invención acorta la duración del ciclo aproximadamente un 80%. Esto se debe principalmente a cuatro factores: 1) un incremento en la carga con la consiguiente disminución del número de lotes necesarios; 2) un incremento del rendimiento porcentual; 3) el uso de solventes y reactivos de manipulación fácil; y 4) la eliminación de las etapas laboriosas de purificación
- 35 cromatográfica.

- Un nuevo aspecto de la presente invención reside en el uso de combinaciones específicas de reactivos que eliminan la necesidad de separación, aislamiento y/o purificación en las etapas intermedias de la síntesis. La selección de reactivos específicos que convierten una cantidad predominante del material de partida en producto, que reducen la racemización y que se pueden retirar con facilidad del producto final proporciona un procedimiento
- 40 sintético que es más eficaz que los conocidos hasta ahora. El resultado global es una disminución del tiempo que tarda en formarse el producto final del profármaco, así como un incremento del rendimiento porcentual del producto deseado. Además, al necesitarse menos tiempo y menos reactivos, se obtiene una rentabilidad global mayor y se da a conocer un procedimiento seguro que se puede llevar a escala industrial, si así se desea.

- En una realización adicional de la presente invención, la 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil- β -D-ribofuranosa se obtiene a partir de la 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-D-ribónico-lactona mediante la reducción con un reductor, tal como con hidruro de sodio y bis(2-metoxietoxi)aluminio (Red-Al), opcionalmente en un solvente, tal como etanol;
- 45

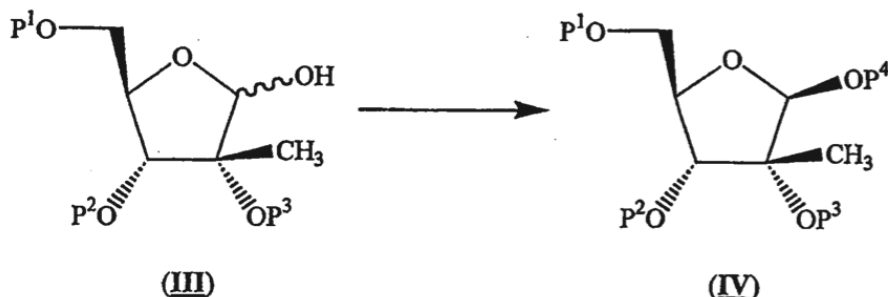


en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es de forma independiente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal

como un acilo, y preferiblemente un benzoílo;

y a continuación

proteger (p. ej., benzoilar) opcionalmente el compuesto modificado de ribofuranosa de la etapa anterior para formar la 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-β-D-ribofuranosa, si es necesario,



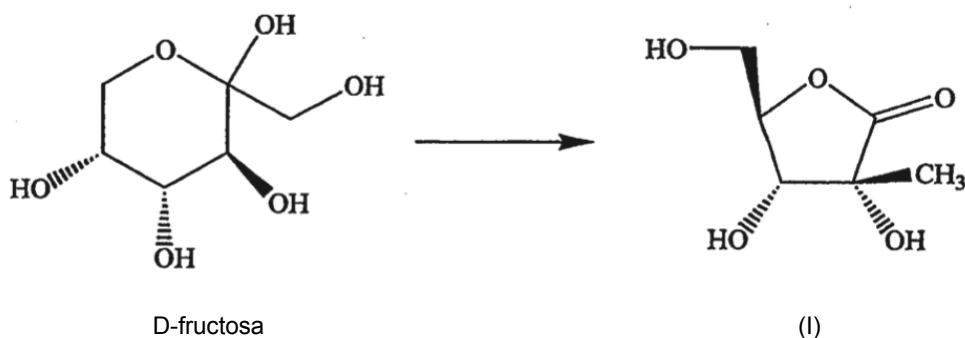
5

en donde P⁴ es de forma independiente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un acilo, y preferiblemente un benzoílo.

La utilización de Red-Al como agente reductor de la presente invención proporciona inesperadamente productos que tienen una estereoquímica específica que permite su separación eficaz. Esto simplifica el aislamiento del producto final deseado.

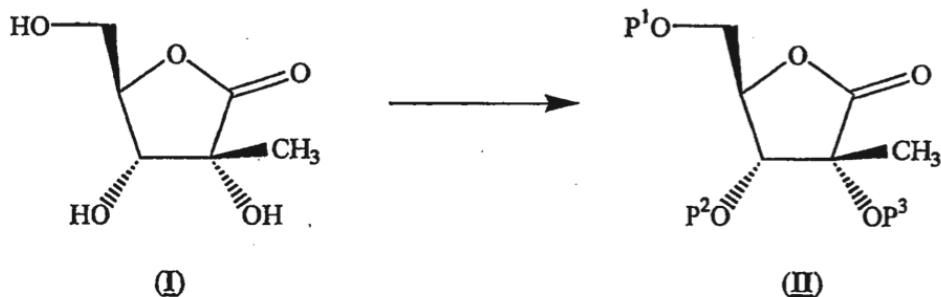
10

En otra realización de la presente invención se obtiene la 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-D-ribónico-lactona al hacer reaccionar la D-fructosa con CaO;



15 y a continuación,

proteger opcionalmente la lactona, por ejemplo, con cloruro de benzoílo (u otro cloruro de acilo adecuado), para formar la 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-D-ribónico-lactona, si fuera necesario;



20 en donde cada P¹, P² y P³ es de forma independiente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un acilo, y preferiblemente un benzoílo.

Además, para aislar un producto anomérico único y puro (a saber, de forma esencialmente pura, que se refiere a al menos el 95%), se puede añadir una o varias etapas de purificación cuando sea necesario.

El procedimiento de la presente invención utiliza la D-fructosa, que es barata, como material de partida, lo que proporciona ahorros de coste significativos para el productor. Esto es especialmente importante cuando se requiere

o contempla el escalamiento para las aplicaciones industriales.

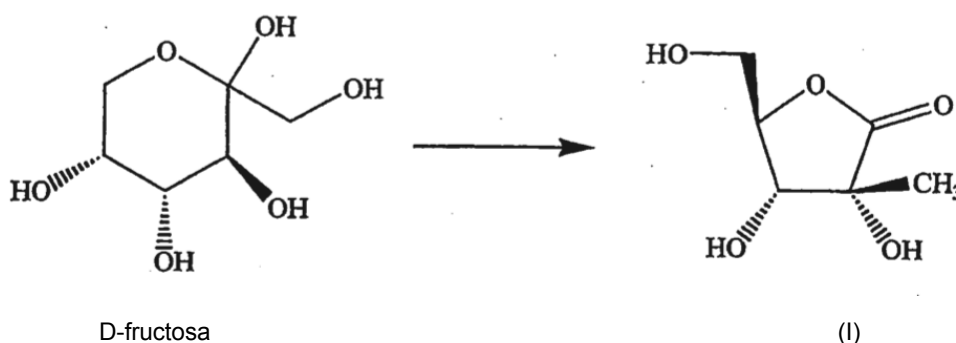
Además de la ventaja económica significativa de utilizar la D-fructosa como material de partida, la presente invención disfruta del nuevo aspecto de utilizar el óxido de calcio (CaO) como reactante en la primera etapa del procedimiento. El CaO se añade a la D-fructosa en agua para preparar la 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona. Esta única etapa se termina en menos tiempo y es la responsable del incremento de rendimiento del 30 al 40% sobre los procedimientos parecidos de la técnica anterior. Además, el CaO no es tóxico, es fácil de utilizar y se mezcla bien con la fructosa y con el agua.

Se utiliza un precipitante para retirar el calcio de la solución. En una realización, a la mezcla de reacción se le añade CO₂ y un ácido que es más fuerte que el ácido ribónico, y en una realización preferida un ácido orgánico, para formar carbonato de calcio. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a ellos: ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido subérico, ácido sebáico, ácido azelaico, ácido maleico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido butírico, ácido pentanoico, ácido hexanoico o ácido heptanoico.

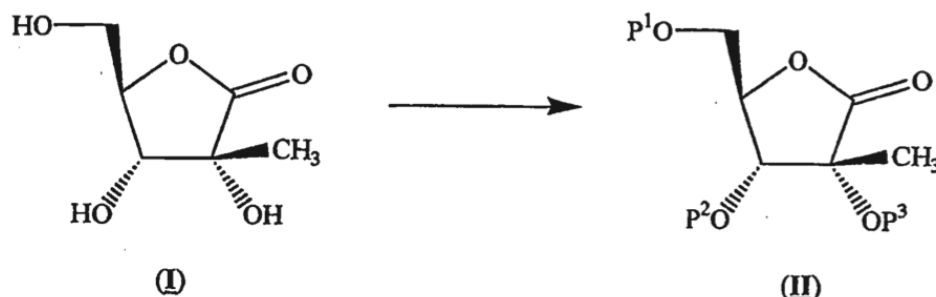
Además, el procedimiento global que se da a conocer mediante la combinación de las figuras 1 y 4 es ventajoso por utilizar hasta el 50% menos de reactantes que un procedimiento similar encontrado en la técnica anterior. Incluso con el uso de menos reactantes, una comparación con el procedimiento de la técnica anterior más cercana revela un incremento global del rendimiento del producto de, por ejemplo, el 12% al 38%. Una ventaja más se halla en la disminución del tiempo necesario para completar el ciclo de la síntesis del profármaco. En comparación con la síntesis de la técnica anterior que se muestra, el procedimiento mejorado de la presente invención acorta el tiempo del ciclo aproximadamente un 80%. Esto se debe principalmente a cuatro factores: 1) un incremento de la carga con una disminución consiguiente del número de lotes necesarios; 2) un incremento del rendimiento porcentual; 3) el uso de solventes y reactantes que se manipulan con facilidad; y 4) la eliminación de las etapas laboriosas de purificación cromatográfica.

Por lo tanto, en una realización de la invención se da a conocer un procedimiento para la preparación de la 2'-C-metil-D-citidina a partir de la D-fructosa, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar la D-fructosa con CaO para obtener una 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona;

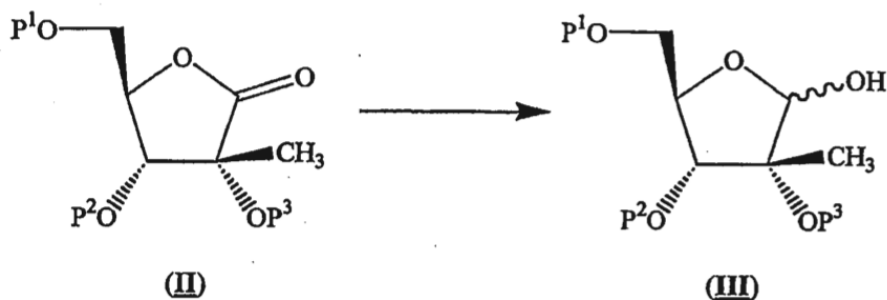


(b) proteger la lactona opcionalmente, por ejemplo, con cloruro de benzoilo (u otro cloruro de acilo adecuado), para formar la 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-D-ribónico-lactona, si fuera necesario;



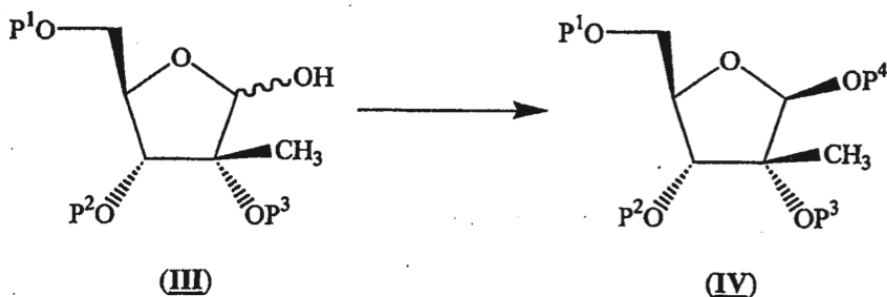
en donde cada P¹, P² y P³ es de manera independiente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un acilo, y preferiblemente un benzoilo;

(c) hacer reaccionar la 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-D-ribónico-lactona con un agente reductor, tal como con hidruro de sodio y bis-(2-metoxietoxi)aluminio (Red-Al), opcionalmente en un solvente, tal como etanol;



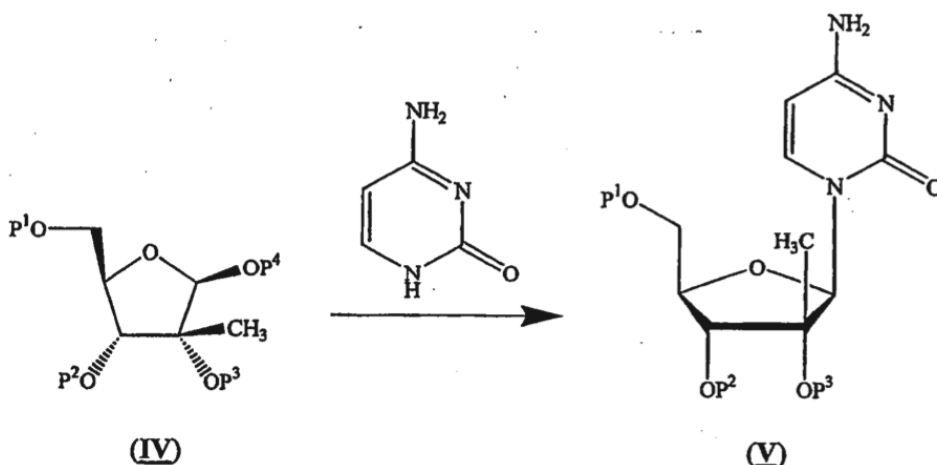
en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es de forma independiente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un acilo, y preferiblemente un benzoilo;

(d) proteger (p. ej., benzoilar) opcionalmente el compuesto modificado de ribofuranosa de la etapa anterior para formar la 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-β-D-ribofuranosa, si fuera necesario,



en donde P^4 es de forma independiente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un acilo, y preferiblemente un benzoilo,

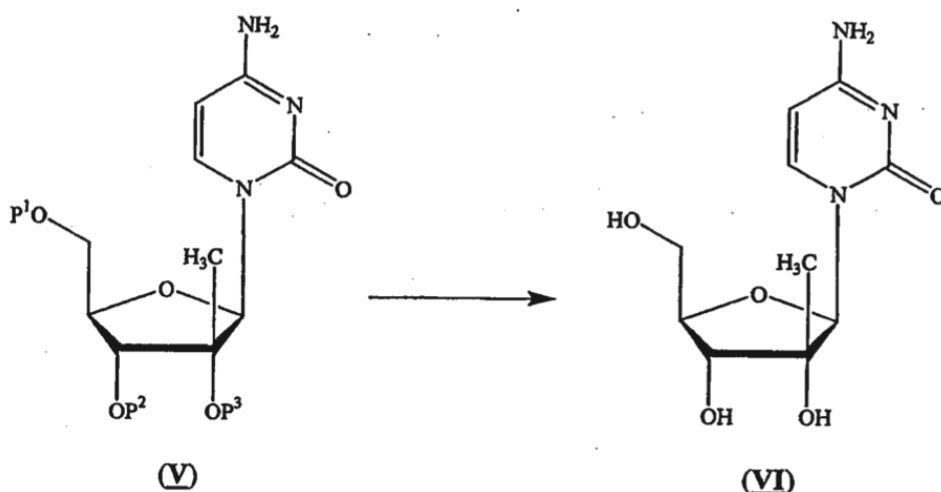
(e) hacer reaccionar la 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil-β-D-ribofuranosa con citosina y un activador, tal como BSA, de forma optativa en presencia de un ácido de Lewis, tal como $SnCl_4$, para formar la 4-amino-1-(3,4-(hidroxilos independiente y opcionalmente protegidos)-5-O-protegido-hidroxi-metilen-3-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona



en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un acilo, y preferiblemente un benzoilo;

y a continuación

(f) desproteger opcionalmente la 4-amino-1-(3,4-(hidroxilos independiente y opcionalmente protegidos)-5-O-protegido-hidroximetilen-3-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona de la etapa anterior para formar la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (VI) si fuera necesario,



- (g) proteger/desproteger opcionalmente y a continuación esterificar las posiciones 3' de la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona (VI), por ejemplo, con L-valina, para obtener el profármaco esterificado en 3' de la β-D-2'-metil-citidina, por ejemplo, el éster 3'-O-valinílico de la β-D-2'-C-metil-citidina (2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-4-C-metil-2-hidroximetil-tetrahidro-furan-3-ilo), opcionalmente en forma de sal, si se desea.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de un procedimiento preferido para preparar la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa y la 2,3,5-tri-O-protegido-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona.

- 10 La figura 2 es un esquema de un procedimiento alternativo para preparar la 2-C-metil-β-D-ribonolactona.

La figura 3 es un esquema de un procedimiento alternativo para preparar la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.

La figura 4 es un esquema de un procedimiento preferido de la presente invención para preparar un nucleósido, análogo nucleosídico, o una sal o profármaco del mismo.

- 15 La figura 5 es un esquema de un procedimiento alternativo para preparar una sal farmacéuticamente aceptable del éster 3'-O-valinílico de la β-D-2'-C-metil-citidina.

La figura 6 ilustra una vía alternativa conocida en la técnica anterior para preparar la β-D-2'-C-metil-citidina.

Descripción detallada de la invención

- Se dan a conocer procedimientos para preparar nucleósidos y análogos nucleosídicos, tales como 2'-C-metil-nucleósidos y 2'-C-metil-3'-O-valinil-nucleósidos, y sus sales y/o los profármacos de los mismos, en todas sus formas estereoquímicas y tautoméricas, mediante el uso de menos reactantes en menos tiempo y con unos rendimientos del producto mayores que los hallados en la técnica anterior. Además, elimina la necesidad de las largas y laboriosas etapas de purificación cromatográfica, y mantiene la racemización indeseada en niveles aceptables. El procedimiento mejorado incluye la formación del nucleósido de interés como un intermedio de la síntesis de los profármacos, y ventajosamente se puede escalar para cumplir los requisitos de la producción industrial.

- También se dan a conocer procedimientos sintéticos escalables y eficaces para preparar un intermedio 2-C-metilico del azúcar, tal como la 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona (también denominada 2-C-metil-ribonolactona) sin proteger y 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribofuranosa sin proteger, mediante la utilización de reactantes baratos, tales como la D-fructosa, en menos tiempo con etapas de purificación más simples y con rendimientos del producto mayores que los hallados en la técnica anterior.

- En una realización, el procedimiento de la presente invención se dirige a la preparación de un nucleósido que está disustituido en la posición 2'-C, tal como un 2'-metil-nucleósido o un 2'-metil-3'-O-valinil-nucleósido, sus intermedios, tal como 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona (también denominado una 2-C-metil-ribonolactona) sin proteger y 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) y 2-C-metil-D-ribofuranosa sin proteger, y sus sales y/o los profármacos de los mismos. En una realización preferida, la invención se utiliza para preparar 2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) o 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona sin proteger. En otra realización preferida, la invención se utiliza para preparar 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos) o 2-C-metil-D-ribofuranosa sin proteger. Aún en otra realización, la presente invención se utiliza para

preparar la β -D-2'-C-metil-citidina (4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-C-metil-tetrahidrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona). En otra realización, la presente invención se lleva a cabo para preparar el éster 3'-O-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina (2-amino-3-metil-butarato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-4-C-metil-2-hidroximetil-tetrahidro-furan-3-ilo) o su forma de sal de hidrocloreto preferida. Pueden utilizarse nucleósidos, análogos de

5 nucleósidos, sales o profármacos por esterificación preparados por la presente invención como intermedios de la preparación de una amplia gama de análogos nucleosídicos diferentes, o se pueden utilizar directamente como antivíricos y/o antineoplásicos.

En una primera realización, el procedimiento de la presente invención utiliza la D-fructosa como material de partida en una síntesis corta para preparar la 1,2,3,5-(independiente y opcionalmente protegidos)-2-C-metil- β -D-ribofuranosa.

En una segunda realización, el procedimiento de la presente invención se refiere a la preparación de un nucleósido, análogo nucleosídico, o una sal o profármaco de los mismos, que está disustituido en la posición 2'-C.

En una tercera realización, la presente invención se utiliza para preparar la β -D-2'-C-metil-citidina (4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-C-metil-tetrahidrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona).

15 En una cuarta realización, la presente invención se lleva a cabo para preparar el éster 3'-O-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina (2-amino-3-metil-butarato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-4-C-metil-2-hidroximetil-tetrahidro-furan-3-ilo) o su forma de sal de hidrocloreto preferida.

Se pueden utilizar los nucleósidos, análogos nucleosídicos, sales o profármacos por esterificación preparados mediante la presente invención como intermedios de la preparación de una amplia gama de análogos nucleosídicos diferentes, o se pueden utilizar directamente como antivíricos y/o antineoplásicos.

El procedimiento de la presente invención es ventajoso por utilizar menos del 50% de las cantidades de reactantes que un procedimiento similar hallado en la técnica anterior más cercana. Incluso así, una comparación con la técnica anterior revela un incremento del rendimiento global del producto del 12% al 38%. Una ventaja más de la presente invención es una disminución aproximada del 80% de la duración del ciclo de síntesis del profármaco. Aún otra

25 ventaja reside en la seguridad y el fácil escalado de este nuevo procedimiento para cumplir los requisitos de la producción a nivel industrial.

Un nuevo aspecto de la presente invención reside en el uso de combinaciones específicas de reactantes que eliminan la necesidad de separación, aislamiento y/o purificación de los intermedios de la síntesis. La selección de determinados reactantes que convierten una cantidad predominante del material de partida en el producto final, que

30 reducen la racemización del resto aminoácido del profármaco y que se separan y retiran con facilidad del producto final, proporciona una mayor eficacia al procedimiento que lo conocido hasta ahora. El resultado global es una disminución de lo que tarda la preparación del producto final y un incremento de su rendimiento porcentual. Además, ya que se necesitan menos tiempo y menos reactantes, hay un beneficio global en términos de ahorro de costes.

Las ventajas encontradas en el procedimiento mejorado de la presente invención incluyen, en la figura 1, el uso de la D-fructosa como material de partida barato y CaO, lo que disminuyó la duración de la reacción e incrementó el rendimiento porcentual de la producción de la lactona; la reducción con Red-Al/etanol que generó una mezcla regioselectiva de los compuestos del producto anomérico del cual se puede separar fácilmente la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa final por los procedimientos conocidos por el experto en la técnica; en la figura 4,

40 el uso de la citosina como material de partida en vez de la benzoil-citosina (figura 5) o del uracilo (figura 6) como se halló en la técnica anterior, lo que mejora la «economía atómica» del procedimiento mediante el empleo de un compuesto menos complejo y menos caro de masa molecular inferior; el requisito de menos equivalentes de citosina, SnCl₄ y BSA en la presente invención en comparación con las etapas similares de los procedimientos de la técnica anterior; la combinación de los reactantes y los reactivos en cantidades equivalentes y menores que las utilizadas hasta ahora, lo que produce el beneficio doble de una reacción que tarda en completarse de 3 a 4 horas y

45 que produce el intermedio (2) de la figura 4 con tal pureza que se hacen innecesarias las etapas de purificación y aislamiento cromatográficos adicionales.

