

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 944**

51 Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2011 E 11714465 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2552930**

54 Título: **(S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1-(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino**

30 Prioridad:

31.03.2010 US 319548 P

20.05.2010 US 783680

31.03.2010 US 319513 P

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

24.11.2015

73 Titular/es:

**GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)
Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

**ROSS, BRUCE S.;
SOFIA, MICHAEL JOSEPH;
PAMULAPATI, GANAPATI REDDY;
RACHAKONDA, SUGUNA;
ZHANG, HAI-REN;
CHUN, BYOUNG-KWON y
WANG, PEIYUAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 551 944 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

(S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1-(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino

5 **Campo de la invención**

En el presente documento se desvelan nucleósido fosforamidatos y su uso como agentes para tratar enfermedades virales. Estos compuestos son inhibidores de la replicación viral de ARN dependiente de ARN y son útiles como
10 inhibidores de la polimerasa NS5B del VHC, como inhibidores de la replicación del VHC y para el tratamiento de infección por hepatitis C en animales.

Antecedentes

15 La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un importante problema de salud que conduce a enfermedad hepática crónica, tal como cirrosis y carcinoma hepatocelular, en un número considerable de individuos infectados, que se estima en un 2-15 % de la población mundial. Solo en los Estados Unidos hay una cantidad estimada de 4,5 millones de personas infectadas, de acuerdo con el Centro para el Control de Enfermedades de Estados Unidos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen más de 200 millones de individuos infectados a nivel
20 mundial, infectándose cada año al menos de 3 a 4 millones de personas. Una vez infectados, aproximadamente un 20 % de los individuos eliminan el virus, pero el resto puede alojar el VHC el resto de sus vidas. De un diez a un veinte por ciento de los individuos infectados crónicamente desarrollan finalmente cirrosis o cáncer que destruyen el hígado. La enfermedad viral se transmite parenteralmente mediante sangre y productos sanguíneos contaminados, agujas contaminadas, o sexualmente y verticalmente desde madres infectadas o madres portadoras a su descendencia. Los
25 tratamientos actuales para la infección por VHC, que están restringidos a la inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina, son de beneficio clínico limitado. Además, no existe ninguna vacuna establecida para el VHC. En consecuencia, existe una necesidad urgente de agentes terapéuticos mejorados que combatan de forma eficaz la infección crónica por VHC.

30 El virión del VHC es un virus ARN envuelto de cadena positiva con una secuencia genómica de oligorribonucleótido individual de aproximadamente 9600 bases que codifica una poliproteína de aproximadamente 3010 aminoácidos. Los productos proteicos del gen del VHC consisten en las proteínas estructurales C, E1, y E2, y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A y NS4B, y NS5A y NS5B. Se cree que las proteínas no estructurales (NS) proporcionan la maquinaria catalítica para la replicación viral. La NS3 proteasa libera NS5B, la ARN polimerasa dependiente de ARN
35 para la cadena de poliproteína. La NS5B polimerasa del VHC se requiere para la síntesis de un ARN bicatenario a partir de un ARN viral monocatenario que sirve como plantilla en el ciclo de replicación del VHC. Por lo tanto, se considera que la NS5B polimerasa es un componente esencial en el complejo de replicación del VHC (K. Ishi, *et al.*, *Heptology*, 1999,29: 1227-1235; V. Lohmann, *et al.*, *Virology*, 1998,249: 108-118). La inhibición de la NS5B polimerasa del VHC previene la formación del ARN bicatenario del VHC y por lo tanto constituye un enfoque atractivo para el desarrollo de terapias antivirales específicas para VHC.

El VHC pertenece a una familia de virus mucho mayor que comparte numerosas características comunes.

45 *Virus Flaviviridae*

La familia de virus *Flaviviridae* comprende al menos tres géneros distintos: *pestivirus*, que causan enfermedad en el ganado y cerdos; *flavivirus*, que son la causa principal de enfermedades tales como fiebre del dengue y fiebre amarilla; y *hepacivirus*, cuyo único miembro es el VHC. El género *flavivirus* incluye más de 68 miembros separados en grupos basándose en asociación serológica (Calisher *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 1993,70,37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica (Fields *Virology*, Editores: Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, capítulo 31, 931-959). Los *flavivirus* de preocupación mundial que están asociados con enfermedades humanas incluyen los virus de la Fiebre Hemorrágica de Dengue (DHF), el virus de la fiebre amarilla, el virus del síndrome de choque y el virus de la encefalitis japonesa (Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984,6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med.*, 1988, 319, 64 1-643).

El género *pestivirus* incluye el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), el virus de la peste porcina clásica (CSFV, también denominado virus del cólera porcino) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV) ovino (Moennig, V. *et al. Adv. Vir. Res.* 1992, 41,53-98). Las infecciones por *pestivirus* de ganado domesticado (reses, cerdos y ovejas) causan pérdidas económicas considerables a nivel mundial. El BVDV causa enfermedad mucosa en las reses y es de importancia económica considerable en la industria de la ganadería (Meyers, G. y Thiel, H.J., *Advances in Virus Research*, 1996, 47, 53-118; Moennig V., *et al.*, *Adv. Vir. Res.* 1992, 41,53-98). Los *pestivirus* humanos no se han caracterizado tan exhaustivamente como los *pestivirus* animales. Sin embargo, los estudios serológicos indican una considerable exposición a *pestivirus* en seres humanos.

Los *pestivirus* y *hepacivirus* son grupos de virus estrechamente relacionados dentro de la familia *Flaviviridae*. Otros virus estrechamente relacionados con esta familia incluyen el virus GB A, agentes de tipo virus GB A, virus GB B y virus GB C (también denominado virus de la hepatitis G, HGV). El grupo de los *hepacivirus* (virus de la hepatitis C; VHC) consiste en diversos virus estrechamente relacionados pero genótipicamente distinguibles que infectan seres humanos. Existen al menos 6 genotipos de VHC y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre *pestivirus* y *hepacivirus*, combinado con la escasa capacidad de los *hepacivirus* para crecer de forma eficaz en cultivo celular, se usa a menudo el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) como sustituto para estudiar el virus VHC

La organización genética de *pestivirus* y *hepacivirus* es muy similar. Estos virus ARN de cadena positiva poseen un marco abierto de lectura (ORF) grande individual que codifica todas las proteínas virales necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que se procesa conjuntamente y posteriormente a la traducción mediante proteinasas tanto celulares como codificadas por el virus para producir las proteínas virales maduras. Las proteínas virales responsables de la replicación del ARN del genoma viral se localizan aproximadamente en el extremo carboxi terminal. Dos tercios del ORF se denominan proteínas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de poliproteína de la parte de proteínas no estructurales del ORF para *pestivirus* y *hepacivirus* son muy similares. Tanto para *pestivirus* como para *hepacivirus*, las proteínas no estructurales (NS) maduras, en orden secuencial desde el extremo amino terminal de la región que codifica la proteína no estructural hasta el extremo carboxi terminal del ORF, consisten en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B.

Las proteínas NS de *pestivirus* y *hepacivirus* comparten dominios de secuencia que son característicos de funciones de proteína específicas. Por ejemplo, las proteínas NS3 de los virus de ambos grupos poseen motivos de secuencia de aminoácidos característicos de serina proteinasas y de helicasas (Gorbalenya *et al.*, *Nature*, 1988, 333, 22; Bazan y Fletterick *Virology*, 1989, 171.637-639; Gorbalenya *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3889-3897). De forma similar, las proteínas NS5B de *pestivirus* y *hepacivirus* tienen los motivos característicos de ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, E.V. y Dolja, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Los papeles y funciones reales de las proteínas NS de *pestivirus* y *hepacivirus* en el ciclo de vida de los virus son exactamente análogos. En ambos casos, la serina proteinasa NS3 es responsable de todo el procesamiento proteolítico de los precursores de la poliproteína corriente abajo de su posición en el ORF (Wiskerchen y Collett, *Virology*, 1991.184, 341-350; Bartenschlager *et al.*, *J. Virol.* 1993, 67, 3835-3844; Eckart *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993.192, 399-406; Grakoui *et al.*, *J. Virol.* 1993, 67, 2832-2843; Grakoui *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 10583-10587; Hijikata *et al.*, *J. Virol.* 1993, 67, 4665-4675; Tome *et al.*, *J. Virol.*, 1993, 67, 4017-4026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager *et al.*, *J. Virol.* 1994, 68, 5045-5055; Failla *et al.*, *J. Virol.* 1994, 68, 3753-3760; Xu *et al.*, *J. Virol.*, 1997, 71:53 12-5322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, 215, 160-166; Jin y Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 323, 47-53; Warrenner y Collett, *J. Virol.* 1995, 69,1720-1726). Finalmente, las proteínas NS5B de *pestivirus* y *hepacivirus* tienen la actividad predicha de ARN polimerasas dirigidas por ARN (Behrens *et al.*, *EMBO*, 1996, 15, 12-22; Lechmann *et al.*, *J. Virol.*, 1997, 71, 8416-8428; Yuan *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997.232,231-235; Hagedorn, *PCT WO 97/12033*; Zhong *et al.*, *J. Virol.*, 1998, 72, 9365-9369).

En la actualidad, existen opciones de tratamiento limitadas para los individuos infectados con el virus de la hepatitis C. La opción terapéutica aprobada en la actualidad es el uso de inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina. Esta terapia está limitada en su eficacia clínica y solo un 50 % de los pacientes tratados responden a la terapia. Por lo tanto, existe una necesidad significativa de terapias nuevas y más eficaces para abordar la necesidad médica no satisfecha planteada por la infección del VHC.