La figura 1 es un esquema de una realización de la presente invención. En este procedimiento mejorado, el tiempo requerido para formar la ribonolactona (compuesto 1) a partir de la D-fructosa es de aproximadamente 40 horas o de menos de 2 días, y da lugar a un rendimiento del producto de aproximadamente el 13,6%, que es del 30 al 40%

50 mayor que el hallado en la técnica anterior más cercana. En comparación, las síntesis de la ribonolactona de Kiliani y de Scheibler tardaron cada una 2 o más meses en completarse y produjeron un rendimiento del producto de aproximadamente el 10% (López-Herrera et al., *J. Carbohydrate Chemistry* 1994, 13 (5): 767-775 en 768).

Se descubrió inesperadamente que el óxido de calcio (CaO) y el agua se pueden hacer reaccionar con el material de partida barato, la D-fructosa, para preparar la 1,2,3,5-tetra-O-protegidos-2-C-metil- β -D-ribofuranosa con

55 rendimientos del 30 al 40% mayores que los obtenidos anteriormente. Este procedimiento permite preparar grandes cantidades de 2-C-metil- β -D-ribofuranosa que tiene grupos hidroxilo protegidos, un intermedio importante de la síntesis de nucleósidos biológicamente activos y determinados compuestos de vitaminas. Una ventaja secundaria a este descubrimiento son los ahorros de coste significativos en la fabricación del producto, una consideración

especialmente importante cuando se prevé la síntesis industrial a gran escala. Por ejemplo, la 1,2,3,5-tetra-*O*-benzoil-2-*C*-metil- β -D-ribofuranosa se prepara habitualmente a partir de la D-ribosa con el uso de la D-arabinosa como material de partida. La síntesis de la D-arabinosa requiere al menos 5 etapas y la purificación cromatográfica. Además, el coste por kilogramo de la D-arabinosa es de aproximadamente 250 veces el de la D-fructosa. Con el uso

5 del procedimiento mejorado de la presente invención, sólo se necesitan 4 etapas y reactivos baratos para preparar la 2-*C*-metil-ribosa con grupos protectores en las posiciones 1, 2, 3 y 5. Así pues, el producto deseado se fabrica de forma eficaz y a bajo coste sin que se necesiten purificaciones cromatográficas.

También fue sorprendente el hallazgo de que el CaO, cuando se utiliza como reactante inicial en el procedimiento, hacía disminuir significativamente el tiempo que se necesitaba para formar la 2-*C*-metil- β -D-ribonolactona. Esto hizo

10 disminuir significativamente la duración global de la síntesis en comparación con el trabajo anterior de Kiliani y Scheibler en el que se utilizó de reactante el Ca(OH)₂.

También se descubrió que el Red-Al, opcionalmente en etanol, como agente reductor, producía la 2,3,5-tri-*O*-benzoil-1-hidroxi-2-*C*-metil- β -D-ribofuranosa que, al acilarse, daba esencialmente un único producto anomérico, lo que permitió que la separación fuera más eficaz. Esto simplifica el aislamiento del producto final deseado.

15 Los aspectos de las ventajas de la presente invención incluyen lo siguiente: la selección de la D-fructosa como material de partida barato es económicamente favorable para preparar el análogo glucídico protegido final; el uso del CaO incrementa el rendimiento del producto y disminuye el tiempo de reacción para la producción de la lactona; y la reducción con Red-Al genera una mezcla regioselectiva de los compuestos del producto anomérico del cual se aísla el producto final con facilidad mediante los procedimientos y equipo habituales. Otras ventajas incluyen el uso de

20 reactivos baratos además del reactante de partida económico, un número mínimo de etapas para manejar compuestos intermedios en el procedimiento global, y que solo se necesiten los procedimientos y equipamiento habituales bien conocidos por los expertos en la técnica en vez de etapas complicadas y aparatos caros.

La figura 4 es un esquema de otra realización de la presente invención. Las ventajas halladas en este procedimiento mejorado incluyen las siguientes. El uso de la citosina como material de partida en vez de la benzoil-citosina (figura

25 5) o del uracilo (figura 6) como se halló en la técnica anterior mejora la «economía atómica» del procedimiento al emplear un compuesto menos complejo y menos caro de masa molecular menor. Además, la presente invención necesita que se usen menos equivalentes de citosina, SnCl₄ y BSA en comparación con las etapas similares de los procedimientos de la técnica anterior. Esta combinación de reactivos y reactivos en cantidades equivalentes menores que las utilizadas hasta ahora produce el beneficio doble de una reacción que tarda en completarse menos

30 de 3 o 4 horas, y la producción del intermedio (2) con tal pureza que las etapas de purificación y aislamiento cromatográfico adicionales se hacen innecesarias.

Resultó sorprendente hallar que el uso de NaOMe en MeOH en la etapa de desprotección de la presente invención (figura 4, (5) → (6), retirada de los grupos benzoilo protectores) ofrece las ventajas de ser menos caro, más seguro y más fácil de utilizar en una síntesis a escala industrial en comparación con el uso del amoníaco en el procedimiento

35 de la técnica anterior (figura 5, (5a) → (6)). Un beneficio añadido es resultado de un tiempo de reacción más corto: la reacción que utiliza metóxido de sodio tarda en completarse aproximadamente 1 hora en comparación con 1-2 días para la misma reacción con amoníaco. Además, un tratamiento simple en metanol o etanol, preferiblemente etanol, genera (6) con una gran pureza en la presente invención, con lo que se elimina una laboriosa y larga etapa de purificación cromatográfica que es esencial para el procedimiento de la técnica anterior (véase la figura 5, (5a) →

40 (6)).

A pesar de ser más simple, usar menos cantidad tener menor coste, e incrementar la seguridad de los reactivos y reactivos utilizados, las primeras dos etapas del procedimiento de la presente invención tienen un rendimiento del producto combinado del 85% en comparación con un rendimiento del producto del 24% observado en el procedimiento de la técnica anterior mostrado en la figura 5. El rendimiento del producto se mantuvo en

45 aproximadamente 80+ % incluso aunque la carga de la reacción se incrementara desde aproximadamente el 5% en la técnica anterior a aproximadamente el 13% en la presente invención para la etapa sensible de protección de la formamidina que da a conocer (7) (figura 4, (6) → (7)).

Una simple mejora sobre la técnica anterior afecta de forma positiva a las siguientes dos etapas del procedimiento, siliación-protección y conjugación BOC-éster, que generan, por ejemplo, (8) y (9). Primero, la pirimidina, más cara y

50 difícil de retirar, que se utilizó como solvente de la reacción en la técnica anterior (figura 5, (7) → (8)), se reemplaza por diclorometano (figura 4, (7) → (8)). La siliación en el diclorometano produce una modificación indeseable por 3',5'-disiliación, lo que permite un mayor control sobre la formación del subproducto disilado y la conversión de más del 99% de (7) en (8). Y ya que el diclorometano también se utiliza como solvente para la conjugación con BOC-Val-OH, no hay necesidad de aislar (8) antes de su conjugación con BOC-Val-OH para generar (9). Un simple

55 procedimiento de extracción permite recoger (8) antes de que se conjugue con BOC-Val-OH (compárese la figura 4, (8) → (9) con la misma etapa en la técnica anterior, figura 5).

Además, el procedimiento de la técnica anterior empleó *N,N*-dimetilformamida y acetonitrilo como solventes de la reacción de conjugación de BOC-Val-OH (figura 5, (8) → (9a)). Ambos reactivos son caros, proporcionan una proporción de carga baja de aproximadamente el 3% en esta reacción y la *N,N*-dimetilformamida en particular es

difícil de retirar de la mezcla de reacción debido a su alto punto de ebullición. Además, se requieren aproximadamente 2 días y un exceso de BOC-Val-OH, EDC y dimetilaminopiridina (DMAP) para que se complete la reacción. Este exceso de reactivos se necesitan para impulsar la terminación de la reacción, pero su presencia complica la purificación del producto en las etapas posteriores del procedimiento. Además, el uso de un exceso de DMAP favorece la racemización del resto aminoacídico del derivado con L-valina.

A diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, el uso del diclorometano como solvente para la reacción de conjugación en la presente invención (figura 4, (8) → (9)) permite una proporción de carga de aproximadamente el 11%, mientras que se utiliza aproximadamente la mitad de la cantidad de reactivos que la empleada en la técnica anterior y que se produce una reacción que tarda en completarse aproximadamente 4-6 horas. La disminución del tiempo de la reacción y la cantidad controlada de DMAP utilizado en la presente invención reduce la racemización del resto aminoacídico del derivado con L-valina a menos del 0,2% en comparación con la racemización de aproximadamente el 6% que se halla en la técnica anterior. Tales niveles racémicos de tan solo el 0,2% se encuentran dentro de un margen más farmacéuticamente aceptable para los fármacos, porque se relacionan con la mayor actividad asociada a un enantiómero en comparación con su equivalente.

Para la posterior desprotección de la β -D-2'-C-metil-citidina esterificada se puede utilizar fluoruro de amonio (NH_4F) en metanol. El fluoruro de amonio (NH_4F) en metanol es el mejor reactivo para la desprotección del compuesto (a saber, retirada de los grupos sililo y dimetilformamida) en la reacción de (9) para formar (10) (figura 4). El procedimiento de la técnica anterior (figura 5, (9a) → (10)) emplea los mismos reactivos, pero utiliza 10 equivalentes de fluoruro de amonio, una proporción de carga de aproximadamente el 3%, y necesita una separación cromatográfica para obtener (10) en comparación con el uso de 4 equivalentes de fluoruro de amonio, una proporción de carga de aproximadamente el 10% y ausencia de separación cromatográfica (por innecesaria) en la presente invención. Un beneficio por utilizar menos fluoruro de amonio con aproximadamente 10 equivalentes molares de acetato de etilo en esta etapa del procedimiento mejorado es que la hidrólisis del BOC-éster (10) en la β -D-2'-C-metil-citidina, también identificada como 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (6), se mantiene en un mínimo. Así pues, el procedimiento de la presente invención es ventajoso en su uso eficaz de reactivos y en el incremento de las proporciones de carga.

Además, (10) se purifica con un simple tratamiento con $\text{EtOAc/TBME/H}_2\text{O}$, lo que de nuevo elimina la necesidad de la separación y purificación cromatográficas, y, en consecuencia, elimina otra etapa más de la larga y laboriosa purificación cromatográfica. El rendimiento porcentual de (10) puro tras las tres etapas de siliación, conjugación y desprotección es de aproximadamente el 60% al 99%.

En la etapa final del procedimiento mejorado (figura 4, (10) → (11)) se utiliza el etanol como solvente para desproteger el derivado del éster 3'-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina mediante la retirada del grupo BOC protector, y la proporción de carga se incrementa del 2% de la técnica anterior al 12% en el procedimiento presente. El etanol del procedimiento mejorado reemplaza el acetato de etilo utilizado en la técnica anterior como mejor solvente (figura 5, (10) → (11)), y este cambio da lugar al incremento de carga observado. La selección del etanol como solvente y el incremento de las proporciones de carga dan lugar a un incremento del rendimiento de la reacción desde aproximadamente el 80% en el procedimiento de la técnica anterior a aproximadamente el 95% en la presente invención, y a evitar la contaminación debido a la generación de ácido acético a partir del acetato de etilo. El producto final, (11), se obtiene en una forma pura a > 98%, y la racemización de la L-valina se mantiene a menos del 0,2%.

Así pues, la síntesis mejorada global de la presente invención para preparar un compuesto prototípico de éster 3'-O-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina (2-amino-3-metil-butarato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo), o una sal de hidrocloreuro del mismo, da lugar a que el rendimiento porcentual global mejore de aproximadamente el 26% y a que disminuya la duración del ciclo de aproximadamente el 80%. La disminución de la duración del ciclo se debe principalmente a la eliminación de los procedimientos de purificación y separación cromatográfica costosos, laboriosos y largos. Otros factores importantes incluyen un incremento de la carga que da lugar a que haya que utilizar menos lotes, y el uso de solventes y reactivos de fácil manipulación. El uso de solventes y reactivos que son más seguros y menos costosos proporcionan beneficios adicionales al uso del procedimiento presente. No obstante, estos beneficios se podrían pasar por alto si el rendimiento porcentual del producto fuera menor del dado a conocer por el procedimiento de la técnica anterior. Que el procedimiento de la presente invención haga incrementar el rendimiento en aproximadamente el 26% proporciona el argumento culminante para su utilización.

Definiciones y reactivos alternativos

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «esencialmente libre de enantiómero» o «esencialmente sin enantiómero» se refiere a una composición nucleosídica que incluye al menos del 95% al 98% en peso, e incluso más preferiblemente del 99% al 100% en peso, del enantiómero indicado para ese nucleósido. En una realización preferida, en los procedimientos y en los compuestos de esta invención, los compuestos están esencialmente libres de enantiómeros.

De igual forma, la terminología «aislado» se refiere a una composición nucleosídica que incluye al menos el 85% o

el 90% en peso, preferiblemente del 95% al 98% en peso, e incluso más preferiblemente del 99% al 100% en peso, del nucleósido, y lo demás comprende otras especies químicas o enantiómeros.

La terminología «ribónico-γ-lactona» y «ribonolactona» se utilizan indistintamente a lo largo del texto, y se refieren al compuesto denominado compuesto 1 de la figura 1, o a un derivado del mismo con un oxígeno protegido.

- 5 La terminología «protegido», tal y como se utiliza en la presente memoria y a menos que se especifique de otra manera, se refiere a un grupo que se añade a un átomo de oxígeno, nitrógeno o fósforo para impedir su posterior reacción o con otros propósitos. Los expertos en la técnica de la síntesis orgánica conocen bien una amplia gama de grupos protectores de oxígeno, nitrógeno y fósforo.

- Los ejemplos de grupos protectores adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, benzoílo; grupos alquilo
10 sustituidos o sin sustituir, grupos arilo sustituidos o sin sustituir, grupos sililo sustituidos o sin sustituir; ésteres aromáticos o alifáticos sustituidos o sin sustituir, tales como, por ejemplo, grupos aromáticos como benzoílo, toluoílo (p. ej., *p*-toluoílo), nitrobenzoílo, clorobenzoílo; grupos éter tales como, por ejemplo, -C-O-aralquilo, -C-O-alquilo o -C-O-arilo; y grupos alifáticos como grupos acilo o acetilo, que incluyen todo acilo aromático o alifático sustituido o sin sustituir, -(C=O)-aralquilo, -(C=O)-alquilo o -(C=O)-arilo; en donde el resto aromático o alifático del
15 grupo acilo puede ser de cadena lineal o ramificada; todos los cuales además pueden estar de forma optativa sustituidos por grupos no afectados por las reacciones que comprenden la síntesis mejorada (véase Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 2.^a edición (1991)). Por ejemplo, en una realización de la invención, los grupos protectores están sustituidos por grupos no afectados por el reductor escogido, preferiblemente Red-Al. Para usar los éteres como grupos protectores, la atención se dirige a la patente de los
20 EE.UU. 6.229.008 de Saischeck et al., incorporada en la presente memoria por referencia, en donde se describe que el uso de un éter como grupo protector puede ofrecer ventajas significativas, en particular en la posición 5' de un pentofuranósido, para dar estabilidad frente a reactantes y condiciones del procedimiento. Esto ofrece una ventaja final a la hora de la separación, el aislamiento y la purificación del producto deseado y, así pues, sobre el rendimiento porcentual del producto.

- 25 Los grupos protectores de los hidroxilos de los azúcares pueden ser, como ejemplos no limitantes, sililo, benzoílo, *p*-toluoílo, *p*-nitrobenzoílo, *p*-clorobenzoílo, acilo, acetilo, -(C=O)-alquilo y -(C=O)-arilo, todos los cuales pueden estar sustituidos o sin sustituir con uno o más grupos que no se vean afectados por el agente reductor seleccionado. En una realización, el grupo protector de hidroxilos de azúcares es el benzoílo. Los grupos protectores de aminoácidos son preferiblemente BOC (butoxicarbonilo), -(C=O)-aralquilo, -(C=O)-alquilo o -(C=O)-arilo. En una realización de la
30 invención, el grupo protector de aminoácidos es el BOC (butoxicarbonilo).

- A lo largo de esta solicitud, la terminología «sustituido» significa un nivel de sustitución único o múltiple por uno o más sustituyentes concretos. Cuando se describe o reivindica un único sustituyente, el compuesto puede estar sustituido una o más veces con ese sustituyente. Cuando se describen o reivindican varios sustituyentes, el
35 compuesto sustituido puede estar sustituido de forma independiente por uno o más de los restos de sustituyentes descritos o reivindicados, únicamente o pluralmente.

- La terminología «alquilo», tal y como se utiliza en la presente memoria y a menos que se especifique de otra manera, se refiere a un hidrocarburo saturado, de cadena lineal, ramificado o cíclico, primario, secundario o terciario típicamente de C₁ a C₁₀, y en concreto incluye metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, metilpentilo
40 y dimetilbutilo. La terminología incluye tanto grupos alquilo sustituidos como sin sustituir. Los restos con los cuales el grupo alquilo puede estar sustituido en una o más posiciones se seleccionan del grupo que consiste en halo (entre ellos, flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo (p. ej., CH₂OH), amino (p. ej., CH₂NH₂, CH₂NHCH₃ o CH₂N(CH₃)₂), alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, azido (p. ej., CH₂N₃), ciano (CH₂CN), ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, cualquiera de cuales, o todos, pueden estar sin proteger o protegidos adicionalmente
45 cuando sea necesario, como conocen los expertos en la técnica y como se enseña, por ejemplo, en Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 2.^a edición (1991).

La terminología «alquilamino» y «arilamino» incluye un grupo amino que tiene uno o más sustituyentes alquilo o arilo, respectivamente.

- La terminología «alcarilo» y «alquilarilo» incluye un grupo alquilo con un sustituyente arilo. La terminología
50 «aralquilo» y «arilalquilo» se refiere a un grupo arilo con un sustituyente alquilo.

La terminología «halo» incluye cloro, bromo, yodo y flúor.

- La terminología «arilo», tal y como se utiliza en la presente memoria, y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a fenilo, bifenilo o naftilo. La terminología incluye tanto restos sustituidos como sin sustituir. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más restos, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, hidroxilo, amino, alquilamino,
55 arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, cualquiera de los cuales, o todos, pueden estar sin proteger o protegidos adicionalmente cuando sea necesario, como conocen los expertos en la técnica y como se enseña, por ejemplo, en Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 2.^a edición (1991).

La terminología «acilo» incluye un $-C(=O)-R$ en donde el resto R no carbonílico es, por ejemplo, alquilo o alquilo inferior lineal, ramificado o cíclico, alcoxialquilo que incluye metoximetilo, aralquilo que incluye bencilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo(C_1-C_4), o alcoxi(C_1-C_4), ésteres de sulfonato tales como alquil- o aralquil-sulfonilo que incluye metanosulfonilo, el éster de mono-, di- o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo tal como, por ejemplo, dimetil-*t*-butilsililo, o difenilmetilsililo. Los grupos de arilo en los ésteres comprenden de manera óptima un grupo fenilo. La terminología «acilo inferior» se refiere a un grupo acilo en el que el resto no carbonilo es un alquilo inferior.

La terminología «ácido carboxílico» y «éster de ácido carboxílico» incluye las estructuras $RC(=O)OH$ y $RC(=O)O-R'$, respectivamente. Aquí, el resto no carbonílico, tanto si es R como R' , es, por ejemplo, alquilo o alquilo inferior lineal, ramificado o cíclico, alcoxialquilo que incluye metoximetilo, aralquilo que incluye bencilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo(C_1-C_4) o alcoxi(C_1-C_4). También se pretende que se incluyan aquí los ésteres de sulfonato tales como alquil- o aralquil-sulfonilo que incluye metanosulfonilo, el éster mono-, di- o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo tal como, por ejemplo, dimetil-*t*-butilsililo, o difenilmetilsililo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo. En todos los casos, R y R' pueden ser el mismo sustituyente o pueden ser sustituyentes diferentes.

La terminología amino incluye aminoácidos α , β , γ o δ que se producen de forma natural y sintética, e incluye, pero sin limitarse a ellos, los aminoácidos encontrados en las proteínas, a saber, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En una realización preferida, el aminoácido se encuentra en la configuración *L*. En otra realización preferida, el aminoácido es *L*-valinilo. Otra opción es que el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroilo, lisinilo, argininilo, histidinilo, β -alanilo, β -valinilo, β -leucinilo, β -isoleucinilo, β -prolinilo, β -fenilalaninilo, β -triptofanilo, β -metioninilo, β -glicinilo, β -serinilo, β -treoninilo, β -cisteinilo, β -tirosinilo, β -asparaginilo, β -glutaminilo, β -aspartoilo, β -glutaroilo, β -lisinilo, β -argininilo o β -histidinilo.

La terminología «aminoácido no natural» se refiere a un ácido carboxílico que tiene un grupo amino terminal, pero que no se encuentra en la naturaleza. La terminología pretende abarcar tanto los aminoácido *D* como los *L*, y cualquier forma tautomérica o estereoisomérica de los mismos.

La terminología de la base del nucleósido incluye una base púrica o pirimidínica. Los ejemplos de bases de purina o de pirimidina incluyen, pero sin limitarse a ellos, adenina, N^6 -alquilpurinas, N^6 -acilpurinas (en donde el acilo es $C(O)$ (alquilo, arilo, alquilarilo o arilalquilo)), N^6 -bencilpurina, N^6 -halopurina, N^6 -vinilpurina, N^6 -purina acetilénica, N^6 -acilpurina, N^6 -hidroxialquilpurina, N^6 -tioalquilpurina, N^2 -alquilpurinas, N^2 -alquil-6-tiopurinas, timina, citosina, 5-fluorocitosina, 5-metilcitosina, 6-azapirimidina, que incluye 6-azacitosina, 2- y/o 4-mercaptopirimidina, uracilo, 5-halouracilo, entre ellos 5-fluorouracilo, C^5 -alquilpirimidinas, C^5 -bencilpirimidinas, C^5 -halopirimidinas, C^5 -vinilpirimidina, C^5 -pirimidina acetilénica, C^5 -acilpirimidina, C^5 -hidroxialquilpurina, C^5 -amidopirimidina, C^5 -cianopirimidina, C^5 -nitropirimidina, C^5 -aminopirimidina, N^2 -alquilpurinas, N^2 -alquil-6-tiopurinas, 5-azacitidinilo, 5-azauracililo, triazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo y pirazolo-pirimidinilo. Las bases purínicas incluyen, pero sin limitarse a ellas, guanina, adenina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina y 6-cloropurina. Los grupos funcionales de oxígeno y nitrógeno de la base se pueden proteger cuando sea necesario o se desee. Los grupos protectores adecuados los conocen bien los expertos en la técnica, e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo y *t*-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo y grupos acilo tales como acetilo y propionilo, metanosulfonilo y *p*-toluenosulfonilo. Alternativamente, la base de purina o de pirimidina puede estar opcionalmente sustituida de tal manera que forme un profármaco viable, el cual se puede escindir *in vivo*. Los ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen el resto acilo, una amina o ciclopropilo (p. ej., 2-amino, 2,6-diamino o ciclopropil guanosina).

Otros reactantes utilizados en el procedimiento de la presente invención o de la técnica anterior se definen como: BSA (bis(trimetilsilil)acetamida), TMSCI es clorotrimetilsilano; TFAA es anhídrido trifluoroacético; TBDPSCI es cloruro de *tert*-butildifenilsililo; TBDMSCI es cloruro de *tert*-butildimetilsililo; y DCM es diclorometano.

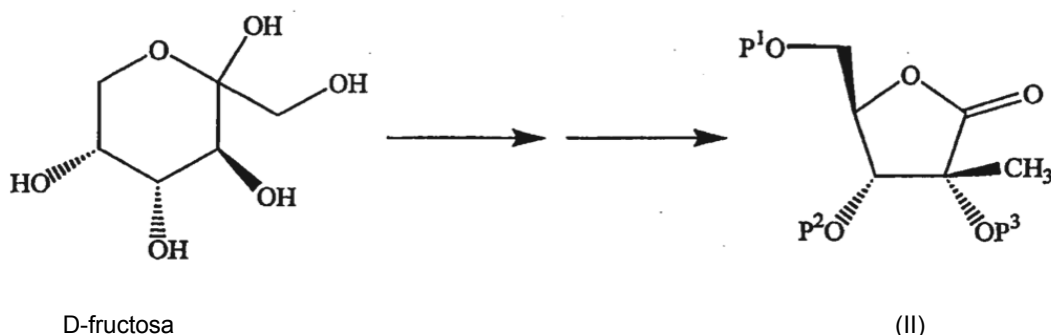
El procedimiento de la presente invención no se limita al uso del nucleósido, del éster aminoacídico protegido y de los reactantes ejemplificados. Se pueden utilizar reactantes alternativos adecuados para la presente invención en lugar de los ofrecidos anteriormente. Por ejemplo, la TEA (triethylamina) se puede reemplazar por cualquier otra amina adecuada, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, diisopropiletilamina, *N*-etilmorfolina o cualquier amina alifática terciaria; el DME (1,2-dimetoxietano) se puede reemplazar por cualquier solvente aprótico polar adecuado, tal como el THF (tetrahidrofurano) o cualquier éter; y el Red-Al/EtOH (hidruro de sodio y bis[2-metoxietoxi]-aluminio/etanol) en tolueno se puede reemplazar por NaHTE, Sml_2 , H_2 + catalizador de Pd-fosfina, o $LiAl(O^tBu)_3H$ (hidruro de litio y tri-*tert*-butoxialuminio), todos los cuales producen reducciones quimioselectivas o regioselectivas, pero no por $LiAlH_4$, que da lugar a un diol de cadena abierta. Los lavados de la suspensión viscosa del producto con THF justo antes y después de añadir el $MgSO_4$ se pueden reemplazar por lavados en acetona. De hecho, para los procedimientos de escalamiento, la acetona es el solvente preferido.

Además, la DMF (dimetilformamida) se puede reemplazar por cualquier solvente polar tal como, por ejemplo, DMSO (dimetilsulfóxido), aunque la DMF es la preferida por ser fácil su manipulación y su eliminación desde la mezcla de

reacción. El EDC (hidrocloruro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil-carbodiimida); también denominado DEC) se puede reemplazar por cualquier reactante que permita la conjugación, que incluye, pero sin limitarse a ellos, CDI (carbonildiimidazol), el reactivo BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio), o los reactantes de conjugación similares a los que conocen los expertos en la técnica. Aunque se prefiere el SnCl_4 , se puede utilizar cualquier ácido de Lewis en su lugar. El ácido de Lewis incluye, pero sin limitarse a ellos, SnCl_4 , BF_3 , AlCl_3 , TiCl_2 , TiCl_4 , FeCl_3 , SnCl_2 y cualquier mezcla de los mismos. En una realización, el ácido de Lewis es el SnCl_4 . Cualquier solvente orgánico tal como, por ejemplo, tolueno, puede reemplazar al acetonitrilo. Cualquier agente activador, por ejemplo, un sililante, se puede utilizar para activar la base nucleosídica para la conjugación. El HMDS (hexametildisilazano), el TMSCl o el TBDPSCI, por ejemplo, se pueden utilizar en lugar de la BSA (bis(trimetilsilil)acetamida). El amoníaco es un reactante alternativo para ser usado en lugar del metóxido de sodio en metanol, y cualquier solvente polar tal como el DMSO puede reemplazar a la DMF. Muchos otros reactantes de sililación pueden reemplazar al TBDPSCI, cualquier sal de flúor puede reemplazar al NH_4F y otros ácidos tales como el TFA puede reemplazar al HCl.

Descripción detallada de las etapas del procedimiento

15 Preparación de la ribonolactona



La ribonolactona puede prepararse mediante cualquier medio publicado o sin publicar, entre ellos las técnicas de sustitución y oxidación estándares. En una realización del procedimiento para la síntesis de la ribonolactona, se sintetiza a través de la D-fructosa mediante el protocolo que viene a continuación.

La ribonolactona puede prepararse al hacer reaccionar la D-fructosa con el óxido de calcio (CaO). La D-fructosa puede hacerse reaccionar con el CaO en cualquier proporción molar que permita que prosiga la reacción a una velocidad aceptable sin un exceso de productos secundarios, preferiblemente a una proporción molar de 5:1, e incluso más preferiblemente a una proporción molar de 3:1, y lo más preferiblemente a una proporción molar de 2,3:1,3 para la D-fructosa. El CaO puede añadirse a cualquier velocidad que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin generar un exceso de calor ni un exceso de productos secundarios. En una realización, el CaO se añade incrementalmente durante un periodo de 5 minutos a temperatura ambiente. Se puede dejar que la reacción prosiga hasta que se consuma una cantidad sustancial de la D-fructosa, p. ej., durante 6-22 horas, en la que el progreso de la reacción se puede supervisar, por ejemplo, con la toma periódica de alícuotas para el análisis por TLC.

Esta reacción se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que permita que prosiga la reacción a una velocidad aceptable sin favorecer la descomposición ni el exceso de productos secundarios. La temperatura preferida es desde la temperatura ambiental a aproximadamente 23-40 °C.

Se puede utilizar un precipitante para retirar el calcio de la solución. En una realización, el CO_2 y un ácido que es más fuerte que el ácido carbónico, y en una realización preferida, un ácido orgánico, se añaden a la mezcla de reacción para formar carbonato de calcio. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos; ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido subérico, ácido sebáico, ácido azelaico, ácido maleico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido butírico, ácido pentanoico, ácido hexanoico o ácido octanoico.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el CO_2 puede burbujearse a través de la mezcla al concluir el tiempo de reacción durante una cantidad adecuada de tiempo para disminuir el pH desde un valor básico a neutro, p. ej., aproximadamente 2-3 horas. Todo CaCO_3 que se forme como resultado de la etapa de neutralización se puede retirar, por ejemplo, mediante filtración al vacío.

A continuación, las capas acuosas se pueden tratar con un ácido, tal como un ácido orgánico, que es más fuerte que el ácido carbónico, por ejemplo el ácido oxálico, a cualquier proporción molar que permita que prosiga la reacción a una velocidad aceptable sin un exceso de productos secundarios. En una realización, el ácido, tal como el ácido oxálico, se añade a una proporción molar de 1:2 con la D-fructosa.

La reacción se puede dejar que prosiga hasta que precipite una cantidad sustancial de calcio a cualquier temperatura que permita que el calcio precipite desde la solución a una velocidad aceptable sin favorecer la descomposición ni la formación de un exceso de productos secundarios. Por ejemplo, la solución se puede agitar hasta que aparezca una suspensión viscosa blanca, por ejemplo, en torno a 30 minutos, a aproximadamente la

5 temperatura ambiental o en torno a 25 °C. A continuación, esta suspensión viscosa se puede agitar durante una noche, por ejemplo, a 45-50 °C.

Después de terminar, la solución se puede evaporar, por ejemplo a baja presión, para retirar la mayor parte del agua mientras siga quedando una mezcla acuosa. El producto se puede aislar de la mezcla acuosa mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, el NaCl y un solvente orgánico, tal como el THF, se puede añadir a la

10 suspensión viscosa a la temperatura ambiental y se puede agitar, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos. Las capas resultantes se pueden separar, y la capa acuosa se añade a solvente nuevo, tal como el THF, y se agita, por ejemplo, durante 10 minutos más. El procedimiento de añadir solvente, agitar y separar la capa acuosa resultante se puede repetir tantas veces como sea necesario, por ejemplo, repetirse en torno a 3 veces. Finalmente, las soluciones orgánicas se pueden combinar y agitar con un desecante, tal como MgSO₄ anhidro, por ejemplo

15 durante 30 minutos, luego se pueden filtrar, y se pueden lavar con más solvente, tal como el THF. El filtrado se puede evaporar, por ejemplo a baja presión, a aproximadamente 40 °C, y el producto bruto se puede recoger, por ejemplo, como un semisólido naranja oscuro.

Opcionalmente, para purificar el producto se añade un segundo solvente, tal como acetona, al producto bruto y la mezcla se agita, por ejemplo, a 20 °C durante 3 horas. Se puede recoger un producto blanco de ribonolactona

20 cristalina, por ejemplo, mediante filtrado al vacío, se puede lavar con el segundo solvente, tal como acetona, y se puede secar al vacío (véase la figura 1, compuesto 1).

El rendimiento del producto de esta reacción puede ser aproximadamente del 13,6%, un incremento de casi el 4% por encima del rendimiento del producto hallado en la técnica anterior.

A continuación, los grupos hidroxilo libres de la ribonolactona se pueden proteger selectivamente con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o silito, mediante los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, según se enseña en Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. Por ejemplo, el cloro-*t*-butil-difenilsilano se puede hacer reaccionar con la ribonolactona a la temperatura ambiente en piridina anhidra. Otra posibilidad es que un cloruro de acilo, tal como el cloruro de benzoilo, se puede hacer reaccionar con la ribonolactona, opcionalmente en presencia de una base, en

30 las condiciones de reflujo en DME.

Por ejemplo, la ribonolactona producida se puede mezclar con una base, por ejemplo la DMAP, a cualquier proporción molar que permita que prosiga la reacción a una velocidad aceptable sin un exceso de productos secundarios. En una realización, la proporción molar de ribonolactona:base (tal como la DMAP) es aproximadamente 5:1. La reacción se puede favorecer opcionalmente con el uso de una base adicional, tal como la

35 TEA, a cualquier proporción molar que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin un exceso de productos secundarios. En una realización de la invención, la base adicional (tal como la TEA) se utiliza en exceso. Transcurrido un tiempo suficiente, se añade un cloruro de acilo, tal como el cloruro de benzoilo, a cualquier proporción molar que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin un exceso de productos secundarios, por ejemplo, a una proporción aproximada de 5:1 con ribonolactona.

40 La ribonolactona se puede preparar en cualquier solvente que sea adecuado para la temperatura y la solubilidad de los reactantes. Los solventes pueden consistir en cualquier solvente aprótico que incluye, pero sin limitarse a ellos, solventes alquílicos tales como hexano y ciclohexano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, diclorometano, dicloroetano, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), DME, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida o cualquier combinación de los mismos, aunque preferiblemente el DME.

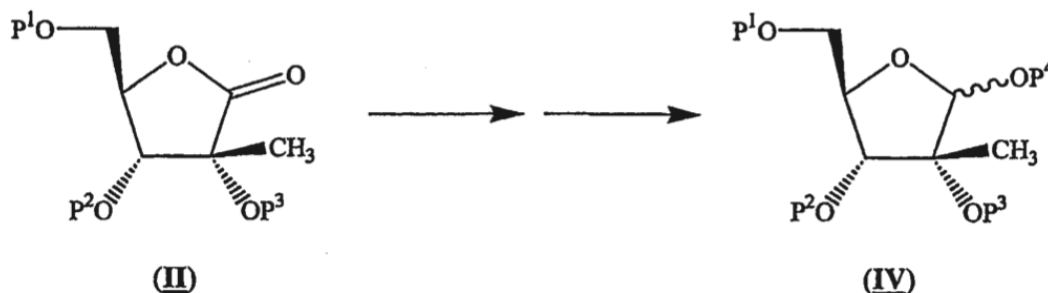
45 Esta reacción se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin favorecer la descomposición ni un exceso de productos secundarios. La temperatura preferida es desde la temperatura ambiente a unos 5 °C.

A continuación se puede añadir agua helada a la mezcla de reacción, tras lo cual se recoge el producto bruto, se agita con un solvente adecuado, tal como éter *tert*-butil metílico, se filtra, lava y se seca, por ejemplo, al vacío.

50 Con el propósito de comparar, el procedimiento de Kiliani de la técnica anterior para preparar la ribonolactona se ofrece en la figura 2. Una explicación detallada del procedimiento de Kiliani según se describe Sowden en *Adv. In Carbohydrate Chem.* 1957, 12: 43 indica que el Ca(OH)₂ se añade una vez y de nuevo 14 días después, tras lo cual la mezcla se deja reposar agitándola de vez en cuando durante 1-2 meses. Después se filtra la mezcla, y el filtrado se satura con CO₂. A continuación, se precipitan los iones de calcio mediante la adición de una cantidad equivalente

55 exacta de ácido oxálico, se filtra la solución, se concentra para formar un jarabe y el jarabe se deja cristalizar en condiciones de frío durante otros pocos días. Finalmente, el agua madre se separa de los cristales, y los cristales se disuelven y retrocristalizan desde el agua.

Reducción de la ribonolactona protegida



La 2-C-metil-D-ribono- γ -lactona opcionalmente protegida que se obtiene en la etapa anterior se puede reducir con cualquier agente reductor adecuado a cualquier proporción molar que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin un exceso de productos secundarios. Los agentes reductores adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, Red-Al/EtOH (hidruro de sodio y bis[2-metoxietoxi]-aluminio/etanol), NaHTE, Sml₂, H₂ + catalizador de Pd-fosfina, o LiAl(O^tBu)₃H (hidruro de tri-*tert*-butoxialuminio y litio), los cuales producen reducciones quimioselectivas y regioselectivas. En una realización de la invención, el agente reductor es Red-Al/etanol. Por ejemplo, puede añadirse una solución de Red-Al a una solución de 2-C-metil-D-ribono- γ -lactona opcionalmente protegida a una proporción molar de Red-Al a 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona de aproximadamente 2:1.

Resulta interesante que se hallara que determinados reactantes funcionan peor o dan lugar a una mezcla de especies deseadas e indeseadas del producto cuando se utiliza en el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, cuando el Red-Al en etanol se reemplaza por LiAl(O^tBu)₃H, el último reductor enlentece la reacción y da lugar a la formación de varios productos indeseados. Así mismo, el 9-borabicyclo-[3.3.1]-nonano, 9-BBN, y el hidruro de diisobutilaluminio, DIBALH, no producen ninguna reacción o sólo cantidades de traza del producto deseado.

Esta reacción se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin favorecer la descomposición ni el exceso de productos secundarios. La temperatura preferida es de aproximadamente 0 °C a -5 °C.

La ribofuranosa se puede preparar en cualquier solvente que sea adecuado para la temperatura y la solubilidad de los reactantes. Los solventes pueden constar de cualquier solvente orgánico entre ellos, pero sin limitarse a ellos, solventes alquílicos tales como pentano, hexano y ciclohexano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditanos, THF, dioxano, acetonitrilo, diclorometano, dicloroetano, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), DME, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, solventes alcohólicos tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, pentanol y octanol, o cualquier combinación de los mismos, aunque preferiblemente en una solución de tolueno anhidro y etanol anhidro.

La reacción se puede parar con una fuente de protones adecuada, tal como acetona, agua y HCl a 1 N. La mezcla puede extraerse con un solvente orgánico, tal como acetato de etilo, lavarse con solución salina, secarse y retirar el solvente, por ejemplo, a presión a aproximadamente 40 °C.

El grupo hidroxilo libre de la ribofuranosa puede protegerse luego de forma selectiva con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o sililo, mediante los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. Por ejemplo, el cloro-*t*-butildifenilsilano puede hacerse reaccionar con la ribofuranosa a la temperatura ambiente en piridina anhidra. Otra posibilidad es que un cloruro de acilo, tal como el cloruro de benzoílo, se pueda hacer reaccionar con la ribofuranosa, opcionalmente en presencia de una base, en condiciones de reflujo en DME.

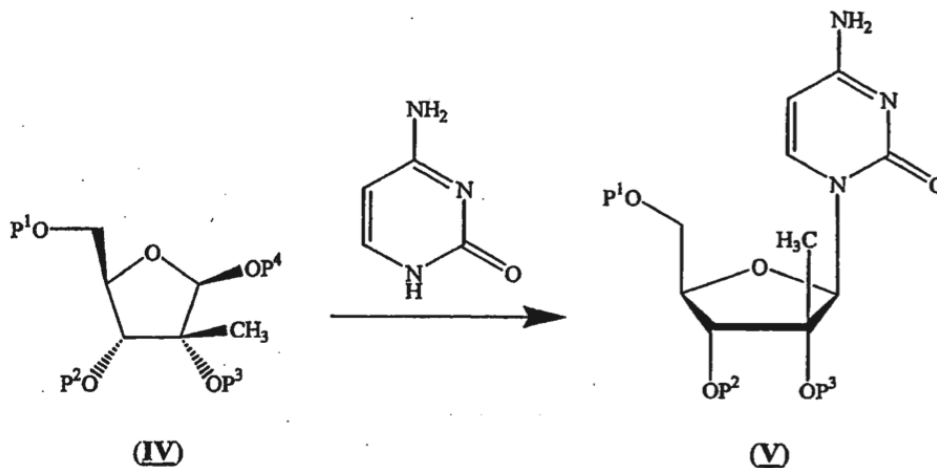
La figura 3 es un ejemplo de un procedimiento alternativo descrito por Harry-O'Kuru et al., *J. Org. Chem.*, (1997), 62 (6): 1754-59. Este procedimiento carece de un intermedio de lactona, pero se utiliza para obtener un producto idéntico al de la presente invención. El procedimiento de Harry-O'Kuru utilizó D-arabinosa o D-ribosa con todos sus grupos hidroxilo protegidos, excepto el que está en C2, antes de la formación de la cetona (figura 3). El azúcar protegido se hizo reaccionar con el reactivo de peryodinano de Dess-Martin en CH₂Cl₂ y MgSO₄ para generar la 2,4,-di-O-benzoil-5-metil-O-benzoil-dihidrofuran-3-ona, que posteriormente se redujo con MeTiCl₃, MeMgBr/TiCl₄ (o RCeCl₂ en donde R es el sustituyente deseado para el C2 de la ribosa). La reacción de los compuestos (3) y (4a) con BzCl/DMAP/Et₃N genera el producto final (4b), el 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-3-R-ribofuranósido. Se observó que en la primera etapa se forma una cantidad significativa de un hidrato del producto deseado y esto requiere que se haga reaccionar durante una noche con un exceso de MgSO₄ para preparar un producto cetónico esencialmente seco. Además, se apreciará que una mezcla de los deseados 2-alkil-ribofuranósido protegido con benzoílo en las posiciones 1, 3 y 5, y sus isómeros α y β transesterificados de ribofuranósidos protegidos con benzoílo en las posiciones 2, 3 y 5, es el resultado de hacer reaccionar la 2-cetona intermedia clave con un reactante de

organotitanio en este procedimiento. Aunque fue intrascendente para los autores porque los tres productos eran útiles para sus propósitos, este aspecto de la síntesis requeriría una etapa de separación adicional para cualquiera que tenga interés sólo en un único isómero (*J. Org. Chem.*, 1997, 62 (6): 1754-9, en 1755). Se pueden utilizar la D-ribose o bien la D-arabinosa como material de partida para este procedimiento, pero los aspectos económicos tienen mucha importancia cuando se utiliza la D-arabinosa, ya que cuesta aproximadamente 250 veces más que la D-fructosa.

El procedimiento de la técnica anterior de la figura 3 difiere de la presente invención en que todos los grupos hidroxilo de la D-arabinosa o de la D-ribose, excepto el de C2, están protegidos antes de la formación de la cetona. A continuación se forma una cetona en C2 en el compuesto de partida al hacerlo reaccionar con el reactante peryodinano de Dess-Martin (véase la figura 3, compuesto 3) y, posteriormente, se reduce con MeTiCl_3 o RCeCl_2 , en donde R es el segundo sustituyente deseado para el C2 de la ribosa (véase la figura 3, compuestos 3 y 4). El producto final, el 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-alkil-ribofuranósido, se produce con un rendimiento de aproximadamente el 70%.

En comparación, el procedimiento más eficaz de la presente invención hace posible la formación de la lactona en el C1 de la ribofuranosa, la protección de los grupos hidroxilo disponibles en C2, C3 y C5 de la ribofuranosa, y la reducción de la lactona con Red-Al, opcionalmente en etanol, lo que produce los productos anoméricos fácilmente separables y regioselectivos, seguido por la protección del único grupo hidroxilo libre restante en el C1 de la ribofuranosa.

Condensación de la ribofuranosa con la citosina activada



La 2-C-metil-D-ribofuranosa opcionalmente protegida, que se obtiene de las etapas anteriores o bien por cualquier otro medio conocido en la técnica, se puede conjugar con una base nucleosídica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye las técnicas de conjugación estándares que utilizan bases activadas.

Una realización de la presente invención incluye el procedimiento para la síntesis de la β -D-2'-C-metil-citidina mediante el protocolo que se describe a continuación.

La β -D-2'-C-metil-citidina se puede preparar al hacer reaccionar la 2-C-metil-D-ribonofuranosa con una citosina activada que está sin proteger (esto es, sin benzoilar), tal como una citosina activada con un agente de activación, tal como un sililante, que incluye, pero sin limitarse a ellos, BSA ((N,O-bis(trimetilsilil)acetamida), HMDS, TMSCl o TBDPSCI. En una realización, el sililante es la BSA.

La reacción se puede llevar a cabo opcionalmente en presencia de un ácido de Lewis, tal como el SnCl_4 , a cualquier proporción molar que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin un exceso de productos secundarios. Los ácidos de Lewis adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, SnCl_4 , BF_3 , AlCl_3 , TiCl_2 , TiCl_4 , FeCl_3 , SnCl_2 y cualquier mezcla de los mismos. En una realización, el ácido de Lewis es el SnCl_4 .

La β -D-2'-C-metil-citidina se puede preparar en cualquier solvente que sea adecuado para la temperatura y la solubilidad de los reactantes. Los solventes pueden consistir en cualquier solvente aprótico que incluye, pero sin limitarse a ellos, solventes alquílicos tales como hexano y ciclohexano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, diclorometano, dicloroetano, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida o cualquier combinación de los mismos, aunque preferiblemente acetonitrilo.