En la actualidad se han identificado diversas dianas moleculares potenciales para el desarrollo farmacológico de antivirales de acción directa como agentes terapéuticos anti-VHC que incluyen, pero no se limitan a, la autoproteasa NS2-NS3, la proteasa N3, la helicasa N3 y la polimerasa NS5B. La ARN polimerasa dependiente de ARN es absolutamente esencial para la replicación del genoma de ARN monocatenario de sentido positivo y esta enzima ha suscitado un considerable interés entre los químicos medicinales.

Se han revisado inhibidores de la NS5B del VHC como terapias potenciales para infección por VHC: Tan, S.-L., *et al.*, *Nature Rev. Drug Discov.*, 2002, 1.867-881; Walquer, M.P. *et al.*, *Exp. Opin. Investigational Drugs*, 2003, 12, 1269-1280; Ni, Z.-J., *et al.*, *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2004, 7, 446-459; Beaulieu, P. L., *et al.*, *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2004, 5, 838-850; Wu, J., *et al.*, *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2003, 3, 207-219; Griffith, R.C., *et al.*, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 2004, 39, 223-237; Carrol, S., *et al.*, *Infectious Disorders-Drug Targets*, 2006, 6, 17-29. El potencial de aparición de cepas resistentes del VHC y la necesidad de identificar agentes con una amplia cobertura de genotipo apoyan la necesidad de los esfuerzos continuos para identificar nucleósidos nuevos y más eficaces como inhibidores de NS5B del VHC.

Los inhibidores de nucleósido de la polimerasa NS5B pueden actuar como un sustrato no natural que da como resultado terminación de cadena o como un inhibidor competitivo que compite con la unión del nucleótido a la polimerasa. Para funcionar como terminador de cadena, la célula debe captar el análogo de nucleósido y convertirlo *in vivo* en un trifosfato para competir por el sitio de unión del nucleótido en la polimerasa. Esta conversión en el trifosfato está mediada habitualmente por quinasas celulares, lo que imparte los requisitos estructurales adicionales a un

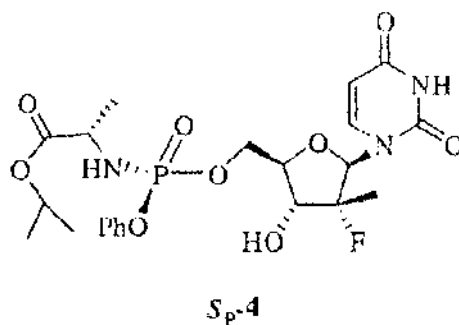
inhibidor potencial de polimerasa de nucleósido. Desafortunadamente, esto limita la evaluación directa de los nucleósidos como inhibidores de la replicación del VHC en ensayos basados en células capaces de fosforilación *in situ*.

5 En algunos casos, la actividad biológica de un nucleósido se ve obstaculizada por sus malas características de sustrato para las una o más quinasas necesarias para convertirlo en la forma de trifosfato activa. Generalmente, se considera la formación del monofosfato por una nucleósido quinasas como la etapa limitante de la velocidad de los tres sucesos de fosforilación. Para sortear la necesidad de la etapa de fosforilación inicial en el metabolismo de un nucleósido en el análogo de trifosfato activo, se ha informado de la preparación de profármacos de fosfato estables. Se ha mostrado que los profármacos de nucleósido fosforamidato son precursores del trifosfato de nucleósido activo e inhiben la replicación viral cuando se administran a células completas con infección viral (McGuigan, C., *et al.*, J. Med. Chem., 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., *et al.*, J. Med. Chem., 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., *et al.*, Proc. National Acad Sci USA, 1996, 93, 7295-7299; Siddiqui, A. Q., *et al.*, J. Med. Chem., 1999, 42, 4122-4128; Eisenberg, E. J., *et al.*, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2001, 20, 1091-1098; Lee, W.A., *et al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49, 1898); documentos de Patente WO 2010/135569; US 2006/0241064; y WO 2007/095269.

También limitante de la utilidad de los nucleósidos como agentes terapéuticos viables es sus a veces malas propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. Estas malas propiedades pueden limitar la absorción intestinal de un agente y limitar la captación en el tejido o célula diana. Se han empleado profármacos de nucleósidos para mejorar sus propiedades. Se ha demostrado que la preparación de fosforamidatos de nucleósido mejora la absorción sistémica de un nucleósido y además el resto de fosforamidato de estos "pronucleótidos" está enmascarado con grupos lipofílicos neutros para obtener un coeficiente de reparto adecuado que optimice la captación y el transporte al interior de la célula mejorando drásticamente la concentración intracelular del análogo de monofosfato de nucleósido con respecto a la administración del nucleósido precursor solo. La hidrólisis mediada por enzimas del resto de éster de fosfato produce un monofosfato de nucleósido en el que es innecesaria la fosforilación inicial limitante de la velocidad. Para este fin, el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/053.015, que corresponde con los documentos de Patente WO 2008/121634 y US 2010/0016251, desvela diversos profármacos de fosforamidato de nucleósido, muchos de los cuales muestran actividad en un ensayo de VHC. Se sometieron a ensayo varios compuestos desvelados en el documento de Patente US 2010/0016251 como candidatos clínicos potenciales para la aprobación por la FDA.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino representado por la fórmula S_p-4 :



40 que tiene reflexiones 2θ de XRPD ($^\circ$) a aproximadamente: 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8, y 23,3.

De acuerdo con una realización, el (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino tiene reflexiones 2θ de XRPD ($^\circ$) a aproximadamente: 6,08, 8,2, 10,38, 10,85, 12,17, 12,7, 13,73, 14,1, 15,91, 16,83, 17,17, 17,66, 17,95, 18,79, 19,1, 19,41, 19,8, 20,11, 20,82, 21,81, 22,03, 23,03, 23,26, 23,64, 23,89, y 24,73 con intensidades (%) de 66,7, 62,1, 29,8, 10,4, 12,0, 66,4, 14,9, 13,8, 3,1, 8,7, 19,7, 56,2, 37,7, 59,0, 14,3, 37,2, 46,0, 68,8, 100,0, 36,8, 7,4, 14,2, 21,6, 6,3, 7,0, y 3,3, respectivamente.

50 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino del primer aspecto y un medio farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica comprende otro agente antiviral. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una

realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino del primer aspecto para su uso como un medicamento.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino del primer aspecto para su uso en el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C, opcionalmente en combinación con otro agente antiviral. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un medicamento que comprende el (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino del primer aspecto. De acuerdo con una realización, el medicamento comprende otro agente antiviral. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino del primer aspecto y otro agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Difractograma de XRD de alta resolución de **4**.

Figura 2. Difractograma de XRD de alta resolución de R_p -**4**.

Figura 3. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4** (Forma 1).

Figura 4. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4** (Forma 1).

Figura 5. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4**·CH₂Cl₂ (Forma 2).

Figura 6. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4**·CHCl₃ (Forma 3).

Figura 7. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4** (Forma 4).

Figura 8. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4** (Forma 5).

Figura 9. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4** (amorfo).

Figura 10. Estructura cristalina de rayos X para S_p -**4** (Forma 1)

Figura 11. Estructura cristalina (isotrópica) de rayos X para S_p -**4**·CH₂Cl₂ (Forma 2)

Figura 12. Estructura cristalina (anisotrópica) de rayos X para S_p -**4**·CH₂Cl₂ (Forma 2)

Figura 13. Estructura cristalina de rayos X para S_p -**4**·CHCl₃ (Forma 3)

Figura 14. Espectro de FT-IR de **4**.

Figura 15. Espectro de FT-IR de R_p -**4**.

Figura 16. Espectro de FT-IR de S_p -**4**

Figura 17. Análisis de TGA y DSC de **4**.

Figura 18. Análisis de TGA y DSC de R_p -**4**.

Figura 19. Análisis de TGA y DSC de S_p -**4**.

Figura 20A. Estructura cristalina de rayos X para **8** (isómero S_p) (molécula nº 1 de la unidad asimétrica).

Figura 20B. Estructura cristalina de rayos X para **8** (isómero S_p) (molécula nº 2 de la unidad asimétrica).

Figura 21. Difractograma de XRD de alta resolución de S_p -**4** (Forma 6).

Figura 22A. Estructura cristalina de rayos X para (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo (molécula nº 1 de la unidad asimétrica).

Figura 22B. Estructura cristalina de rayos X para (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo (molécula nº 2 de la unidad asimétrica).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La expresión "un" o "una" entidad, como se usa el presente documento, se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos o al menos un compuesto. Como tal, las expresiones "un" (o "uno" o "una"), "uno o más", y "al menos un" se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento.

5 Los términos "opcional" u "opcionalmente", como se usan en el presente documento, significan que un suceso o circunstancia descrito posteriormente puede producirse pero no necesita producirse, y que la descripción incluye los casos en los que el suceso o circunstancia se produce y los casos en los que no. Por ejemplo, "enlace opcional" significa que el enlace puede estar o no estar presente, y que la descripción incluye enlaces individuales, dobles, o triples.

10 El término "P*" significa que el átomo de fósforo es quiral y que tiene la correspondiente denominación "R" o "S" de Cahn-Ingold-Prelog que tiene su significado evidente aceptado.