Esta reacción se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin favorecer la descomposición ni un exceso de productos secundarios. La temperatura preferida es de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 80 °C.

Posteriormente, el nucleósido se puede desproteger mediante los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. Por ejemplo, los restos hidroxilo protegidos con benzoilo se pueden desproteger con NaOMe en MeOH a aproximadamente la temperatura ambiental.

- 5 El procedimiento de la técnica anterior de la figura 5 comprendía hacer reaccionar benzoil-citosina, BSA y SnCl_4 /acetonitrilo con la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa (4) para formar la 4-benzoilamino-1-(3,4-dibenzoiloxi-5-benzoiloximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (5a); hacer reaccionar (5a) con NH_3 en metanol y separar cromatográficamente el producto, la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (6), también conocido como β -D-2'-C-metil-citidina; hacer reaccionar (6) con $\text{Me}_2\text{NCH}(\text{OMe})_2$ en DMF a la temperatura ambiental durante 1,5 horas para formar la N-[1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-N,N-dimetil-formamidina (7); hacer reaccionar (7) con TBDPSCI y piridina a la temperatura ambiente durante 6 horas para generar la N'-[5-(tert-butil-difenil-silaniloximetil)-3,4-dihidroxi-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-N,N-dimetil-formamidina (8); hacer reaccionar (8) con N-Boc-L-valina, DEC y DMAP en THF/DMF a temperatura ambiente
- 10 durante 2 días y someter el producto formado a partir de esta reacción a HPLC para generar el 2-tert-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 2-(tert-butil-difenil-silaniloxi-metil)-5-[4-(dimetilaminometilenamino)-2-oxo-2H-pirimidin-1-il]-4-hidroxi-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo (9a); someter a reflujo (9a) con NH_4F en MeOH durante aproximadamente 3 horas para retirar los grupos sililo y protectores de amino, y someter el producto a la purificación cromatográfica para generar el 2-tert-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo (10); y, finalmente, hacer reaccionar (10) con HCl en EtOAc a temperatura ambiente para generar la sal de dihidrocloruro de 2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo, (11) como producto final.

- La figura 6 se incluye aquí como ilustración de una vía alternativa conocida en la técnica anterior para preparar la β -D-2'-C-metil-citidina (6). Este procedimiento de la técnica anterior empleaba uracilo como material de partida y comprendía hacer reaccionar el uracilo y la BSA en acetonitrilo con la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa (4) durante aproximadamente 30 minutos, añadir el ácido de Lewis, SnCl_4 , en acetonitrilo, someter a reflujo la solución resultante durante aproximadamente 4 horas, y separar por cromatografía el producto, la 1-(3,4-dibenzoiloxi-5-benzoiloximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (12); hacer reaccionar (12) con NaOMe en metanol durante aproximadamente 4,5 horas para retirar los grupos benzoilo protectores, a continuación
- 30 aislar y cristalizar el producto, la 1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (13), también conocida como β -D-2'-C-metil-uridina; y, finalmente, hacer reaccionar (13) de forma secuencial con TMSCl y N-metilpirrolidina en CH_3CN durante aproximadamente 3,5 horas, enfriar y añadir anhídrido trifluoroacético (TFAA) durante unos 30 minutos, añadir 4-nitrofenol a 0 °C y agitar durante aproximadamente 3 horas, añadir NH_4OH en dioxano con calentamiento a 50 °C durante una noche, y separar el producto final, la β -D-2'-C-metil-citidina (6), mediante procedimientos cromatográficos y cristalización.

Esterificación de la β -D-2'-C-metil-citidina

La β -D-2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida que se obtiene de las etapas anteriores o bien por cualquier otro medio conocido en la técnica se puede esterificar por cualquier medio conocido en la técnica.

- 40 Una realización de la presente invención incluye el procedimiento para la síntesis del 3'-éster de la β -D-2'-C-metil-citidina, y en particular el éster 3'-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina, mediante el protocolo que viene a continuación.

- El éster en 3' de la β -D-2'-C-metil-citidina se puede preparar mediante la protección optativa de la amina de la β -D-2'-C-metil-citidina mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, como se enseña en Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. En una realización de la presente invención, la β -D-2'-C-metil-citidina se puede hacer reaccionar con $\text{Me}_2\text{NCH}(\text{OMe})_2$ en DMF para formar la N-[1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-N,N-dimetilformamidina.
- 45

- En una realización particular, el compuesto se puede proteger adicionalmente con TBDPSCI e imidazol para generar el compuesto protegido en 5' con sililo, la N'-[1-[5-(tert-butil-difenil-silaniloximetil)-3,4-dihidroxi-3-metil-tetrahydrofuran-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-N,N-dimetil-formamidina en cualquier solvente que sea adecuado para la temperatura y la solubilidad de los reactantes. Los solventes pueden consistir en cualquier solvente aprótico que incluye, pero sin limitarse a ellos, solventes alquílicos tales como hexano y ciclohexano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, diclorometano (DCM), dicloroetano, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida o cualquier combinación de los mismos, aunque preferiblemente la DCM.
- 50

- 55 La β -D-2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida puede entonces conjugarse con cualquier resto adecuado para obtener un 3'-profármaco farmacéuticamente aceptable de la β -D-2'-C-metil-citidina mediante cualquier medio conocido en la técnica, que incluye las reacciones de condensación estándares. El resto puede ser un fosfato (que incluye mono-, di- o trifosfato, y un fosfato estabilizado); alquilo de cadena lineal, ramificado o cíclico (incluidos los alquilo inferiores); acilo (incluidos los acilo inferiores); CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo,

CO-arilo sustituido, éster de sulfonato (que incluye alquil- o arilalquil-sulfonilo que incluye metanosulfonilo); bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes según se describe en la definición del arilo dada en la presente memoria; alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, lípido (que incluye un fosfolípido); aminoácido; glúcido; péptido; colesterol; o un grupo saliente farmacéuticamente aceptable que genera un hidroxilo (o fosfato) libre cuando se administra *in vivo*.

En una realización de la presente invención, el 3'-profármaco deseado es el éster 3'-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina y se prepara de acuerdo con el protocolo que viene a continuación.

El éster 3'-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina se puede preparar al hacer reaccionar una β -D-2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida (por ejemplo, una β -D-2'-C-metil-citidina protegida en N y en 5') con *N*-Boc-L-valina, opcionalmente en presencia de un agente de conjugación, tal como EDC, en presencia de una base, tal como la DMAP, para formar el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butarato de 2-(*tert*-butil-difenil-silaniloxi-metil)-5-[4-(dimetilamino-metilenamino)-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il]-4-hidroxi-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo.

El éster 3'-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina se puede preparar en cualquier solvente que sea adecuado para la temperatura y la solubilidad de los reactantes. Los solventes pueden consistir en cualquier solvente aprótico que incluye, pero sin limitarse a ellos, solventes alquílicos tales como hexano y ciclohexano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, diclorometano (DCM), dicloroetano, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida o cualquier combinación de los mismos, aunque preferiblemente el DCM.

Esta reacción se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que permita que la reacción prosiga a una velocidad aceptable sin favorecer la descomposición ni un exceso de productos secundarios. La temperatura preferida es aproximadamente la temperatura ambiente.

Posteriormente, el éster 3'-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina se puede desproteger mediante los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, tal y como se enseña en Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. En una realización particular de la invención, la L-valina N-protegida con BOC y 5'-OH-protegida con *t*-butildifenilsililo se puede desproteger con NH_4F en MeOH en presencia de aproximadamente 10 equivalentes mol de acetato de etilo (para impedir la escisión del éster 3'-O-valinílico por el amoníaco liberado) y someter a reflujo la mezcla para generar el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butarato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo.

El éster 3'-valinílico se puede convertir en una sal por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye hacer reaccionar el éster 3'-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina con HCl en EtOH para generar la sal de dihidrocloruro de 2-amino-3-metil-butarato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo como producto final.

Realizaciones preferidas

Una realización preferida de la presente invención se ejemplifica en la figura 1 y comprende hacer reaccionar la D-fructosa en presencia de CaO/agua a 23-40 °C durante 6 a 22 horas y, a continuación, añadir CO_2 y ácido oxálico a la mezcla de reacción y dejar que la reacción prosiga durante 8 a 12 horas para formar la 2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona (1); hacer reaccionar la 2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona (1) con la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y la trietilamina (TEA) en 1,2-dimetoxietano (DME) a una temperatura de aproximadamente 5 °C a 25 °C durante aproximadamente 30 minutos y, a continuación, enfriar la mezcla a aproximadamente 5 °C y añadir cloruro de benzoilo para generar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona (2); hacer reaccionar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona (2) con Red-Al/etanol en tolueno a una temperatura de aproximadamente -5 a 0 °C durante aproximadamente 40 minutos para generar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa (3); y, finalmente, añadir cloruro de benzoilo/TEA a una solución fría de la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa (3) en presencia de DMAP y DME, y dejar que la reacción prosiga de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas a una temperatura de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 °C, mediante lo cual se genera el producto final (4), la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa.

En concreto, se prepara una solución acuosa a temperatura ambiente de D-fructosa, y el CaO, preferiblemente a una proporción molar de 5:1, e incluso más preferiblemente a una proporción molar de 3:1, y lo más preferiblemente a una proporción molar de 2,3:1,3 con la D-fructosa, se añade incrementalmente durante un periodo de 5 minutos. Se deja que la reacción prosiga durante 6 a 22 horas a 23-40 °C con extracción periódica de alícuotas para el análisis por TLC.

Al concluir el tiempo de reacción, se burbujea CO_2 a través de la mezcla durante aproximadamente 2 a 3 horas para disminuir el pH desde un valor básico al neutro. Todo CaCO_3 que se forme como resultado de la etapa de neutralización se retira mediante filtración al vacío. Se combinan las capas acuosas, se tratan con ácido oxálico (u otro ácido orgánico) a una proporción molar de 1:2 con D-fructosa, y se agita a 25 °C durante aproximadamente 30 minutos hasta que aparece una suspensión viscosa blanca. A continuación, esta suspensión viscosa se agita durante una noche a 45-50 °C y se evapora a baja presión para retirar la mayor parte del agua mientras que sigue quedando una mezcla acuosa. A continuación se añaden NaCl y THF a la suspensión viscosa a temperatura

ambiente y se agita durante aproximadamente 30 minutos. Se separan las capas resultantes y a la capa acuosa se le añade THF nuevo y se agita durante 10 minutos más. El procedimiento de añadir THF, agitar y separar la capa acuosa resultante se repite 3 veces. Finalmente, todas las soluciones de THF se combinan y agitan con MgSO_4 anhidro durante 30 minutos, se filtra la mezcla, y la torta del filtro de MgSO_4 se lava con THF. El filtrado se evapora a baja presión, a aproximadamente 40 °C y se recoge el producto bruto como un semisólido naranja oscuro.

A continuación se añade acetona al producto bruto y se agita la mezcla a 20 °C durante 3 horas. El producto cristalino blanco de ribonolactona se recoge por filtración al vacío, se lava con acetona y se seca al vacío (véase la figura 1, compuesto 1, esquema 1). El rendimiento del producto de esta reacción es aproximadamente del 13,6%, un incremento de aproximadamente el 4% sobre el rendimiento del producto hallado en la técnica anterior.

- 10 El producto de ribonolactona obtenido se mezcla luego con DMAP a una proporción molar de aproximadamente 5:1 (ribonolactona:DMAP), con TEA en exceso, y con DME, y se agita durante aproximadamente 30 minutos a la temperatura ambiente. La suspensión resultante se enfría a 5 °C, y se añade cloruro de benzoilo a una proporción aproximada de 5:1 con la ribonolactona. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas, una vez que se haya confirmado por TLC que se ha consumido completamente el material de partida. A
- 15 continuación se añade agua helada a la mezcla de reacción y se agita durante aproximadamente 30 minutos, tras lo cual se recoge el producto bruto, se agita con *tert*-butilato de metilo, se filtra, se lava y se seca al vacío. El producto sólido blanco recogido es la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona con un rendimiento del 83,4% y una pureza de casi el 98% (véase la figura 1, compuesto 2).

- La 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribono- γ -lactona obtenida de la etapa anterior se enfría a aproximadamente -5 °C,
- 20 y se le ha añadido una solución de Red-Al en tolueno anhidro y etanol anhidro previamente mezclados a aproximadamente 0 °C. La proporción molar de Red-Al por 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico- γ -lactona es aproximadamente de 2:1. La mezcla se agita durante aproximadamente 40 minutos mientras se mantiene a una temperatura estable de aproximadamente -5 °C. Se retiran alícuotas de la mezcla y se analizan por TLC y/o HPLC para confirmar que se consumió el material de partida, tras lo cual la reacción se para con acetona, agua y HCl a 1
- 25 N, y se lleva a la temperatura ambiente. Finalmente, se extrae la mezcla con acetato de etilo, se lava con una disolución salina, se seca, y el solvente se retira a presión a aproximadamente 40 °C. El producto resultante, la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribofuranosa, se obtiene con un rendimiento cuantitativo de la cantidad de la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribono- γ -lactona utilizada al comienzo de esta etapa (véase la figura 1, compuesto 3).

- El grupo protector en C-1 de la ribofuranosa se fabrica en la etapa inmediatamente precedente. Se añade cloruro de benzoilo a aproximadamente una proporción molar de 2:1 a una solución de la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribofuranosa que está a 5 °C, junto con DMAP y TEA en DME anhidro. La reacción se agita y se deja proseguir durante una noche, tras lo cual se para con agua helada y una solución acuosa de carbonato de sodio. A
- 30 continuación se retira el THF y la mezcla se extrae con acetato de etilo. El lavado, el secado y la retirada del solvente generan un producto oleoso espeso. A lo último se le ha añadido *tert*-butilato de metilo, heptano y agua, y se agita durante aproximadamente 2 horas a unos 20 °C. El producto final, la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa, se obtiene con un rendimiento del 52% y con una pureza de más del 98%, después de lavarlo y secarlo al vacío (véase la figura 1, compuesto 4, esquema 1).

- Otra realización preferida de la presente invención se ejemplifica en la figura 4, y comprende hacer reaccionar citosina, BSA y SnCl_4 /acetonitrilo con la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa (4) de la primera
- 40 realización de la invención para generar la 4-amino-1-(3,4-dibenzoiloxi-5-benzoiloximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona (5); y hacer reaccionar (5) con NaOMe/MeOH para generar la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-C-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona (6), también conocida como β -D-2'-C-metil-citidina. El uso de la citosina como material de partida en vez de la benzoil-citosina mejora la «economía atómica» del procedimiento y simplifica la purificación en las etapas posteriores.

- 45 La síntesis se puede terminar con la formación de (6) y el producto se puede aislar mediante las etapas conocidas por los expertos en la técnica. Otra posibilidad es que la síntesis se puede llevar a cabo además para preparar el éster 3'-O-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina (2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-4-C-metil-2-hidroximetil-tetrahydro-furan-3-ilo) o su forma de sal de hidrocloreuro preferida, la cuarta realización preferida de la invención.

- 50 En otra realización preferida de la presente invención, el compuesto (6) se hace reaccionar con $\text{Me}_2\text{NCH(OMe)}_2$ en DMF para formar (7), la *N*-[1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetilformamida, que es la forma amino-prottegida de (6); se hace reaccionar (7) con el TBDPSCI e imidazol en DCM para generar la forma de (7) protegida en 5' con sililo como la *N*'-[1-[5-(*tert*-butil-difenil-silaniloximetil)-3,4-dihidroxi-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetil-formamida (8), en donde el uso
- 55 del DCM proporciona la ventaja de tener un mayor control sobre la formación del subproducto disililado; hacer reaccionar (8) con *N*-Boc-L-valina, EDC y DMAP en DCM a la temperatura ambiente para formar el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 2-(*tert*-butil-difenil-silaniloxi-metil)-5-[4-(dimetilamino-metilenamino)-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il]-4-hidroxi-4-metil-tetrahydro-furan-3-ilo (9); retirar los grupos sililo y aminoprotectores al hacer reaccionar (9) con NH_4F en MeOH en presencia de aproximadamente 10 equivalentes mol de acetato de etilo para impedir la
- 60 escisión del éster 3'-O-valinílico por el amoníaco liberado, y someter la mezcla a reflujo para generar el 2-*tert*-

butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (10); y, finalmente, hacer reaccionar (10) con HCl en EtOH para generar la sal de dihidrocloruro de 2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (11) como producto final.

- 5 Esta invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos de trabajo contenidos en la presente memoria se presentan para ayudar a entender la invención. Son ilustrativos del procedimiento o procedimientos y del producto o productos de la invención, pero no pretenden y no debe interpretarse de ningún modo como que limitan la invención descrita en las reivindicaciones que vienen después.
- 10 Los solventes, reactantes o condiciones de reacción equivalentes, similares o adecuados se pueden sustituir por los solventes, reactantes y/o condiciones de reacción particulares descritos en la presente memoria sin alejarse del espíritu ni del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

2-C-Metil-D-ribónico-γ-lactona

- 15 Se agitó agua desionizada (100 ml) en un matraz de 250 ml de fondo redondo y con 3 cuellos, equipado con un agitador superior, un eje para agitación, un dispositivo digital de lectura de temperatura y una línea de argón. El argón se burbujeó en agua durante 30 minutos, se añadió la D-fructosa (20,0 g, 0,111 mol) y la solución se volvió transparente en unos pocos minutos. Se añadió óxido de calcio (12,5 g, 0,223 mol) en porciones durante un periodo de 5 minutos y la mezcla se agitó vigorosamente. Se observó una exotermia y la temperatura de la reacción alcanzó
- 20 los 39,6 °C a los 10 minutos de comenzar la adición del óxido de calcio. Después de aproximadamente 15 minutos, la mezcla de la reacción reveló un color amarillo que se intensificó con el tiempo. Al cabo de 3 horas se extrajo una alícuota para el análisis por TLC. La alícuota se acidificó a pH 2 con una solución acuosa saturada de ácido oxálico. La suspensión blanca resultante se evaporó a baja presión para retirar el agua. Se añadió tolueno (2 ml) al residuo y la mezcla se evaporó a baja presión (a 45-50 °C) para retirar cualquier vestigio de agua. El sólido residual se reconstituyó en 2 ml de una mezcla de tetrahidrofurano:metanol a 1:1. Después de mezclar exhaustivamente, se dejó reposar la suspensión y la solución transparente del sobrenadante se depositó para TLC (la placa de sílice se reveló en metanol al 2% en acetato de etilo y se tiñó por inmersión en permanganato de potasio alcalino al 1%. A continuación se calentó la placa mediante una pistola de calor hasta que aparecieron manchas amarillentas sobre el fondo rosado). La lactona deseada aparece típicamente a un valor de R_f de 0,33 en las condiciones anteriores. Se
- 25 detectan más subproductos polares y material sin reaccionar en el intervalo del valor de R_f de 0,0 a 0,2.

- Aunque la formación del producto se observó al cabo de 3 horas, se dejó que la reacción prosiguiese durante 22 horas, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se agitó a 25 °C. Al final de este periodo, el pH de la mezcla era de 13,06. Se burbujeó dióxido de carbono gaseoso en la mezcla de reacción durante aproximadamente 2,5 horas (el pH era 7,25). Se retiró el carbonato de calcio sólido que se formó mediante filtración al vacío, y se lavó la torta del
- 35 filtro con 50 ml de agua desionizada. Las capas acuosas se combinaron y se trataron con ácido oxálico (5,0 g, 0,056 mol) y la mezcla se agitó vigorosamente a 25 °C durante 30 minutos (el color oscuro inicial desapareció en gran parte y la mezcla volvió a ser una suspensión viscosa blanca de aspecto lechoso). El pH de la mezcla en esta etapa es típicamente de 2-3. La suspensión viscosa se agitó a 45-50 °C durante una noche. A continuación se evaporó la mezcla a baja presión y a 45-50 °C para retirar 75 ml de agua. Se añadió cloruro de sodio (30 g) y tetrahidrofurano
- 40 (100 ml) a la suspensión viscosa acuosa (aproximadamente 75 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente a 25 °C durante 30 minutos. Las capas se separaron y la capa acuosa se agitó durante 10 minutos con 75 ml de tetrahidrofurano nuevo. Este procedimiento se repitió tres veces y las soluciones de tetrahidrofurano se combinaron y agitaron con 10 g de sulfato de magnesio anhidro durante 30 minutos. La mezcla se filtró y la torta del filtro de sulfato de magnesio se lavó con 60 ml de tetrahidrofurano. El filtrado se evaporó a baja presión y a 40 °C para dar
- 45 10,86 g de producto bruto como un semisólido anaranjado oscuro (para escalarlo, el tetrahidrofurano se reemplazará por acetona en vez de la evaporación del producto bruto hasta secarlo). El producto bruto se agitó con acetona (20 ml) a 20 °C durante 3 horas. El producto se recogió por filtración al vacío y la torta del filtro se lavó con 12 ml de acetona para dar el producto deseado 1 como un sólido cristalino blanco. El producto se secó al vacío para dar 2,45 g (rendimiento del 13,6%). Punto de fusión del compuesto 1: 158-162 °C (punto de fusión en la bibliografía: 160-161 °C). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ ppm 5,69 (s, 1H, intercambio con D_2O), 5,41 (d, 1H, intercambio con D_2O), 5,00 (t, 1H, intercambio con D_2O), 4,15 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,52 (m, 1H), 1,22 (s, 3H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ ppm 176,44, 82,95, 72,17, 72,02, 59,63, 20,95. ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$: calculados: C, 44,45; H, 6,22. Encontrado: C, 44,34; H, 6,30).
- 50

Ejemplo 2

2,3,5-Tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona

- 55 Una mezcla de la lactona 1 (3,0 g, 18,50 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0,45 g, 3,72 mmol) y trietilamina (25,27 g, 249,72 mmol) en 1,2-dimetoxietano (50 ml) se agitó a 25 °C en una atmósfera de argón durante 30 minutos. Esta suspensión blanca se enfrió a 5 °C y se le añadió cloruro de benzoilo (11,7 g, 83,23 mmol) durante un periodo de 15 minutos. La mezcla se agitó a 25 °C durante dos horas. El análisis por TLC (sílice, metanol al 2% en acetato de etilo)

indicó un consumo completo del material de partida. Se añadió agua enfriada en hielo (100 g) a la mezcla de reacción y se continuó agitándola durante 30 minutos. Los sólidos blancos que se formaron se recogieron por filtración al vacío y la torta del filtro se lavó con agua fría (50 ml). Este producto bruto se agitó con éter *tert*-butil-metilico (60 ml) a 20 °C durante 30 minutos, a continuación se filtró, la torta del filtro se lavó con éter *tert*-butil-metilico (25 ml) y se secó al vacío para dar 7,33 g (rendimiento del 83,4%) del compuesto 2 como un sólido blanco con una pureza del 97,74% (HPLC/AUC). Punto de fusión del compuesto 2: 137-140 °C (punto de fusión en la bibliografía: 141-142 °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 8,04 (d, 2H), 7,92 (d, 2H), 7,73 (d, 2H), 7,59 (t, 1H), 7,45 (m, 4H), 7,32 (t, 2H), 7,17 (t, 2H), 5,51 (d, 1H), 5,17 (m, 1H), 4,82-4,66 (d de un cuarteto AB, 2H), 1,95 (s, 3H). RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm 172,87, 166,17, 166,08, 165,58, 134,06, 133,91, 133,72, 130,09, 129,85, 129,80, 129,37, 128,78, 128,60, 128,49, 127,96, 127,89, 79,67, 75,49, 72,60, 63,29, 23,80. TOF MS ES+ (M + 1: 475).