15 El término "purificado", como se describe en el presente documento, se refiere a la pureza de un compuesto dado. Por ejemplo, un compuesto está "purificado" cuando el compuesto dado es un componente principal de la composición, es decir, al menos un 50 % p/p puro. Por tanto, "purificado" incluye al menos un 50 % p/p de pureza, al menos un 60 % p/p de pureza, al menos un 70 % de pureza, al menos un 80 % de pureza, al menos un 85 % de pureza, al menos un 90 % de pureza, al menos un 92 % de pureza, al menos un 94 % de pureza, al menos un 96 % de pureza, al menos un 97 % de pureza, al menos un 98 % de pureza, al menos un 99 % de pureza, al menos un 99,5 % de pureza, y al menos un 99,9 % de pureza, en el que "básicamente puro" incluye al menos un 97 % de pureza, al menos un 98 % de pureza, al menos un 99 % de pureza, al menos un 99,5 % de pureza, y al menos un 99,9 % de pureza.

20 El término "metabolito", como se usa el presente documento, se refiere a un compuesto producido *in vivo* después de la administración a un sujeto con necesidad del mismo.

25 El término "aproximadamente" (también representado por ~) significa que el valor numérico enumerado es parte de un intervalo que varía dentro del error experimental estándar.

30 La expresión "básicamente como se muestra en..." un patrón de XRPD especificado significa que las posiciones de pico mostradas en el patrón de XRPD son básicamente las mismas, con inspección o recursos visuales para seleccionar la lista de picos ($\pm 0,2^\circ 2\theta$). El experto en la materia entenderá que las intensidades pueden variar dependiendo de la muestra.

35 La expresión "básicamente anhidro" significa que una sustancia contiene como máximo un 10 % en peso de agua, preferentemente como máximo un 1 % en peso de agua, más preferentemente como máximo un 0,5 % en peso de agua, y lo más preferentemente como máximo un 0,1 % en peso de agua.

40 Un disolvente o antidisolvente (como se usa en reacciones, cristalización, etc. o disolventes de red cristalina y/o adsorbidos) incluye al menos uno de un alcohol C₁ a C₈, un éter C₂ a C₈, una cetona C₃ a C₇, un éster C₃ a C₇, un clorocarburo C₁ a C₂, un nitrilo C₂ a C₇, un disolvente diverso, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂, y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂.

45 El alcohol C₁ a C₈ se refiere a un alcohol lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número de carbonos. El alcohol C₁ a C₈ incluye, pero no se limita a, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, hexanol, y ciclohexanol.

50 El éter C₂ a C₈ se refiere a un éter lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número de carbonos. El éter C₂ a C₈ incluye, pero no se limita a, dimetil éter, dietil éter, di-isopropil éter, di-n-butil éter, metil-t-butil éter (MTBE), tetrahidrofurano, y dioxano.

La cetona C₃ a C₇ se refiere a una cetona lineal/ramificada y/o cíclica/acíclica que tiene tal número de carbonos. La cetona C₃ a C₇ incluye, pero no se limita a, acetona, metil etil cetona, propanona, butanona, metil isobutil cetona, metil butil cetona, y ciclohexanona.

55 El éster C₃ a C₇ se refiere a un éster lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número de carbonos. El éster C₃ a C₇ incluye, pero no se limita a, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de n-butilo, etc.

60 El clorocarburo C₁ a C₂ se refiere a un clorocarburo que tiene tal número de carbonos. El clorocarburo C₁ a C₂ incluye, pero no se limita a, cloroformo, cloruro de metileno (DCM), tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, y tetracloroetano.

Un nitrilo C₂ a C₇ se refiere a un nitrilo que tiene tal número de carbonos. El nitrilo C₂ a C₇ incluye, pero no se limita a, acetonitrilo, propionitrilo, etc.

65 Un disolvente diverso se refiere a un disolvente empleado habitualmente en química orgánica, que incluye, pero no se limita a, dietilenglicol, diglime (dietilenglicol dimetil éter), 1,2-dimetoxi-etano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, glicerina, hexametilfosforamida, hexametilfósforo triamida, N-metil-2-pirrolidinona, nitrometano, piridina,

trietilamina, y ácido acético.

La expresión hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂ se refiere a un hidrocarburo lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico. El hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂ incluye, pero no se limita a, n-pentano, éter de petróleo (ligroína), n-hexano, n-heptano, ciclohexano, y cicloheptano.

La expresión hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂ se refiere a hidrocarburos sustituidos y sin sustituir que tienen un grupo fenilo en su cadena principal. Los hidrocarburos preferentes incluyen benceno, xileno, tolueno, clorobenceno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, xilenos, siendo el tolueno más preferente.

El término "halo" o "halógeno", como se usa en el presente documento, incluye cloro, bromo, yodo y flúor.

La expresión "grupo bloqueador" se refiere a un grupo químico que exhibe las siguientes características. El "grupo" deriva de un "compuesto protector". Los grupos que son selectivos para hidroxilos primarios sobre hidroxilos secundarios que se pueden poner en condiciones consistentes con la estabilidad del fosforamidato (pH 2-8) e impartir en el producto resultante propiedades físicas básicamente diferentes permiten una separación más fácil del producto de 3'-fosforamidato-5'-nuevo grupo del compuesto deseado que no ha reaccionado. El grupo debe reaccionar selectivamente con buen rendimiento para dar un sustrato protegido que es estable en las reacciones proyectadas (véase Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª ed. T. W. Greene y P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1999). Algunos ejemplos de grupos incluyen, pero no se limitan a: benzoílo, acetilo, benzoílo sustituido con fenilo, tetrahidropiraniolo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-ilo), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-ilo) o 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo SO₂-alquilo, SO₂-arilo, *terc*-butildimetilsililo, *terc*-butildifenilsililo. Se consideran grupos posibles los acetales, tales como MOM o THP y similares. También se contemplan los compuestos fluorados en la medida en que se pueden unir al compuesto y se pueden retirar selectivamente haciéndolos pasar a través de un medio de extracción fluoroso en fase sólida (FluoroFlash®). Un ejemplo específico incluye un análogo de tritilo fluorado, el análogo de tritilo 1-[4-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)fenil]-1,1-difenilmetanol. También se contemplan otros análogos fluorados de tritilo, BOC, FMOC, CBz, etc. Los cloruros de sulfonilo tales como cloruro de p-toluenosulfonilo pueden reaccionar selectivamente en la posición 5'. Se podrían formar ésteres selectivamente tales como acetatos y benzoatos. También se usan anhídridos dicarboxílicos tales como anhídrido succínico y sus derivados para generar una unión éster con un ácido carboxílico libre, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, adipilo, pimelilo, superilo, azelaílo, sebacilo, ftalilo, isoftalilo, tereftalilo, etc. El ácido carboxílico libre aumenta drásticamente la polaridad y también se puede usar como un asa para extraer el producto de reacción en fases acuosas débilmente básicas tales como soluciones de bicarbonato sódico. El grupo fosforamidato es relativamente estable en medios ácidos, de modo que también se podrían usar grupos que requieran condiciones de reacción ácidas, tales como, tetrahidropiraniolo.

La expresión "grupo protector" que deriva de un "compuesto protector", tiene su significado evidente y habitual, es decir, al menos un grupo protector o bloqueador se une al menos a un grupo funcional (por ejemplo, -OH, -NH₂, etc.) que permite la modificación química de al menos un grupo funcional distinto. Algunos ejemplos de grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, benzoílo, acetilo, benzoílo sustituido con fenilo, tetrahidropiraniolo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-ilo), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-ilo) o 9-(p-metoxifenil)xantin-9-ilo (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, C(O)O(alquilo inferior), C(O)O(alquilo inferior)arilo (por ejemplo, -C(O)OCH₂Ph), C(O)Oarilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, un grupo protector que comprende al menos un átomo de silicio, tal como, *terc*-butildimetilsililo, *terc*-butildifenilsililo, Si(alquilo inferior)₂OSi(alquilo inferior)₂OH (tal como, -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH).

La expresión "compuesto protector", como se usa en el presente documento y a menos que se defina otra cosa, se refiere a un compuesto que contiene un "grupo protector" y que es capaz de reaccionar con un compuesto que contiene grupos funcionales que se pueden proteger.

La expresión "grupo saliente", como se usa en el presente documento, tiene el mismo significado que para el experto en la materia (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure - cuarta edición de Jerry March, John Wiley & Sons Ed.; 1992 páginas 351-357) y representa un grupo que es parte de y está unido a una molécula sustrato; en una reacción donde la molécula sustrato experimenta una relación de desplazamiento (por ejemplo, con un nucleófilo), entonces se desplaza el grupo saliente. Algunos ejemplos de grupos salientes incluyen, pero no se limitan a: halógeno (F, Cl, Br, y I), preferentemente Cl, Br, o I; tosionato, mesilato, acetato, alcanforosulfonato, arilóxido, y arilóxido sustituido con al menos un grupo atradores de electrones (por ejemplo, p-nitrofenóxido, 2-clorofenóxido, 4-clorofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, pentafluorofenóxido, etc.), etc. Aquí, se acuerda que la expresión "grupo atradores de electrones" tiene su significado evidente. Algunos ejemplos de grupos atradores de electrones incluyen, pero no se limitan a, un halógeno, -NO₂, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)(arilo), -C(O)O(alquilo inferior), -C(O)O(arilo), etc.