Ejemplo 3

2,3,5-Tri-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa

Una solución de Red-Al (65 % en peso en tolueno, 2,0 ml, 6,56 mmol) en tolueno anhidro (2,0 ml) se agitó a 0 °C en una atmósfera de argón. Se añadió una solución de etanol anhidro (0,38 ml, 6,56 mmol) en tolueno anhidro (1,6 ml) a la solución de tolueno durante un periodo de cinco minutos. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 15 minutos y se le añadieron 2 ml (2,18 mmol) de este reactante Red-Al/etanol a una solución fría (-5 °C) de la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribonolactona 2 (475 mg, 1,0 mmol) en tolueno anhidro (10 ml) durante un periodo de 10 minutos. La mezcla de la reacción se agitó a -5 °C durante 40 minutos. El análisis por TLC (placas de sílice, acetato de etilo al 35% en heptano) indicó que el material de partida se había consumido completamente. El análisis por HPLC indicó que quedaba sólo el 0,1% del material de partida. La reacción se paró con acetona (0,2 ml), agua (15 ml) y HCl a 1 N (15 ml) a 0 °C y se dejó atemperar a la temperatura ambiente. Se añadió HCl a 1 N (5 ml) para disolver las sales inorgánicas (pH: 2-3). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml) y la solución orgánica se lavó con solución salina (25 ml), se secó (sulfato de sodio anhidro, 10 g) y el solvente se retiró a baja presión y a una temperatura de 40 °C para dar el producto deseado 3 con rendimiento cuantitativo (480 mg). Este material se utilizó tal cual para la etapa siguiente.

Ejemplo 4

1,2,3,5-Tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa

Se añadió cloruro de benzoilo (283 mg, 2,0 mmol) durante un periodo de cinco minutos a una solución fría (5 °C) del compuesto 3 (480 mg, 1,0 mmol), 4-dimetilaminopiridina (12,3 mg, 0,1 mmol) y trietilamina (506 mg, 5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente y en una atmósfera de argón durante una noche. El análisis por HPLC indicó que un 0,25% del material de partida quedó sin reaccionar. La reacción se paró con la adición de agua enfriada en hielo (10 g) y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se retiró el tetrahidrofurano a baja presión y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (50 ml). La solución orgánica se lavó con agua (25 ml), solución salina (25 ml), se secó (sulfato de sodio anhidro, 12 g) y el solvente se retiró a baja presión para dar 650 mg de producto oleoso y espeso. Este producto bruto se agitó con 5 ml de éter *tert*-butil-metilico durante 5 minutos y se le añadieron heptano (5 ml) y agua (0,1 ml) y se prosiguió agitándola durante otro periodo más de dos horas a 20 °C. Se recogieron los sólidos por filtración al vacío y la torta del filtro se lavó con una solución de heptano:éter *tert*-butil-metilico a 1:1 (6 ml) y éter *tert*-butil-metilico (2 ml). El secado del sólido al vacío dio 300 mg (52 %) del producto deseado 4 (pureza del 98,43% por HPLC/AUC) como un sólido blanco que se fundía a 154-156,3 °C (punto de fusión en la bibliografía: 155-156 °C). RMN ¹N (CDCl₃) δ ppm 8,13 (m, 4H), 8,07 (d, 2H), 7,89 (d, 2H), 7,63 (m, 3H), 7,48 (m, 6H), 7,15 (m, 3H), 7,06 (s, 1H), 5,86 (dd, 1H), 4,79 (m, 1H), 4,70-4,52 (d de un cuarteto AB, 2H), 1,95 (s, 3H). RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm 166,31, 165,83, 165,01, 164,77, 134,01, 133,86, 133,70, 133,17, 130,44, 130,13, 129,97, 129,81, 129,59, 129,39, 129,07, 128,84, 128,76, 128,37, 98,01, 86,87, 78,77, 76,35, 64,05, 17,07. (C₃₄H₂₈O₉: C calculado, C, 70,34; H, 4,86. Encontrado: C, 70,20; H, 4,95).

Ejemplo 5

4-Amino-1-(3,4-dibenciloxi-5-benciloximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (compuesto 2, figura 4)

Se suspendió citosina (89 g, 0,80 mol) en acetonitrilo (900 ml) en un matraz de fondo redondo de 12 l equipado con un condensador de reflujo, un agitador superior y un adaptador para la entrada de argón. La suspensión se agitó a 20 °C en una atmósfera de argón y se le añadió *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (537 ml, 2,2 mol) en una porción. La solución restante se calentó a 80 °C y se agitó durante una hora más a la misma temperatura. Se suspendió la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa (425,0 g, 0,73 mol) en acetonitrilo (4000 ml) y se añadió a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se volvió transparente al cabo de unos pocos minutos y la temperatura cayó a aproximadamente 50 °C. Se añadió cloruro de estaño(IV) (154 ml, 1,31 mol) durante un periodo de 15 minutos y se prosiguió agitándola a 80 °C. Al cabo de una hora se paró una alícuota de la mezcla de reacción por la adición de una solución acuosa de bicarbonato de sodio y la extracción de la capa acuosa con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se examinó por TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 20% en heptano, R_f para el derivado glucídico: 0,40). El análisis por TLC indicó que se había consumido todo el derivado glucídico. El producto deseado se detectó por TLC con metanol al 10% en diclorometano (R_f: 0,37). La reacción también se verificó por HPLC

(procedimiento n.º 2). La mezcla de reacción se enfrió a 20 °C y se paró al añadirle una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (3000 ml) durante un periodo de 30 minutos (se observó que se liberaba cuando se añadían los primeros mililitros de la solución de bicarbonato de sodio). El bicarbonato de sodio sólido (1350 g) se añadió en porciones para evitar la formación de espuma. Se verificó el pH de la muestra para asegurarse de que era ≥ 7 . Se paró la agitación y se dejó que las capas se separaran durante 20 minutos. La capa acuosa se drenó y se agitó con acetato de etilo (1500 ml) y se dejó que la mezcla se separara (30 minutos). La capa orgánica se aisló y se combinó con la solución de acetonitrilo. La solución orgánica se lavó con solución salina (500 ml) y, a continuación, el solvente se retiró para dejar un volumen de aproximadamente 750 ml. El producto se puede usar tal cual en la reacción posterior. Además, también se puede ir eliminando hasta dejar un sólido espumoso blanco, con un rendimiento cuantitativo. La estructura del compuesto (2) se confirmó mediante análisis por RMN ^1H .

Ejemplo 6

4-Amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2-ona (compuesto 3)

Se añadió metóxido de sodio (13,8 g, 0,26 mol) a una solución del compuesto (2) (416 g, 0,73 mol) en metanol (2000 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se siguió por TLC (gel de sílice, metanol al 10% en diclorometano, R_f del compuesto 1: 0,53) y (gel de sílice, metanol al 30% en diclorometano, R_f del compuesto 3: 0,21). El producto comenzó a precipitarse al cabo de 30 minutos y la TLC indicó que la reacción se había completado al cabo de 2 horas. La reacción también se siguió por HPLC (procedimiento n.º 2). El metanol se retiró a baja presión hasta un volumen de aproximadamente 500 ml cazado con etanol (2 x 500 ml) hasta un volumen de aproximadamente 500 ml. La suspensión viscosa espesa residual se diluyó con 750 ml de etanol y la mezcla de agitó a 20 °C durante una hora. Se recogió el producto por filtración, se lavó la torta del filtro con etanol (100 ml) y éter *tert*-butil-metilico (100 ml) y se secó para dar 168 g (rendimiento del 90% durante las dos etapas) del producto (3) con una pureza de $> 97\%$ (HPLC/AUC). El producto también se analizó mediante RMN ^1H y ^{13}C .

Ejemplo 7

N-[1-(3,4-Dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidina-4-il]-*N,N*-dimetil-formamida (compuesto 4)

A una suspensión del compuesto 3 (19 g, 0,0738 mol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (150 ml) se le añadió dimetilacetato de *N,N*-dimetilformamida (98 ml, 0,7385 mol) y la mezcla se agitó a 20-22 °C. Al cabo de una hora, la TLC (gel de sílice, metanol al 30% en diclorometano, la R_f para el compuesto 3 es 0,21 y para el producto 4 es 0,55) indicó que la reacción se había completado. El solvente y el reactante se retiraron a baja presión (la temperatura se mantuvo por debajo de 40 °C). Se añadió etanol (50 ml) al residuo oleoso obtenido y se retiró el solvente a baja presión. Este procedimiento se repitió dos veces y se solidificó el producto bruto. El producto bruto se agitó con 190 ml de etanol a 20 °C durante una hora y se mantuvo a 5 °C durante 12 horas. Se recogieron los sólidos por filtración y la torta del filtro se lavó con 30 ml de etanol frío y 30 ml de éter *tert*-butil-metilico frío. Al secar el sólido al vacío se obtuvieron 14,7 g (64%) del compuesto (4) como una primera cosecha. La TLC (gel de sílice, metanol al 30% en diclorometano, la R_f para el producto (4) era 0,55) y (gel de sílice, metanol al 10% en diclorometano, la R_f para el producto (4) era 0,1) mostró sólo una única mancha para el compuesto (4). El agua madre de la purificación desde el etanol se evaporó hasta secarla y el residuo se agitó con etanol (80 ml) a 20 °C durante una hora y se mantuvo a 5 °C durante 12 horas. Se recogieron los sólidos por filtración y la torta del filtro se lavó con 15 ml de etanol frío y 15 ml de éter *tert*-butil-metilico frío. Después de secar el sólido al vacío, se obtuvieron 3,5 g (15 %) como segunda cosecha. La TLC (gel de sílice, metanol al 30% en diclorometano, la R_f para el producto (4) era 0,55) y (gel de sílice, metanol al 10% en diclorometano, la R_f para el producto (4) era 0,1) mostró sólo una única mancha para el compuesto (4); punto de fusión: 201-209 °C; RMN ^1H (DMSO- d_6) δ ppm 8,62 (s, 1H, N=CH), 8,17 (d, 1H, H-6, $J_{5-6} = 7,3$ Hz), 5,91 (m, 2H, H-1', H-5), 5,16 (t, 1H, OH-5', D $_2$ O intercambiable), 5,06 (s, 1H, OH-2', D $_2$ O intercambiable), 3,8-3,5 (m, 4H, H-3', H-4', H-5' y H-5''), 3,15 y 3,02 (2s, 6H, N(CH $_3$) $_2$), 0,92 (s, 3H, CH $_3$); FAB > 0 (GT) 625 (2M + H) $^+$, 313 (M + H) $^+$, 167 (B + 2H) $^+$; FAB < 0 , (GT) m/z 419 (M + T - H) $^+$, 403 (M + G - H) $^+$, 311 (M - H) $^+$, 165 (B) $^+$.

Ejemplo 8

N-[1-[5-(*tert*-Butil-difenil-silaniloximetil)-3,4-dihidroxi-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetil-formamida (compuesto 5)

El compuesto (4) (42,9 g, 0,137 mol) se dispersó en diclorometano anhidro (200 ml) con un agitador superior durante 30 min. A continuación la mezcla se evaporó con el rotavapor (a aproximadamente 30 °C) hasta la secarla. El compuesto secado (4), el imidazol (37,4 g, 0,55 mol) y el diclorometano anhidro (800 ml) se cargaron en un matraz con fondo redondo de 2 l con 4 cuellos en argón y se transfirió el *tert*-butildifenilclorosilano (43,1 g, 0,156 mol, la cantidad total añadida en varias porciones) a un embudo de adición unido al matraz de la reacción. La mezcla de reacción se enfrió a 10 °C y se le añadió *tert*-butildifenilclorosilano (13,74 g, 0,05 mol) desde el embudo de adición durante un periodo de 20 min mientras se mantenía la temperatura de reacción entre 10 a 12 °C mientras se agitaba. La reacción se verificó por HPLC (procedimiento n.º 2). Después de 1,5 horas, se añadió una segunda porción de *tert*-butildifenilclorosilano (14,76 g, 0,053 mol) durante un periodo de 20 min mientras se mantenía la temperatura de reacción entre 10 y 12 °C. Después de una hora más, lo que quedaba de *tert*-butildifenilclorosilano (14,8 g, 0,053

mol) se añadió durante un intervalo de 20 mientras se mantenía la temperatura de reacción entre 10 y 12 °C. A continuación se agitó a 12-15 °C durante 1,5 horas más. La HPLC indicó que había un 95,40% del producto, un 3,00% de derivado bi-sililo, y que no quedaba ningún material de partida sin reaccionar. Se paró la reacción por la adición de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (150 ml) con agitación durante 15 min a

- 5 aproximadamente 15 °C (el pH era aproximadamente 8). Se separaron las capas acuosa y de diclorometano. La capa de diclorometano se lavó con agua (2 x 150 ml) y solución salina (1 x 200 ml), y se secó sobre sulfato de sodio anhidro (60,0 g, 30 min). Después se filtró y el solvente se retiró a baja presión. El sólido espumoso residual se utilizó tal cual en la reacción siguiente.

Ejemplo 9

- 10 2-*tert*-Butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 2-(*tert*-butil-difenil-silaniloximetil)-5-[4-(dimetilamino-metilenamino)-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il]-4-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (compuesto 6)

Se agitó a 25 °C en una atmósfera de argón una solución del compuesto (5) (58 g, 0,1053 mol) en diclorometano (500 ml). Se le añadieron *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-valina (29,7 g, 0,1367 mol), hidrocloreuro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (26,2 g, 0,1367 mol) y 4-(dimetilamino)piridina (1,3 g, 0,0106 mol), y se agitó

- 15 la mezcla de reacción a 25 °C y se siguió por HPLC (procedimiento n.º 2). Al cabo de 4 horas, la HPLC mostró un 7,9% del material de partida. Se le añadieron *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-valina (4,57 g, 0,0210 mol) e hidrocloreuro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (4,03 g, 0,0210 mol) y se continuó agitando a 25 °C durante un tiempo adicional de 2 horas, tras lo cual la HPLC detectó el 0,7% del material de partida. Se añadió metanol (60 ml) a la mezcla de reacción y los solventes se evaporaron a baja presión (la temperatura se mantuvo por debajo de 40 °C)
- 20 para dar el compuesto (6) como un aceite espeso. Este material (puro al 93% por HPLC/AUC) se utilizó tal cual para la reacción siguiente.

Ejemplo 10

2-*tert*-Butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (compuesto 7)

- 25 El compuesto (6) (0,3 mol), MeOH (1650 ml) y EtOAc (265 g, 3,0 mol) se cargaron en un matraz con fondo redondo de 3 l con 5 cuellos y se agitó la mezcla para disolver el compuesto (6). Se le añadió fluoruro de amonio (45,0 g, 1,21 mol) y la mezcla se agitó con reflujo a 64,5 °C durante 4 horas. Se completó la reacción al cabo 4 horas según indicó la HPLC (procedimiento n.º 2). Los solventes se retiraron entonces a baja presión a 40-45 °C y se cazó con EtOAc (300 ml). La espuma residual se combinó con EtOAc (400 ml), agua (600 ml) y éter *tert*-butil-metilico (300 ml),
- 30 y la mezcla se trituró a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Los sólidos blancos que se separaron se recogieron por filtración, y se lavaron con agua (200 ml), EtOAc/éter *tert*-butil-metilico (120 ml) a 1:1 y éter *tert*-butil-metilico (120 ml). A continuación se secó el sólido al vacío durante más de 20 horas para generar el compuesto (7) como un sólido blanco. Rendimiento 71,54 g, 52% para las tres etapas. El compuesto (7) se obtuvo con una pureza del 99,08% (HPLC, procedimiento n.º 3). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 7,99 (d, 1H, *H*-6, *J*₆₋₅ = 7,42 Hz), 7,3-7,1 (m, 3H, *CH*
- 35 y *NH*₂, D₂O intercambiable), 5,9 (s, 1H, *H*-1'), 5,75 (d, 1H, *H*-5, *J*₆₋₅ = 7,43 Hz), 5,43 (s, 1H, *OH*-2', D₂O intercambiable), 5,24 (t, 1H, *OH*-5'), 5,04 (d, 1H, *H*-3', *J*_{3'-4'} = 9,1 Hz), 4,1-4,0 (m, 2H, *H*-4', *CH*), 3,8-3,4 (2 m, 2H, *H*-5', *H*-5''), 2,2-2,0 (m, 1H, *CH*), 1,40 (s, 9H, (*CH*₃)₃C), 1,0 (s, 3H, *CH*₃), 0,9-0,8 (m, 6H, (*CH*₃)₂CH); FAB < 0, (GT) m/e 911 (2*M*-H)⁺, 455 (M - H)⁺, 256 (M-Boc-Val)⁺, 216 (BocValOH)⁺, 110 (B)⁺; FAB > 0 (GT) 913 (2*M* + H)⁺, 457 (M + H)⁺, 112 (B + 2H)⁺, 57 (CH₃)C⁺; FAB < 0 (GT) 911 (2*M* - H)⁺, 455 (M - H)⁺, 256 (M-Boc-Val)⁺, 216 (BocVal)⁺, 110 (B)⁺.

- 40 Ejemplo 11

2-Amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (sal de dihidrocloreuro) (compuesto 8)

Una solución del compuesto 7 (21,0 g, 0,046 mol) en etanol (168 ml) se agitó en un matraz con fondo redondo equipado con un agitador superior, sonda de temperatura, línea de argón y burbujeador de cloruro de hidrógeno

- 45 gaseoso. Se burbujó el cloruro de hidrógeno gaseoso (22 g) en la solución transparente durante un periodo de una hora. La temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 30 °C con un baño de agua helada. La formación del sólido comenzó a los pocos minutos de introducir el cloruro de hidrógeno gaseoso. Al cabo de 4 horas, la HPLC (procedimiento n.º 3) mostró que sólo quedaba el 0,8% de material de partida. Se recogieron los sólidos por filtración y la torta del filtro se lavó con etanol (20 ml) y éter dietílico (100 ml). Después de secar el producto al vacío durante
- 50 16 horas se obtuvieron 19,06 g (96,5%) del producto (8) con una pureza del 97,26% (HPLC, procedimiento n.º 3); punto de fusión: 210 °C (pardo), 248-250 °C (fundido); RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 10,0 (s, 1H, 1/2*NH*₂, D₂O intercambiable), 8,9-8,6 (2 br s, 4H, 1/2*NH*₂, *NH*₃, D₂O intercambiable), 8,42 (d, 1H, *H*-6, *J*₅₋₆ = 7,9 Hz), 6,24 (d, 1H, *H*-5, *J*₅₋₆ = 7,9 Hz), 5,84 (s, 1H, *H*-1'), 5,12 (d, 1H, *H*-3', *J*_{3'-4'} = 8,8 Hz), 4,22 (d, 1H, *H*-4, *J*_{3'-4'} = 8,7 Hz), 4,0-3,9 (m, 1H, *CH*), 3,8-3,5 (m, 2H, *H*-5', *H*-5''), 2,3 - 2,1 (m, 1H, *CH*), 1,16 (s, 3H, *CH*₃), 1,0 (m, 6H, (*CH*₃)₂CH); FAB > 0 (GT)
- 55 713 (2*M* + H)⁺, 449 (M + G + H)⁺, 357 (M + H)⁺, 246 (S)⁺, 112 (B + 2H)⁺; FAB < 0 (GT) 747 (2*M* + Cl)⁺, 483 (M + G + Cl)⁺, 391 (M + Cl)⁺, 355 (M - H)⁺, 116 (Val)⁺, 110 (B)⁺, 35 (Cl)⁺.

Ejemplo 12

Procedimientos de análisis por HPLC

- Todos los procedimientos descritos utilizan una columna de fase inversa; n.º de parte de Waters® WAT086344; Nova-Pak® C18, el tamaño del poro es de 60 Å, el tamaño de las partículas es de 4 µm, 3,9 x 150 mm. Todos los
- 5 cromatogramas se generaron con una HPLC de Waters® 2695 y un detector 996 PDA. Fase móvil: el acetonitrilo y el agua de calidad para HPLC se compraron a JT Baker y la solución 1 M de acetato de trietilamonio se compró a Fluka®.

Procedimiento n.º 1: análisis del compuesto 4, figura 4:

Velocidad de flujo: 1,00 ml/min del gradiente lineal de acetonitrilo/agua tal y como se describe más adelante.

- 10 El sistema se equilibra durante un equilibrado de cinco minutos entre ejecuciones.

Longitud de onda: 254 nm.

Tiempo de retención para el compuesto 4 = 12,8 minutos.

Tiempo	% de acetonitrilo	% de agua
0,00	40,0	60,0
1,00	40,0	60,0
13,0	95,0	5,0
15,0	95,0	5,0

Procedimiento n.º 2: análisis de los compuestos 2, 4, 5, 6 y 7, figura 4:

- 15 Velocidad de flujo; 1,00 ml/min de un gradiente de acetonitrilo/tampón de acetato de trietilamonio acuoso a 20 mM según se describe a continuación.

El sistema se equilibra durante cinco minutos entre ejecuciones.

Longitud de onda: 320 y 272 nm.

Tiempo	% de acetonitrilo	% de tampón
0,00	0,00	100,0
15,00	80,0	20,0
30,00	80,0	20,0

- 20 Tabla comparativa: Compuestos frente a tiempos de retención, procedimiento n.º 2:

Compuesto	Tiempo de retención (en minutos), longitud de onda
1	18,2, 272 nm
2	13,4, 272 nm
3	2,9, 272 nm
Benzoato de metilo	11, 272 nm
Compuesto 3 parcialmente protegido	7,2, 272 nm
Compuesto 3 parcialmente protegido	10,0, 272 nm
4	4,0, 320 nm
5	13,2, 320 nm
Compuesto 5 di-sililado	16,6, 320 nm
6	17,8, 320 nm

DMAP	3,7 (pico ancho), 272 nm
7	8,3, 272 nm
6 parcialmente desprotegido	16,3, 272 nm

Procedimiento n.º 3: análisis de los compuestos 3, 7 y 8, figura 4:

Velocidad de flujo: 1,00 ml/min de un gradiente de acetonitrilo/tampón de acetato de trietilamonio acuoso a 20 mM según se describe a continuación.

- 5 El sistema se equilibra durante el equilibrado de cinco minutos entre ejecuciones.

Longitud de onda: 272 nm.

Tiempo	% de acetonitrilo	% del tampón
0,00	0,00	100,0
30,0	50,0	50,0

Tabla comparativa: compuestos frente a tiempos de retención, procedimiento n.º 3:

Compuesto	Tiempo de retención (en minutos)
7	18,4
8	8,5
3	3,6

- 10 Procedimientos de la técnica anterior

Ejemplo 13

Preparación de la N^4 -[(dimetilamino)metilen]- β -D-2'-C-metil-citidina (4):

- Una solución de β -D-2'-C-metil-citidina (3) (1,65 g, 6,43 mmol) en DMF (32 ml) se trató con dimetilacetato de *N,N*-dimetilformamida (8,2 ml, 61,73 mmol) y se agitó durante aproximadamente 1,5 horas a temperatura ambiente. La solución se evaporó a baja presión y se coevaporó con etanol. La cristalización desde etanol/éter produjo un compuesto desconocido hasta entonces, el compuesto (4) (primera cosecha de 1,21 g, rendimiento del 60%, y segunda cosecha ligeramente impura de 0,46 g, rendimiento del 23%) como cristales. Las siguientes características fisicoquímicas se han determinado con el envío de los cristales de la cristalización de la primera cosecha. $F = 201-209^\circ\text{C}$; RMN ^1H (DMSO- d_6) δ ppm 8,62 (s, 1H, N = CH), 8,17 (D, 1H, H-6, $J_{5-6} = 7,3$ Hz), 5,91 (m, 2H, H-1', H-5), 5,16 (t, 1H, OH-5', D $_2$ O intercambiable), 5,06 (s, 1H, OH-2', D $_2$ O intercambiable), 3,8-3,5 (m, 4H, H-3', H-4', H-5' y H-5''), 3,15 y 3,02 (2s, 6H, N(CH $_3$) $_2$), 0,92 (s, 3H, CH $_3$); FAB > 0 (GT) 625 (2M + H) $^+$, 313 (M + H) $^+$, 167 (B + 2H) $^+$; FAB < 0 , (GT) m/z 419 (M + T - H) $^-$, 403 (M + G - H) $^-$, 311 (M - H) $^-$, 165 (B) $^-$; HPLC a temperatura ambiente durante 5,96 min (gradiente de CH $_3$ N del 0 al 50% en tampón de acetato de trietilamonio a 20 mM programado durante un periodo de 30 min con una velocidad de flujo de 1 ml/min), $\lambda_{\text{max}} = 316,1$ nm.

- 25 Ejemplo 14

Preparación de N^4 -[(dimetilamino)metilen]-5'-O-*tert*-butildifenilsilil- β -D-2'-C-metil-citidina (5):

- A una solución del compuesto (4) (1,167 g, 3,73 mmol) en piridina desecada (15 ml) se le añadieron, sucesivamente, imidazol (760 mg, 11,19 mmol) y *tert*-butildifenilclorosilano (0,66 ml, 2,53 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente. Al cabo de 4 horas, la mezcla de reacción se recargó con *tert*-butildifenilclorosilano (0,40 ml, 2,28 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la extracción con bicarbonato de sodio, la capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a baja presión. La mezcla bruta se recogió en una mezcla de acetonitrilo desecado (30 ml) y dimetilformamida desecada (15 ml).

Ejemplo 15

- Preparación del éster 3'-O-L-*N*-(*tert*-butoxicarbonil)valínico de la N^4 -[(dimetilamino)metilen]-5'-O-*tert*-butildifenilsilil- β -D-2'-C-metil-citidina (6):

A una solución del compuesto (5) de la etapa anterior se le añadieron, sucesivamente, *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-

valina (Boc-Val-OH, 400 mg, 1,87 mmol), hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (DEC, 715 mg, 3,73 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 68 mg, 0,56 mmol), y se agitó la solución a temperatura ambiente. El perfil de la reacción se siguió por HPLC. La mezcla de reacción se volvió a cargar tres veces con Boc-Val-OH (400 mg x 3), DEC (715 mg x 3) y DMAP (68 mg x 3) y, finalmente, se volvió a cargar una vez con Boc-Val-OH (200 mg), DEC (357 mg) y DMAP (34 mg). Al cabo de dos días, el material de partida se consumió totalmente y se retiró el DMF a baja presión. El residuo, el compuesto (6), se recogió en metanol desecado (70 ml).

Ejemplo 16

Preparación del éster 3'-O-L-*N*-(*tert*-butoxicarbonil)valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina (7):

Se añadió fluoruro de amonio (1,38 g, 37,30 mmol) al residuo del compuesto (6) en metanol desecado, y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 horas. La mezcla se filtró y el solvente se retiró del filtrado a baja presión. El residuo se recogió en acetato de etilo y se extrajo varias veces con agua. La fase orgánica se evaporó al vacío y se purificó en una columna de cromatografía de gel de sílice (eluyente: MeOH (20 %) en EtOAc (80 %)). El compuesto deseado (7) se aisló (1,37 g, 78 % durante las 3 etapas) como una espuma blanca.

Los datos físico-químicos incluían: RMN ^1H (DMSO- d_6) δ ppm 7,99 (d, 1H, *H*-6, $J_{6-5} = 7,42$ Hz), 7,3-7,1 (m, 3H, *CH* y NH_2 , D_2O intercambiable), 5,9 (s, 1H, *H*-1'), 5,75 (d, 1H, *H*-5, $J_{6-5} = 7,43$ Hz), 5,43 (s, 1H, *OH*-2', D_2O intercambiable), 5,24 (t, 1H, *OH*-5'), 5,04 (d, 1H, *H*-3', $J_{3'-4'} = 9,1$ Hz), 4,1-4,0 (m, 2H, *H*-4', *CH*), 3,8-3,4 (2 m, 2H, *H*-5', *H*-5''), 2,2-2,0 (m, 1H, *CH*), 1,40 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1,0 (s, 3H, CH_3), 0,9-0,8 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); FAB < 0 , (GT) m/e 911 ($2\text{M} - \text{H}$) $^+$, 455 ($\text{M} - \text{H}$) $^+$, 256 (M -Boc-Val) $^+$, 216 (Boc-Val- OH) $^+$, 110 (B) $^+$; FAB > 0 (GT) 913 ($2\text{M} + \text{H}$) $^+$, 457 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 112 ($\text{B} + 2\text{H}$) $^+$, 57 ($\text{CH}_3)_3\text{C}$) $^+$; FAB < 0 (GT) 911 ($2\text{M} - \text{H}$) $^-$, 455 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$, 256 (M -Boc-Val) $^-$, 216 (Boc-Val) $^-$, 110 (B) $^-$.

Ejemplo 17

Preparación del éster 3'-O-L-valinílico de la β -D-2'-C-metil-citidina (sal de dihidrocloreto), (8):

Una solución del compuesto (7) (1,32 g, 2,9 mmol) en acetato de etilo desecado (75 ml) se trató con una solución de HCl/acetato de etilo al 20% (75 ml). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. El compuesto del título, (8), se precipitó en la mezcla de reacción, y se filtró y se lavó con Et_2O (1,01 g, rendimiento del 81 %).

Las características físico-químicas incluían: $F = 210$ °C (pardo), 234-241 °C (fundido); RMN ^1H (DMSO- d_6) δ ppm 10,0 (s, 1H, $1/2\text{NH}_2$, D_2O intercambiable), 8,9-8,6 (2 br s, 4H, $1/2\text{NH}_2$, NH_3 , D_2O intercambiable), 8,42 (d, 1H, *H*-6, $J_{5-6} = 7,9$ Hz), 6,24 (d, 1H, *H*-5, $J_{5-6} = 7,9$ Hz), 5,84 (s, 1H, *H*-1'), 5,12 (d, 1H, *H*-3', $J_{3'-4'} = 8,8$ Hz), 4,22 (d, 1H, *H*-4, $J_{3'-4'} = 8,7$ Hz), 4,0-3,9 (m, 1H, *CH*), 3,8-3,5 (m, 2H, *H*-5', *H*-5''), 2,3-2,1 (m, 1H, *CH*), 1,16 (s, 3H, CH_3), 1,0 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); FAB > 0 (GT) 713 ($2\text{M} + \text{H}$) $^+$, 449 ($\text{M} + \text{G} + \text{H}$) $^+$, 357 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 246 (S) $^+$, 112 ($\text{B} + 2\text{H}$) $^+$; FAB < 0 (GT) 747 ($2\text{M} + \text{Cl}$) $^-$, 483 ($\text{M} + \text{G} + \text{Cl}$) $^-$, 391 ($\text{M} + \text{Cl}$) $^-$, 355 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$, 116 (Val) $^-$, 110 (B) $^-$, 35 (Cl) $^-$, HPLC $r_t = 7,26$ min (gradiente de CH_3N del 0 al 50% en tampón de acetato de trietilamonio a 20 mM programado durante un periodo de 30 min con una velocidad de flujo de 1 ml/min), $\lambda_{\text{max}} = 273,5$ nm; UV (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 271$ nm (ϵ 7500), $\lambda_{\text{min}} = 249$ (ϵ 5200), $\lambda_s = 234$ nm (ϵ 6200).

Ejemplo 18

Síntesis de la β -2'-C-metil-citidina (figura 6):

En la figura 3 se hace referencia a una vía sintética alternativa para preparar la β -D-2'-C-metil-citidina. En este procedimiento, una mezcla de uracilo (2,1 eq.) y BSA (1,1 ml/mmol) en acetonitrilo (7 ml/mmol) se calentó a reflujo durante aproximadamente 30 minutos. La solución resultante se calentó con una solución de 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa (1) en acetonitrilo (7 ml/mmol), y con SnCl_4 (3,5 eq.). La solución se calentó a reflujo durante aproximadamente 4 horas. La mezcla oscura resultante se diluyó con acetato de etilo (2,5 volúmenes de tolueno), y se trató con NaHCO_3 saturado acuoso y frío a un volumen igual al del acetato de etilo. La mezcla entera se filtró a través de Celite® y el material sólido se lavó con acetato de etilo. La capa orgánica se separó del filtrado, se lavó con agua, se lavó con solución salina, se secó con Na_2SO_4 , y se evaporó a baja presión. La cromatografía en columna de gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano produjo un rendimiento del 65 % del compuesto (9), la β -D-2', 3', 5'-benzoi-2'-C-metil-uridina, como un sólido blanco.

Los grupos benzoi-protectores se retiraron de la β -D-2', 3', 5'-benzoi-2'-C-metil-uridina (9) mediante la solubilización de (9) en metanol (12,5 ml/mmol) tratado con MeONa (3,3 eq.) y la solución amarilla resultante se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 4,5 horas. La solución se neutralizó con la adición de Dowex H^+ 50wX4 que se lavó previamente con metanol. Se filtró la mezcla y se extrajo la resina varias veces con metanol caliente. Los filtrados se combinaron y se evaporaron a baja presión. El residuo se recogió en agua y se lavó 3 veces con diclorometano. La capa acuosa se evaporó a baja presión. La cristalización desde el agua generó (10), la β -D-2'-C-metil-uridina, con un rendimiento del 87 %.

A continuación, una solución de β -D-2'-C-metil-uridina (10), 1-metilpirrolidina (1 ml/mmol) y clorotrimetilsilano (3 eq.) en acetonitrilo (10 ml/mmol) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3,5 horas. La solución se

enfrió a 0 °C, se trató con anhídrido trifluoroacético (3 eq.) y se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos. Se le añadió el 4-nitrofenol (3 eq.) y la solución se agitó durante aproximadamente 3 horas. Se paró la reacción con la adición agua a la solución, y los solventes se evaporaron a baja presión. El residuo se recogió en diclorometano y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado y agua. La capa orgánica se evaporó a baja presión. El residuo bruto se recogió en dioxano (25 ml/mmol), y se trató con una solución acuosa al 28% de NH₄OH (5 ml/mmol). La solución se calentó a 50 °C durante una noche. A continuación, los solventes se evaporaron a baja presión y se realizó la separación cromatográfica con un gradiente de metanol (del 5 al 20 %) en diclorometano. Esto produjo la β-D-2'-C-metil-citidina (11), que era el producto deseado, con un rendimiento del 75%. El producto se cristalizó posteriormente en EtOH.

Las fuentes de los reactantes en los ejemplos 5 y 6 incluían:

- 10 dimetilacetal de *N,N*-dimetilformamida de Fluka®, referencia n.º 40271;
N,N-dimetilformamida sobre un tamiz molecular de Fluka®, referencia n.º 40248;
 etanol absoluto de Carlo Erba ACS para análisis, referencia n.º 414607;
 éter dietílico de Merck®, referencia n.º 1.000921.5000;
tert-butildifenilclorosilano de Avocado®, referencia n.º 12721;
- 15 imidazol de Fluka®, referencia n.º 56750;
 piridina sobre un tamiz molecular de Fluka®, referencia n.º 82704;
 hidrogenocarbonato de sodio de Fluka®, referencia n.º 71628;
 sulfato de sodio anhidro de Fluka®, referencia n.º 71960;
 acetonitrilo sobre un tamiz molecular de Fluka®, referencia n.º 00695;
- 20 *N,N*-dimetilformamida sobre tamiz molecular de Fluka®, referencia n.º 40248;
N-(*tert*-butoxicarbonil)-L-valina de Aldrich®, referencia n.º 35,972-6;
 4-dimetilaminopiridina de Aldrich®, referencia n.º 10,770-0;
 hidrocloreuro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida de Aldrich®, referencia n.º 16,146-2;
 fluoruro de amonio de Fluka®, referencia n.º 09742;
- 25 metanol destilado sobre sodio;
 acetato de etilo destilado sobre pentóxido de difósforo;
 cloruro de hidrógeno anhidro de Praxair, referencia n.º 1741100; y
 éter dietílico de Merck®, referencia n.º 1.00921.5000.

Realizaciones de la invención

- 30 1. Procedimiento para preparar un éster 3'-O-aminoacídico de nucleósido, que comprende:
 - (a) conjugar una ribofuranosa opcionalmente sustituida y opcionalmente protegida con una base de nucleósido sin proteger y un sililante en presencia de un ácido de Lewis para formar un nucleósido opcionalmente protegido;
 - (b) hacer reaccionar opcionalmente el nucleósido protegido de la etapa (a) con un reactante de desprotección para generar un nucleósido sin proteger si fuera necesario;
- 35 (c) hacer reaccionar opcionalmente el grupo amina del nucleósido protegido o sin proteger si el nucleósido tiene un grupo amina, con un reactante protector de aminas;
- (d) hacer reaccionar opcionalmente el nucleósido protegido o sin proteger con un sililante para generar un nucleósido 5'-O-silil-prottegido;
- 40 (e) hacer reaccionar el nucleósido protegido o sin proteger con un derivado de aminoácido protegido con opcionalmente uno o más reactantes de conjugación para formar un éster 3'-O-prottegido con el aminoácido;
- (f) someter a reflujo opcionalmente el producto de la etapa (e) con un reactante que retira el grupo sililo protector del 5'-C y el grupo formamidina protector de la amina nucleosídica si fuera necesario; y

(g) hacer reaccionar opcionalmente el producto de la etapa (f) con un reactante que retira el grupo protector aminoácido 3'-O-esterificado, con lo que se produce un nucleósido 3'-O-sustituido por esterificación que puede estar sustituido o sin sustituir.

2. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (a), la ribofuranosa opcionalmente protegida contiene un grupo metilo en la posición 2'-C.
3. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (a), el ácido de Lewis se selecciona del grupo que consiste en SnCl₄, BF₃, AlCl₃, TiCl₄, FeCl₃ y SnCl₂.
4. Procedimiento de acuerdo con la realización 3, en donde el ácido de Lewis es el SnCl₄.
5. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (a), el sililante se selecciona del grupo que consiste en BSA, HMDS, TMSCI y TBDPSCI.
6. Procedimiento de acuerdo con la realización 5, en donde el sililante es BSA.
7. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (a), en donde la reacción de conjugación se consigue en un solvente que es acetonitrilo.
8. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (b), el agente de desprotección es NaOMe o NH₃.
9. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (c), el agente protector de aminas se selecciona del grupo que consiste en dimetilacetal de *N,N*-dimetilformamida y *N*-1,1-dimetiltiometilnamina.
10. Procedimiento de acuerdo con la realización 9, en donde el agente protector de aminas es el dimetilacetal de *N,N*-dimetilformamida.
11. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (d), el sililante se selecciona del grupo que consiste en TBDPSCI, TMSCI y TBDMSCI.
12. Procedimiento de acuerdo con la realización 11, en donde el sililante es TBDPSCI.
13. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (e), el derivado aminoácido es valinilo.
14. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (e), el grupo protector de aminoácido se selecciona de BOC, -(C=O)-aralquilo, -(C=O)-alquilo o -(C=O)-arilo.
15. Procedimiento de acuerdo con la realización 14, en donde el grupo protector de aminoácido es BOC.
16. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (e), uno de los reactantes de conjugación es EDC.
17. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (f), el reactante que retira los sililos es NH₄F.
18. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde en la etapa (g), el reactante que retira el grupo aminoácido 3'-O-protector por esterificación es el HCl.
19. Procedimiento para preparar un nucleósido, que comprende las etapas de:
 - (a) conjugar la 1,2,3,5-tetra-*O*-benzoil-2-*C*-metil-β-*D*-ribofuranosa con la citosina en presencia de BSA y SnCl₄ para formar la 4-amino-1-(3,4-dibenzoiloximetil-5-benciloximetil-3-metil-tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona;
 - (b) hacer reaccionar la 4-amino-1-(3,4-dibenzoiloximetil-5-benciloximetil-3-metil-tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona de la etapa (a) con metóxido de sodio para retirar los grupos benzoilo protectores, con lo que se genera la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona;
 - (c) hacer reaccionar la 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1*H*-pirimidin-2-ona de la etapa (b) con el dimetilacetal de *N,N*-dimetilformamida para proteger el grupo *N*¹-amino, lo que produce la *N*-[1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetilformamidina;
 - (d) hacer reaccionar el nucleósido de cualquiera las etapas b) o c) con el sililante TBDPSCI para generar la *N*'-[1-[5-(*tert*-butil-difenil-silaniloximetil)-3,4-dihidroxi-3-metil-tetrahidrofuran-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetilformamidina;
 - (e) hacer reaccionar la *N*'-[1-[5-(*tert*-butil-difenil-silaniloximetil)-3,4-dihidroxi-3-metil-tetrahidrofuran-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-*N,N*-dimetil-formamidina con la *N*-BOC-*L*-valina y EDC en diclorometano para generar el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 2-(*tert*-butil-difenil-silaniloximetil)-5-[4-(dimetilamino-metilenamino)-2-oxo-2*H*-

pirimidin-1-il]-4-hidroxi-4-metil-tetrahidrofuran-3-ilo;

(f) retirar el grupo sililo protector y el grupo formamidina del 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 2-(*tert*-butil-difenil-silanil-oximetil)-5-[4-(dimetilamino-metilenamino)-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il]-4-hidroxi-4-metil-tetrahidrofuran-3-ilo de la etapa (e) al someter a reflujo el compuesto con NH₄F para formar el 2-*tert*-butoxi-carbonilamino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidrofuran-3-ilo; y

(g) retirar el grupo BOC protector del sustituyente 3'-O-valinílico al hacer reaccionar el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo de la etapa (f) con HCl para generar el 2-amino-3-metil-butirato de 5-(4-amino-2-oxo-2*H*-pirimidin-1-il)-4-hidroxi-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo (sal de dihidrocloruro).

10 20. Procedimiento para preparar una furanosa, que comprende:

(a) hacer reaccionar el CaO acuoso con un éter cíclico que contiene un hidroxilo y un CH₂OH sobre el carbono adyacente al oxígeno del anillo, con lo que se forma una lactona furanólica;

(b) proteger opcionalmente la lactona furanólica con un grupo protector si fuera necesario;

15 (c) hacer reaccionar la lactona furanólica opcionalmente protegida con un agente reductor para reducir la lactona a un grupo hidroxilo, lo que crea un compuesto del producto de la furanosa; y

(d) hacer reaccionar opcionalmente el compuesto del producto de la furanosa con un grupo protector.

21. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde el éter cíclico que reacciona con CaO es la D-fructosa.

20 22. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde la lactona furanólica es la 2-C-metil-D-ribonolactona.

23. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde la lactona furanólica protegida es la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribonolactona.

24. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde la furanosa es la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.

25 25. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde la furanosa protegida es la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.

26. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde el grupo protector se selecciona del grupo que consiste en sililo, benzoilo, *p*-toluilo, *p*-nitrobenzoilo, *p*-clorobenzoilo, acilo, acetilo, -(C=O)-alquilo y -(C=O)-arilo, opcionalmente sustituido con uno o más grupos que no se ven afectados por el agente reductor de la etapa (c).

30 27. Procedimiento de acuerdo con la realización 26, en donde el grupo protector es benzoilo.

28. Procedimiento de acuerdo con la realización 26, en donde el grupo protector es -(C=O)-alquilo.

29. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en Red-Al/etanol, NaHTE, Sml₂, H₂ + catalizador de Pd-fosfina y LiAl(O^{*t*}Bu)₃H.

30. Procedimiento de acuerdo con la realización 29, en donde el agente reductor es Red-Al/etanol.

35 31. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde las reacciones se llevan a cabo en el solvente seleccionado del grupo que consiste en TEA, DMAP, DME, tolueno y etanol.

32. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde la temperatura de la reacción varía desde aproximadamente -5 °C a aproximadamente 50 °C para el primer compuesto lactónico producido.

40 33. Procedimiento de acuerdo con la realización 20, en donde el tiempo total para la síntesis es de aproximadamente 5 días a aproximadamente 14 días.

34. Procedimiento de acuerdo con la realización 33, en donde el tiempo total para la síntesis es de aproximadamente 5 días a 10 días.

35. Procedimiento de acuerdo con la realización 33, en donde el tiempo total para la síntesis es de aproximadamente 60 horas.

45 36. Procedimiento que comprende:

(a) hacer reaccionar el CaO acuoso con la D-fructosa durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 25

horas a una temperatura de unos 23 °C a unos 40 °C;

(b) hacer reaccionar el producto de la etapa (a) con CO₂ y ácido oxálico durante aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas, para formar la 2-C-metil-D-ribonolactona;

(c) hacer reaccionar la 2-C-metil-D-ribonolactona con cloruro de benzoílo durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas para generar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribonolactona;

(d) reducir la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribonolactona con Red-Al/etanol durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos a una temperatura de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 0 °C para generar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa;

(e) benzoilar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa en el solvente durante aproximadamente 4 horas a aproximadamente 14 horas a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 50 °C para formar la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa; y

(f) aislar opcionalmente la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.

37. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (a), en donde el tiempo de reacción es de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 horas.

38. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (a), en donde la temperatura es de aproximadamente 23 a aproximadamente 40 °C.

39. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (c), en donde el solvente es DME.

40. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (c), en donde la reacción prosigue durante aproximadamente 4 horas.

41. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (d), en donde la reducción prosigue durante aproximadamente 40 minutos.

42. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (d), en donde el solvente comprende tolueno.

43. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (e), en donde el solvente comprende DME.

44. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (e), en donde la temperatura es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 °C, y la reacción está funcionando de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

45. Procedimiento de acuerdo con la realización 36, etapa (f), en donde el aislamiento se realiza mediante los procedimientos conocidos en la técnica.

46. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde la ribofuranosa opcionalmente sustituida y protegida con benzoílo se prepara mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20.

47. Procedimiento de acuerdo con la realización 1, en donde la ribofuranosa opcionalmente sustituida y protegida con benzoílo se preparara mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 36.

48. Procedimiento para preparar una lactona furanólica, que comprende:

(a) hacer reaccionar el CaO acuoso con un éter cíclico que contiene un hidroxilo y un CH₂OH sobre el carbono adyacente al oxígeno del anillo, con lo que se forma una lactona furanólica.

49. Procedimiento para preparar la 2-C-metil-D-ribonolactona, en donde el procedimiento comprende:

(a) hacer reaccionar el CaO acuoso con la D-fructosa durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 25 horas a una temperatura de aproximadamente 23 °C a aproximadamente 40 °C;

(b) hacer reaccionar el producto de la etapa (a) con CO₂ y ácido oxálico durante aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas para formar la 2-C-metil-D-ribonolactona.

50. Procedimiento para preparar un compuesto de 2-C-metil-β-D-ribofuranosa opcionalmente protegido, que comprende:

(a) reducir una 2-C-metil-D-ribonolactona opcionalmente protegida con Red-Al/etanol para obtener una 2-C-metil-β-D-ribofuranosa opcionalmente protegida.

51. Procedimiento para preparar un nucleósido opcionalmente protegido, que comprende:

(a) conjugar una ribofuranosa opcionalmente sustituida y opcionalmente protegida con una base de nucleósido sin

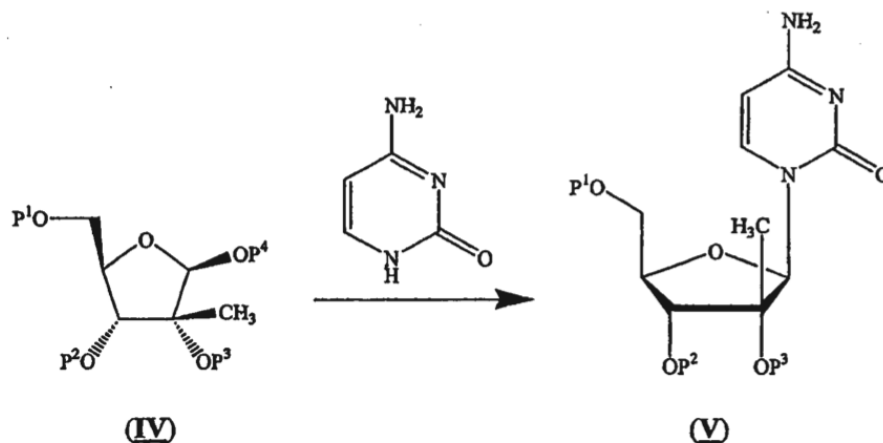
proteger y un sililante en presencia de un ácido de Lewis para formar un nucleósido opcionalmente protegido.

52. Procedimiento para preparar una β -D-2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida, que comprende las etapas de:

5 (a) conjugar una 2-C-metil- β -D-ribofuranosa opcionalmente protegida con citosina en presencia de BSA y SnCl_4 para formar una β -D-2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida.

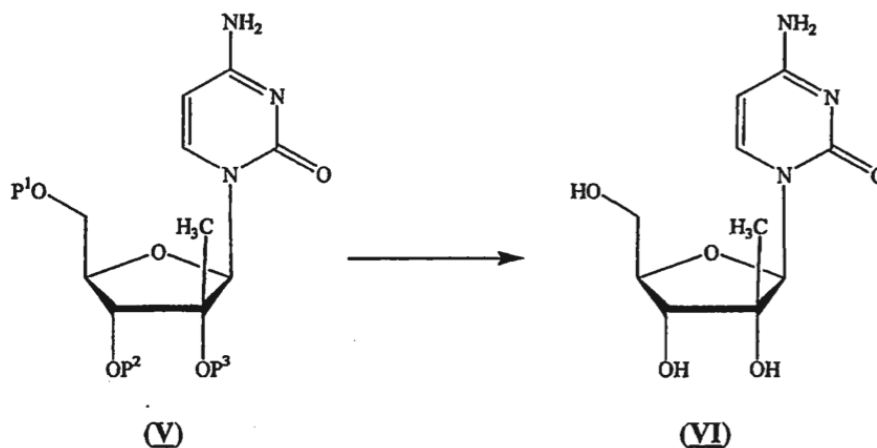
53. Procedimiento para preparar una 2'-C-metil-citidina, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar la citosina y un activador, opcionalmente en presencia de un ácido de Lewis, con una 2-C-metil- β -D-ribofuranosa opcionalmente protegida para formar una 2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida



10 en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado;
y a continuación

(b) desproteger opcionalmente la 2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida de la etapa anterior para formar la 2'-C-metil-citidina (VI)



15 si fuera necesario.

54. Procedimiento de acuerdo con la realización 53, en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un acilo.

55. Procedimiento de acuerdo con la realización 53, en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un benzoilo.

20 56. Procedimiento de acuerdo con la realización 53, en donde el activador es un sililante.

57. Procedimiento de acuerdo con la realización 56, en donde el sililante es BSA, HMDS, TMSCl o TBDPSCI.

58. Procedimiento de acuerdo con la realización 56, en donde el sililante es BSA.

59. Procedimiento de acuerdo con la realización 53, en donde la reacción de la etapa (a) se lleva a término con un ácido de Lewis seleccionado del grupo que consiste en SnCl_4 , BF_3 , AlCl_3 , TiCl_2 , TiCl_4 , FeCl_3 , SnCl_2 y cualquier mezcla de los mismos.

60. Procedimiento de acuerdo con la realización 53, en donde el ácido de Lewis es SnCl_4 .

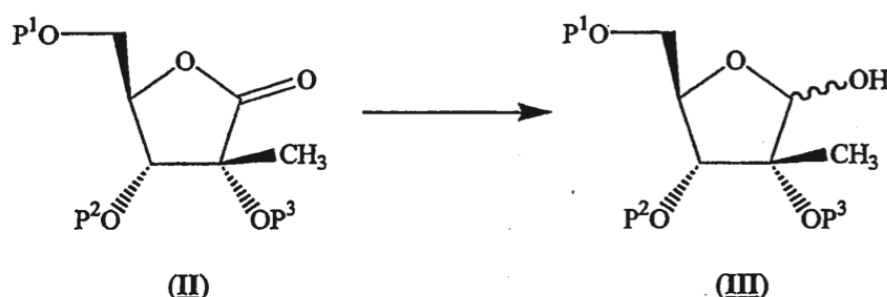
5 61. Procedimiento de acuerdo con la realización 53, en donde el procedimiento comprende además las etapas de esterificar la posición 3' de la 2'-C-metil-citidina con un resto éster.

62. Procedimiento de acuerdo con la realización 61, en donde el resto éster es un aminoácido.

63. Procedimiento de acuerdo con la realización 62, en donde el aminoácido es L-valinilo.

64. Procedimiento para preparar una 2-C-metil- β -D-ribofuranosa opcionalmente protegida, que comprende las etapas de:

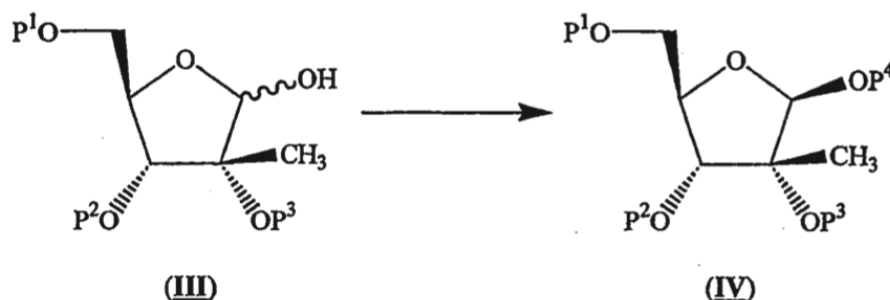
(a) reducir una 2-C-metil-D-ribónico-lactona opcionalmente protegida con un agente reductor



en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado;

y a continuación

15 (b) proteger opcionalmente el compuesto derivado de la ribofuranosa de la etapa anterior para formar una 2-C-metil- β -D-ribofuranosa opcionalmente protegida



en donde P^4 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado.

20 65. Procedimiento de acuerdo con la realización 64, en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un acilo.

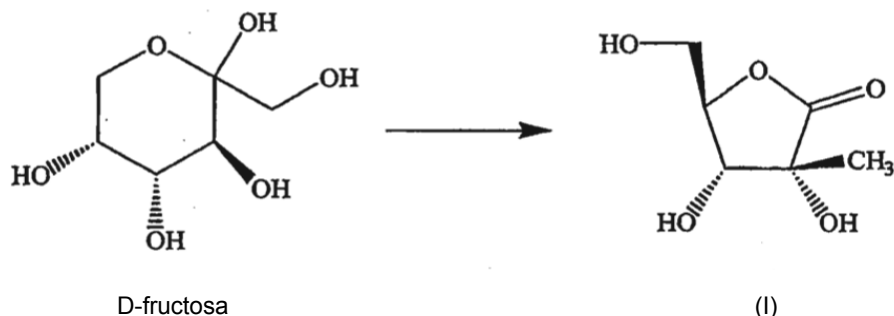
66. Procedimiento de acuerdo con la realización 64, en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un benzoilo.

67. Procedimiento de acuerdo con la realización 64, en donde el agente reductor es hidruro de sodio y bis(2-metoxietoxi)aluminio (Red-Al), opcionalmente en un solvente.

25 68. Procedimiento de acuerdo con la realización 67, en donde el solvente es etanol.

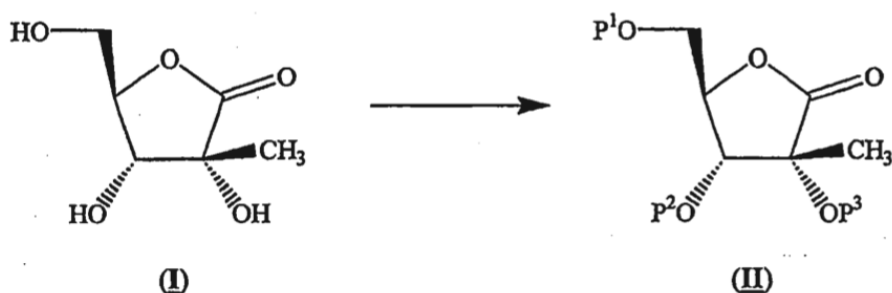
69. Procedimiento para preparar una 2-C-metil-D-ribónico-lactona opcionalmente protegida, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar la D-fructosa con CaO;



y a continuación

5 (b) proteger opcionalmente la lactona para formar una 2-C-metil-D-ribónico-lactona opcionalmente protegida



en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado.

70. Procedimiento de acuerdo con la realización 69, en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es independientemente hidrógeno o un acilo.

10 71. Procedimiento de acuerdo con la realización 69 en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es independientemente hidrógeno o un benzoílo.

72. Procedimiento de acuerdo con la realización 69, en donde se utiliza un precipitante para retirar el calcio generado en la etapa (a).

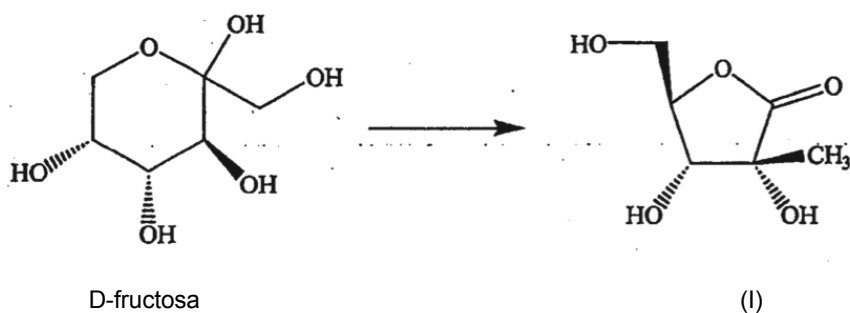
15 73. Procedimiento de acuerdo con la realización 72, en donde el precipitante es un ácido orgánico que es más fuerte que el ácido ribónico.

74. Procedimiento de acuerdo con la realización 73, en donde el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido subérico, ácido sebácico, ácido azelaico, ácido maleico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido butírico, ácido pentanoico, ácido hexanoico y ácido hexanoico.

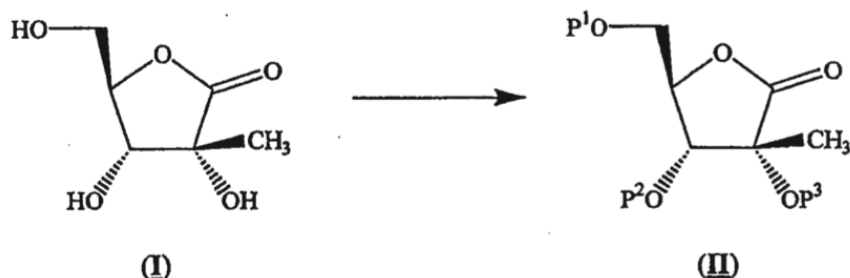
20 75. Procedimiento de acuerdo con la realización 73, en donde el ácido orgánico es ácido oxálico.

76. Procedimiento para preparar la 2'-C-metil-D-citidina opcionalmente protegida a partir de la D-fructosa, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar la D-fructosa con CaO para obtener una 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona;

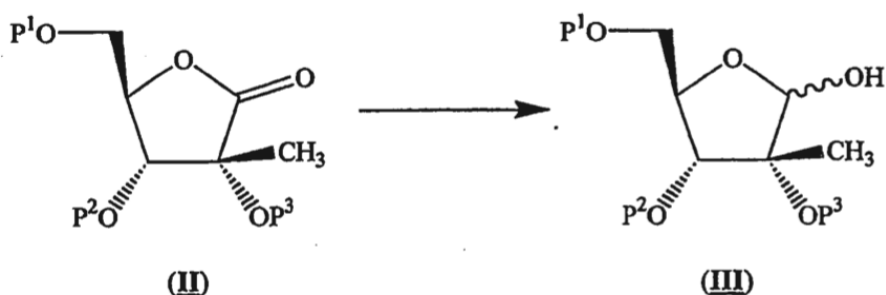


(b) proteger opcionalmente la lactona para formar una 2-C-metil-D-ribónico-lactona opcionalmente protegida, si fuera necesario;



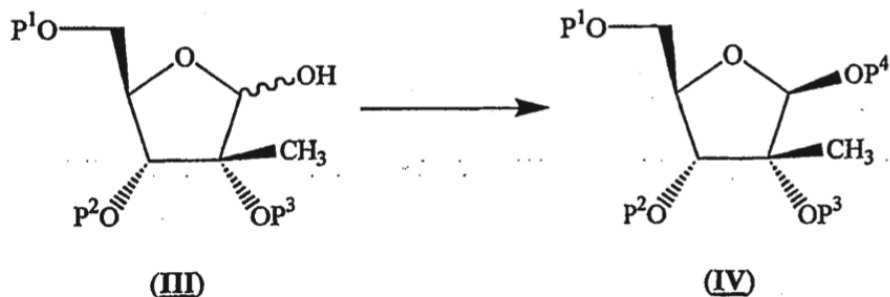
en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado;

5 (c) hacer reaccionar la 2-C-metil-D-ribónico-lactona opcionalmente protegida con un agente reductor;



en donde cada P^1 , P^2 y P^3 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado;

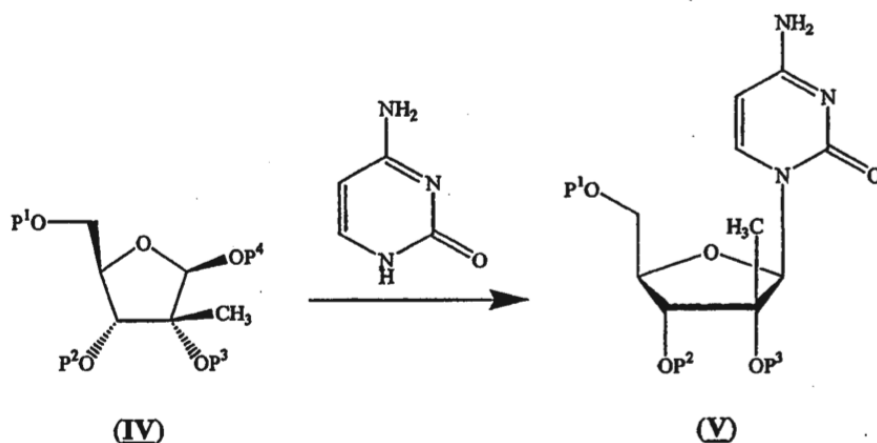
(d) proteger opcionalmente el compuesto derivado de la ribofuranosa de la etapa anterior para formar una 2-C-metil-β-D-ribofuranosa opcionalmente protegida, si fuera necesario,



10

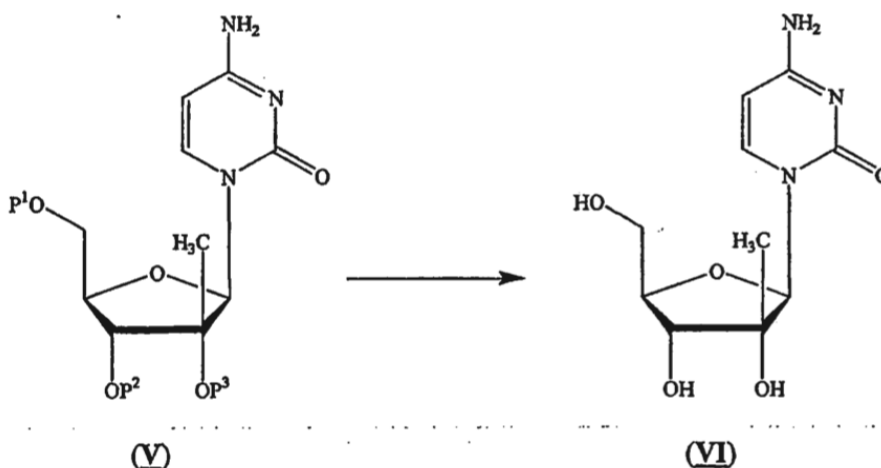
en donde la P^4 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado;

(e) hacer reaccionar la 2-C-metil-β-D-ribofuranosa opcionalmente protegida con la citosina y un activador, opcionalmente en presencia de un ácido de Lewis, para formar una 2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida



en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de oxígeno adecuado;
y a continuación

- (f) desproteger opcionalmente la 2'-C-metil-citidina opcionalmente protegida para formar la 2'-C-metil-citidina
5 opcionalmente protegida



si fuera necesario.

77. Procedimiento de acuerdo con la realización 76, en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un acilo.
- 10 78. Procedimiento de acuerdo con la realización 76, en donde cada P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es independientemente hidrógeno o un benzoilo.
79. Procedimiento de acuerdo con la realización 76, en donde el activador es un sililante.
80. Procedimiento de acuerdo con la realización 79, en donde el sililante es BSA, HMDS, TMSCl o TBDPSCI.
81. Procedimiento de acuerdo con la realización 79, en donde el sililante es BSA.
- 15 82. Procedimiento de acuerdo con la realización 76, en donde la reacción de la etapa (e) se lleva a cabo con un ácido de Lewis seleccionado del grupo que consiste en SnCl_4 , BF_3 , AlCl_3 , TiCl_2 , TiCl_4 , FeCl_3 , SnCl_2 y cualquier mezcla de los mismos.
83. Procedimiento de acuerdo con la realización 82, en donde el ácido de Lewis es el SnCl_4 .
84. Procedimiento de acuerdo con la realización 76, en donde el agente reductor es el hidruro de sodio y bis(2-
20 metoxietoxi)aluminio (Red-Al), opcionalmente en un solvente.
85. Procedimiento de acuerdo con la realización 84, en donde el solvente es etanol.

- 86. Procedimiento de acuerdo con la realización 76, en donde el procedimiento comprende además las etapas de esterificar la posición 3' de la 2'-C-metil-citidina con un resto éster.
- 87. Procedimiento de acuerdo con la realización 86, en donde el resto éster es un aminoácido.
- 88. Procedimiento de acuerdo con la realización 87, en donde el aminoácido es L-valinilo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un compuesto de 2-C-metil-D-ribofuranosa opcionalmente protegido, que comprende:
 - (a) hacer reaccionar la D-fructosa con CaO en agua para obtener una 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona;
- 5 (b) proteger opcionalmente la 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona con un grupo protector para formar la 2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona;
- (c) hacer reaccionar la 2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona con un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en Red-Al, NaHTe, Sml₂, H₂ y un catalizador de Pd-fosfina, y LiAl(O^tBu)₃H para reducir la lactona a un grupo hidroxilo, y formar un compuesto de 2,3,5-
- 10 (protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-D-ribofuranosa; y
- (d) proteger opcionalmente el compuesto de 2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-D-ribofuranosa con un grupo protector para formar la 1,2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la 2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona es la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona, y el compuesto de 2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-D-ribofuranosa es la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la 1,2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-β-D-ribofuranosa es la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el grupo protector se selecciona del grupo que consiste en sililo, benzoilo, *p*-toluóilo, *p*-nitrobenzoilo, *p*-clorobenzoilo, acilo, acetilo, -(C=O)-alquilo y -(C=O)-arilo, opcionalmente sustituido con uno o más grupos que no se ven afectados por el agente reductor de la etapa (c); o el grupo protector es benzoilo; o el grupo protector es -(C=O)-alquilo.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la temperatura de reacción de la etapa (a) varía desde -5 °C a 50 °C.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tiempo total para la preparación de la 1,2,3,5-(protegidos de forma independiente y de forma optativa)-2-C-metil-β-D-ribofuranosa es de 5 días a 14 días; de 5 días a 10 días; o 60 horas.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
 - 30 a) hacer reaccionar el CaO acuoso con la D-fructosa;
 - b) hacer reaccionar el producto de la etapa (a) con CO₂ y ácido oxálico para formar la 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona;
 - (c) hacer reaccionar la 2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona con cloruro de benzoilo para generar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona;
 - 35 (d) reducir la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-D-ribónico-γ-lactona con un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en NaHTe, Sml₂, H₂ y un catalizador de Pd-fosfina, y LiAl(O^tBu)₃H para generar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa;
 - e) benzoilar la 2,3,5-tri-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa en el solvente para formar la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa; y
 - 40 f) aislar opcionalmente la 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil-β-D-ribofuranosa.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (a), en donde el tiempo de reacción es de 5 a 25 horas.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (a), en donde la temperatura es de 23 al 40 °C.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (c), en donde el solvente es 1,2-dimetoxietano.
- 45 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (c), en donde la reacción dura de 3 a 6 horas.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (d), en donde la reducción dura de 30 a 60 minutos.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (d), en donde el solvente comprende tolueno.