La expresión "reactivo básico", como se usa en el presente documento, significa un compuesto que es capaz de desprotonar un grupo hidroxilo. Algunos ejemplos de reactivos básicos incluyen, pero no se limitan a, un alcóxido inferior ((alquilo inferior)OM) en combinación con un disolvente alcohólico, donde los alcóxidos inferiores incluyen,

pero no se limitan a, MeO⁻, EtO⁻, ⁿPrO⁻, ⁱPrO⁻, ^tBuO⁻, ⁱAmO⁻ (iso-amilóxido), etc., y donde M es un catión de metal alcalino, tal como Li⁺, Na⁺, K⁺, etc. Los disolventes alcohólicos incluyen (alquilo inferior)OH, tales como, por ejemplo, MeOH, EtOH, ⁿPrOH, ⁱPrOH, ^tBuOH, ⁱAmOH, etc. También se pueden usar bases no alcoxi tales como hidruro sódico, hexametildisilazano sódico, hexametildisilazano de litio, diisopropilamida de litio, hidruro de calcio, carbonato sódico, carbonato potásico, carbonato de cesio, DBU, DBN, reactivos del Grignard, tales como (alquilo inferior)Mg(halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, MeMgCl, MeMgBr, ^tBuMgCl, ⁱBuMgBr, etc.

El término "base" incluye la expresión "reactivo básico" y pretende incluir un compuesto que es capaz de desprotonar un compuesto que contiene protones, es decir, una base de Brønsted. Además de los ejemplos enumerados anteriormente, algunos ejemplos adicionales de una base incluyen, pero no se limitan a piridina, colidina, 2,6-(alquilo inferior)-piridina, dimetil-anilina, imidazol, N-metil-imidazol, pirazol, N-metil-pirazol, trietilamina, di-isopropiletilamina, etc.

La expresión "base no nucleofílica" significa un compuesto que es capaz de actuar como una base de Brønsted, pero que tiene baja nucleofilicidad. Algunos ejemplos de bases no nucleofílicas incluyen, pero no se limitan a, carbonato potásico, carbonato de cesio, di-isopropilamina, di-isopropiletilamina, trietilamina, quinuclidina, naftaleno-1,8-diamina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, 1,8-diazabicyclo[4.3.0]nono-7-eno, 4-dimetilamino-piridina, piridina, una 2,6-di-alquil C1-6-piridina, una 2,4,6-tri-alquil C1-6-piridina, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]nono-5-eno, y 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano.

Se acuerda que la expresión "grupo atractores de electrones" tiene su significado evidente. Algunos ejemplos de grupos atractores de electrones incluyen, pero no se limitan a, un halógeno (F, Cl, Br, o I), -NO₂, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)(arilo), -C(O)O(alquilo inferior), -C(O)O(arilo), etc.

El término "cocrystalatos" incluye cocrystalatos de 4, *R_P-4*, o *S_P-4* en combinación con sales, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables.

El término "sales", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende un catión y un anión, que se puede producir por la protonación de un resto aceptor de protones y la desprotonación de un resto donador de protones. Se debe observar que la protonación del resto aceptor de protones da como resultado la formación de una especie catiónica en la que la carga se equilibra con la presencia de un anión fisiológico, mientras que la desprotonación del resto donador de protones da como resultado la formación de una especie aniónica en la que la carga se equilibra con la presencia de un catión fisiológico.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formada con ácidos orgánicos tales como ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido salicílico, ácido mucónico, y similares o (2) sales de adición básica formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos inorgánicos enumerados anteriormente, en las que las bases conjugadas comprenden un componente catiónico seleccionado entre Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, NH₄⁺, en el que Rⁿ es un alquilo C₁₋₃ y g es un número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, o 4. Se debería entender que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolvente (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos) como se definen en el presente documento, de la misma sal de adición de ácido.

El término "alquilo" se refiere a un residuo de hidrocarburo monovalente, saturado, de cadena ramificada o sin ramificar, que contiene de 1 a 30 átomos de carbono. La expresión "alquilo C_{1-M}" se refiere a un alquilo que comprende de 1 a M átomos de carbono, donde M es un número entero que tiene los siguientes valores: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30. El término "alquilo C₁₋₄" se refiere a un alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. El término "alquilo inferior" indica un residuo de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono. "Alquilo C₁₋₂₀", como se usa en el presente documento, se refiere a un alquilo que comprende de 1 a 20 átomos de carbono. "Alquilo C₁₋₁₀", como se usa en el presente documento, se refiere a un alquilo que comprende de 1 a 10 carbonos. Algunos ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo inferior que incluyen metilo, etilo, propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *i*-butilo, *t*-butilo o pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, y octilo. El término (ar)alquilo o (heteroaril)alquilo indica que el grupo alquilo esta opcionalmente sustituido con un grupo arilo o heteroarilo, respectivamente.