14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (e), en donde el solvente comprende 1,2-dimetoxietano.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, etapa (e), en donde la temperatura es de 0 a 50 °C.

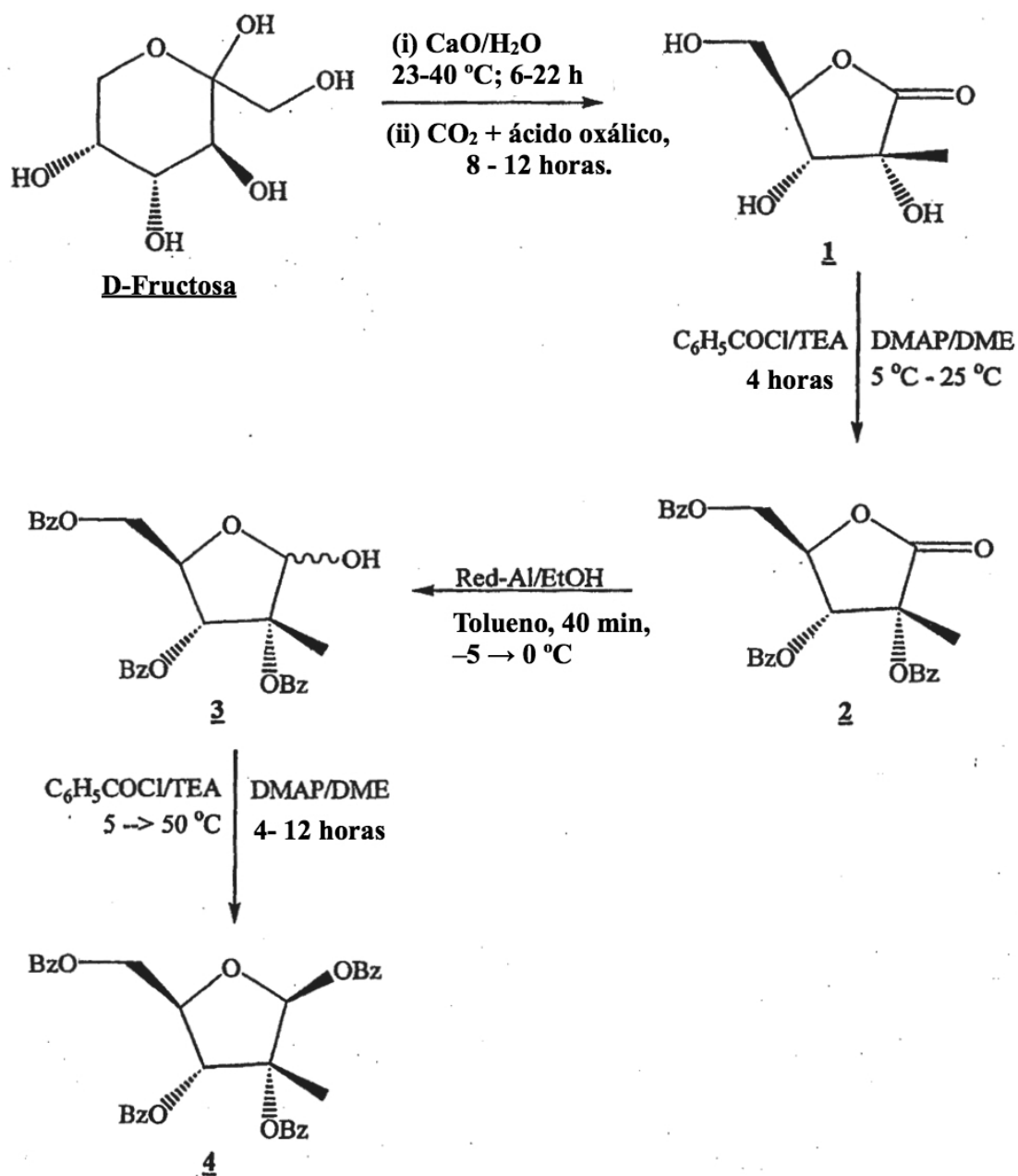


FIGURA 1

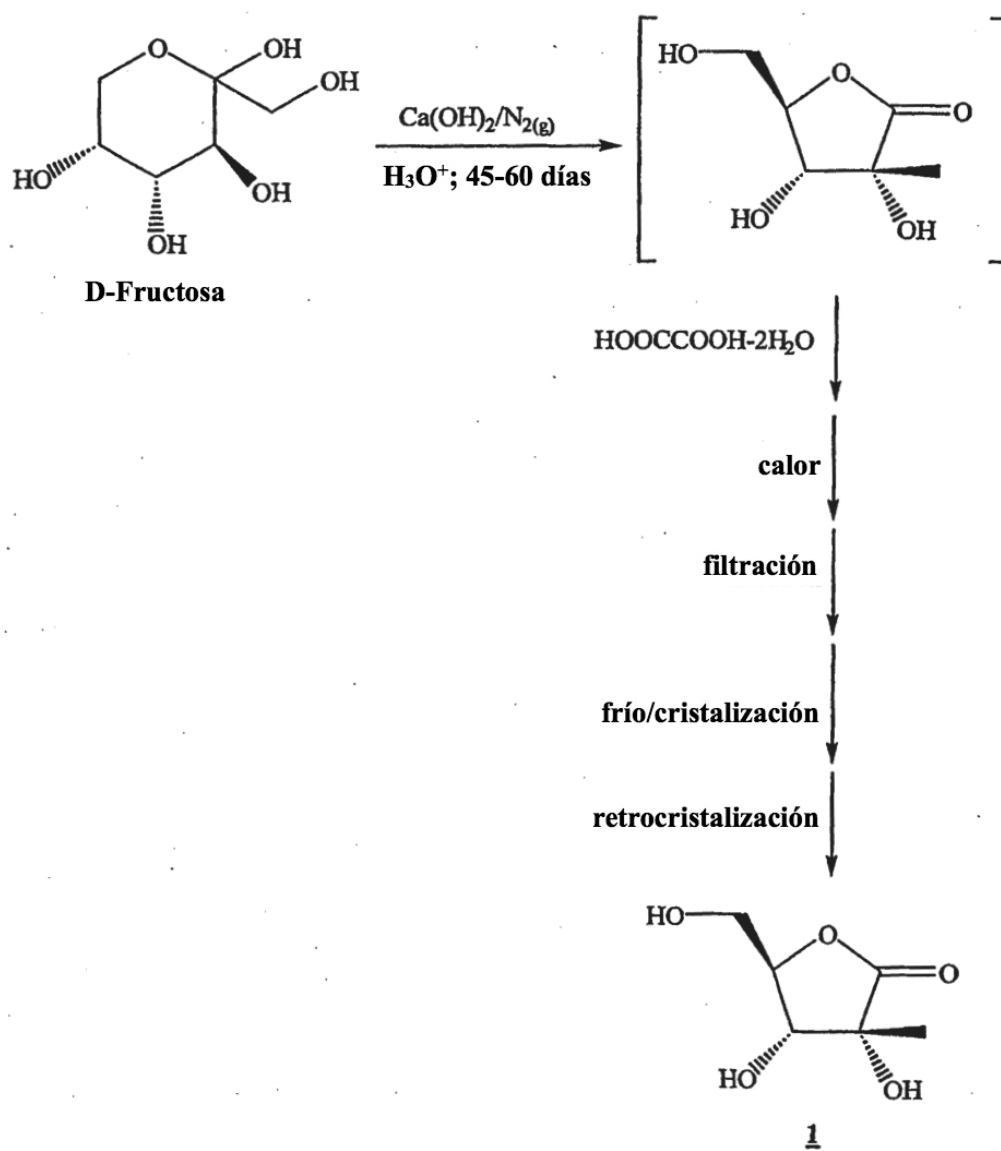
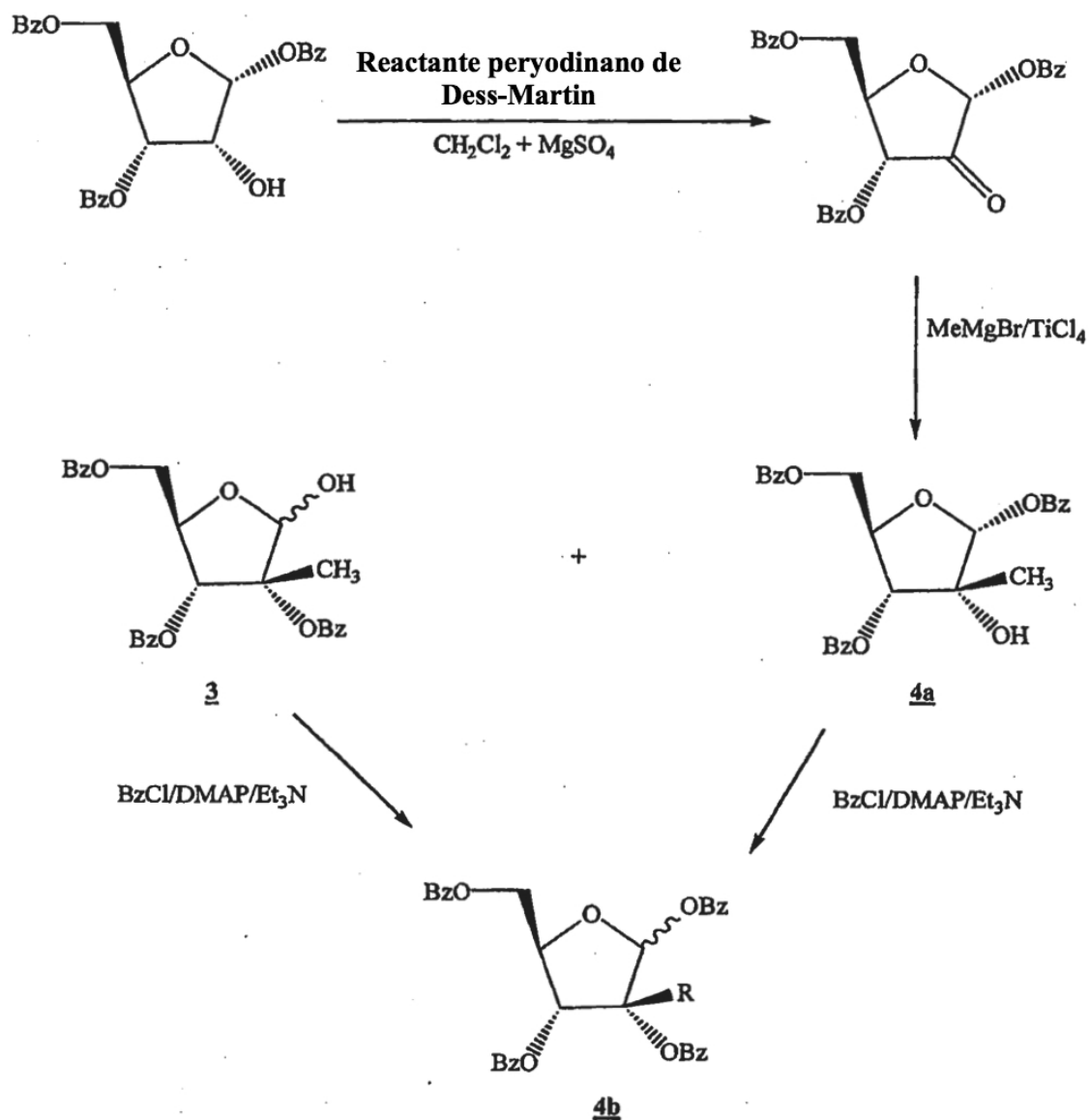


FIGURA 2



Tomado de Harry-O'kuru et al., J. Org. Chem., 1997, 62(6):1754-59.

FIGURA 3

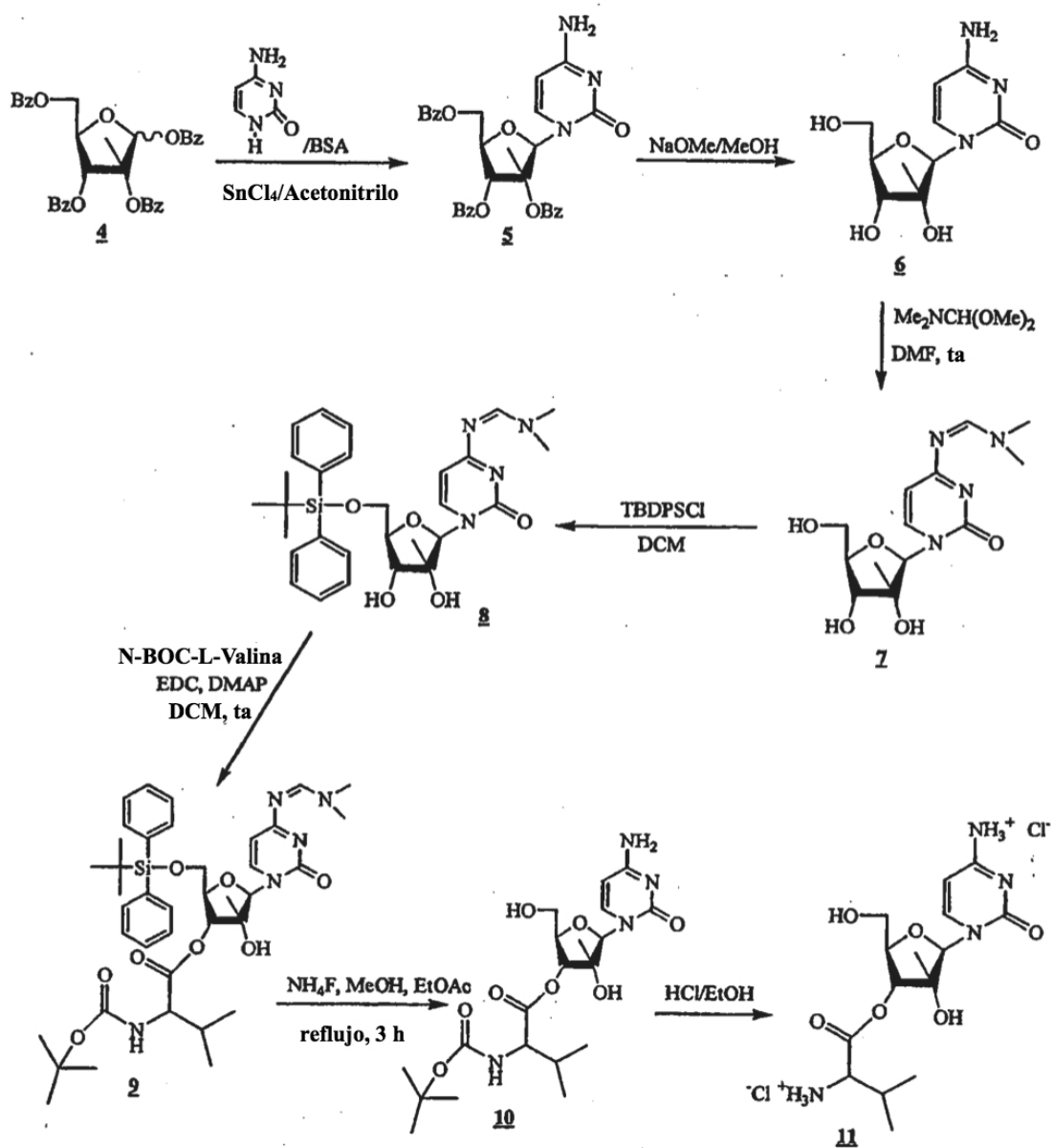


FIGURA 4

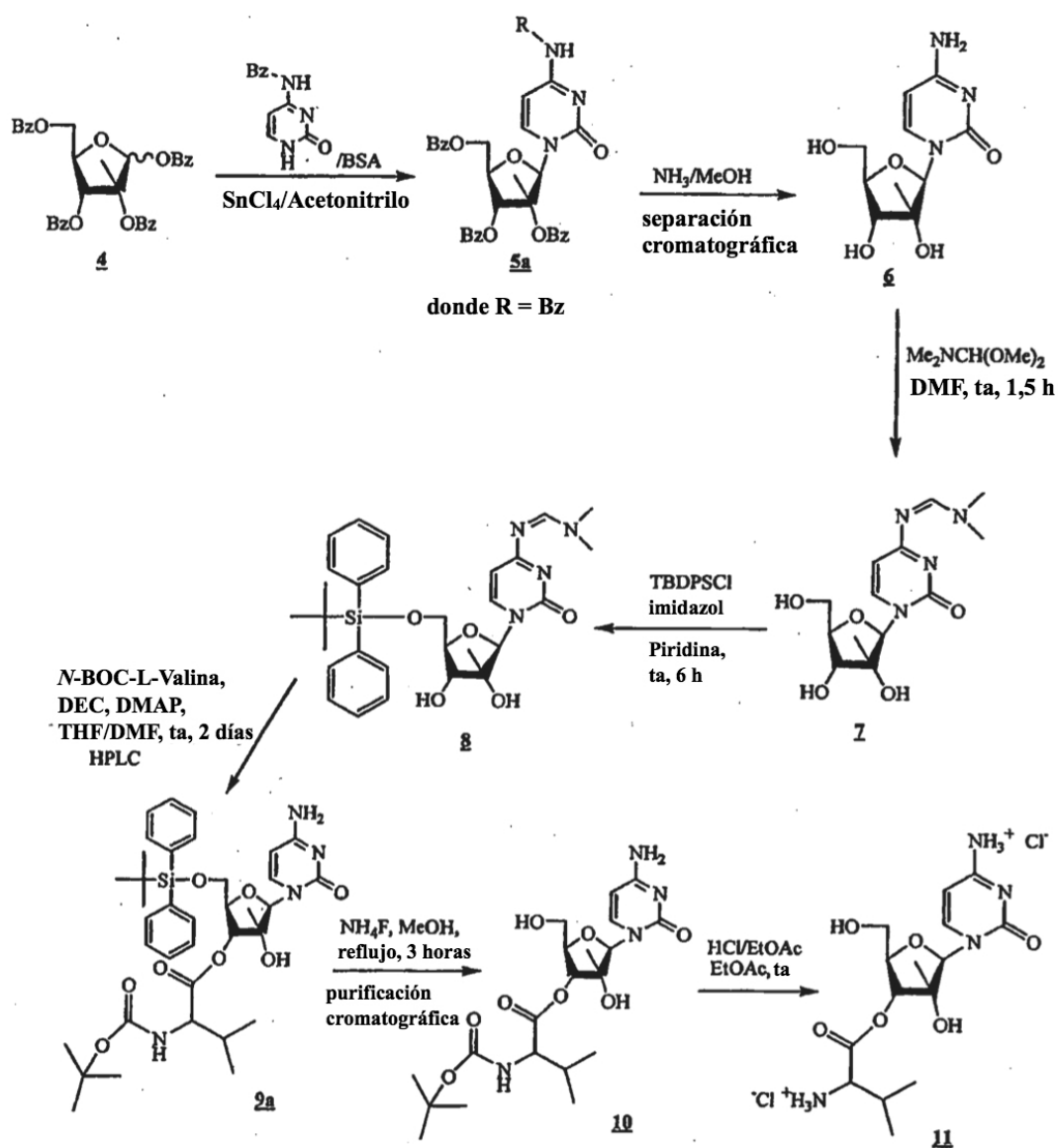


FIGURA 5

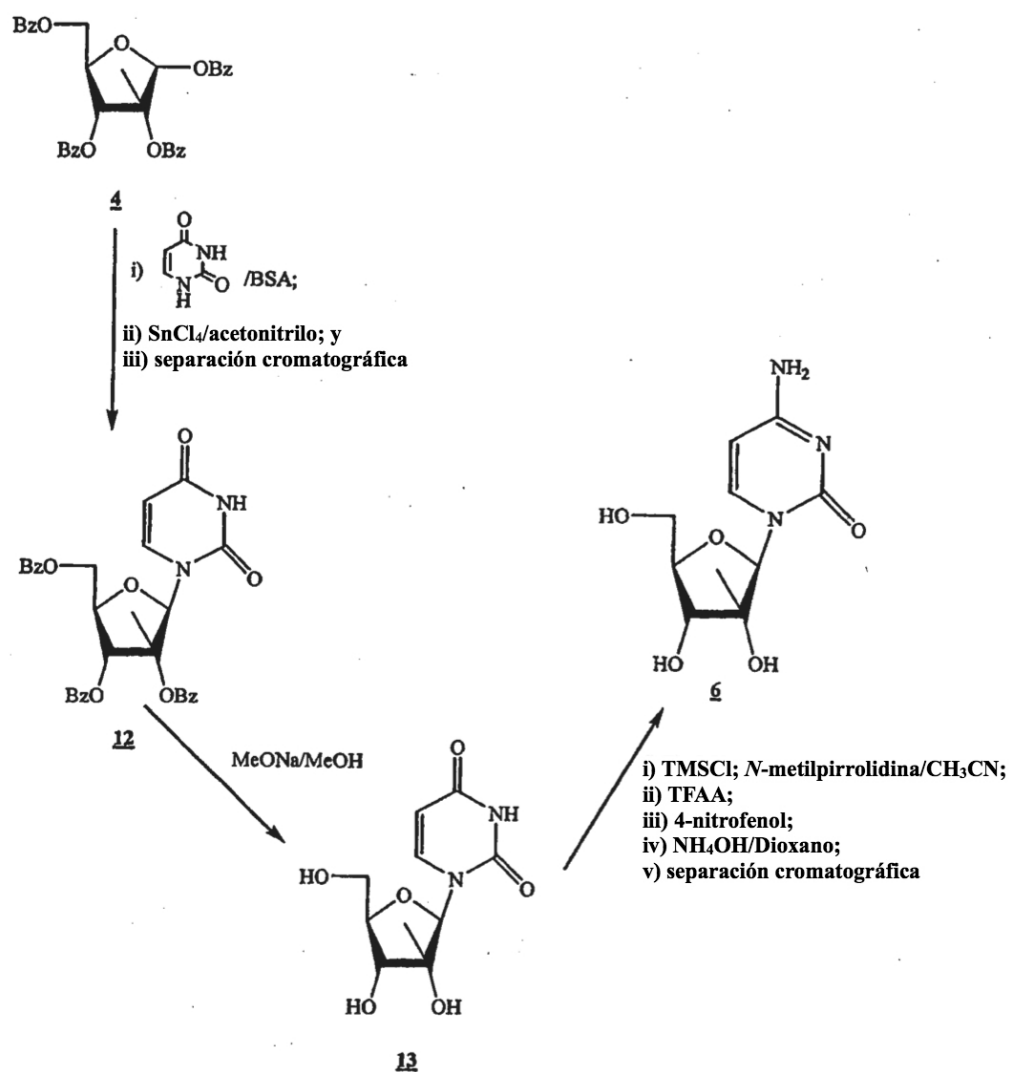


FIGURA 6