El término "alqueno" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo sin sustituir que tiene de 2 a 10 átomos de carbono que tiene uno o dos dobles enlaces olefínicos, preferentemente un doble enlace olefínico. La expresión "alqueno C_{2-N}" se refiere a un alqueno que comprende de 2 a N átomos de carbono, donde N es un número entero que tiene los siguientes valores: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. La expresión "alqueno C₂₋₁₀" se refiere a un alqueno que comprende de 2 a 10 átomos de carbono. La expresión "alqueno C₂₋₄" se refiere a un alqueno que comprende de 2 a 4 átomos de carbono. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 1-propeno, 2-propeno (alilo) o

2-butenilo (crotilo).

El término "arilo", como se usa el presente documento, y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a fenilo (Ph), bifenilo, o naftilo sustituido o sin sustituir, y preferentemente el término arilo se refiere a fenilo sustituido o sin sustituir.

5 El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más restos seleccionados entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, y fosfonato, sin proteger, o protegido según sea necesario, como conocen los expertos en la materia, por ejemplo, como se enseña en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

10 El término "arilóxido", como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a fenóxido (PhO-), p-fenil-fenóxido (p-Ph-PhO-), o naftóxido sustituido o sin sustituir, y preferentemente el término arilóxido se refiere a fenóxido sustituido o sin sustituir. El grupo arilóxido puede estar sustituido con uno o más restos seleccionados entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)O(alquilo inferior), amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, y fosfonato, sin proteger, o protegido según sea necesario, como conocen los expertos en la materia, por ejemplo, como se enseña en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

15 El término "preparación" o la expresión "forma de dosificación" pretende incluir formulaciones tanto sólidas como líquidas del compuesto activo y el experto en la materia entenderá que el ingrediente activo puede existir en diferentes preparaciones dependiendo de la dosis deseada y los parámetros farmacocinéticos.

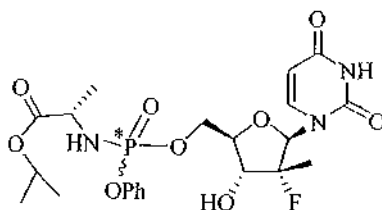
20 El término "excipiente", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que se usa para preparar una composición farmacéutica, y es generalmente seguro, no tóxico y ni biológicamente ni de otro modo indeseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano.

25 El término "cristalino" se refiere a una situación donde una muestra sólida de S_{P-4} o R_{P-4} tiene características cristalinas cuando se determina mediante difracción de rayos X de polvo o una técnica de rayos X de cristal individual.

30 El término "de tipo cristalino" se refiere a una situación donde una muestra sólida de S_{P-4} o R_{P-4} tiene características cristalinas cuando se determina mediante unos medios, por ejemplo, visualmente o mediante microscopía óptica o de polarización, pero no tiene características cristalinas cuando se determina mediante otros medios, por ejemplo, difracción de rayos X de polvo. Los métodos de determinación visual de la cristalinidad de una muestra sólida mediante microscopía visual u óptica o de polarización se desvelan en los documentos USP <695> y <776>, los cuales se incorporan por referencia. Una muestra sólida de S_{P-4} o R_{P-4} que es "de tipo cristalino" puede ser cristalina en ciertas condiciones pero puede volverse no cristalina cuando se somete a otras condiciones.

35 El término "amorfo" se refiere a una situación donde una muestra sólida de S_{P-4} o R_{P-4} no es ni cristalina ni de tipo cristalino.

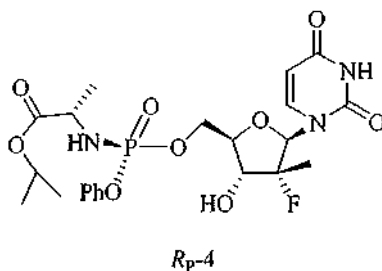
40 En el presente documento se desvela un compuesto representado por la fórmula 4:



4

45 en la que P* representa un átomo de fósforo quiral. Debido al átomo de fósforo quiral, el compuesto representado por la fórmula 4 comprende dos diastereómeros denominados R_{P-4} y S_{P-4} . El compuesto representado por la fórmula 4 también puede ser parte de un solvato, un hidrato, o un solvato/hidrato mixto, el solvato se denomina $4 \cdot nS$, mientras que el hidrato se denomina $4 \cdot mH_2O$, donde S es un disolvente de red cristalina, n varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 y m varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula 4 podría no existir como solvato o hidrato, pero tener cierta cantidad ventajosa de disolvente (S) o agua adsorbida. En este caso, la cantidad de S o agua puede variar de aproximadamente un 0 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso basado en el peso del compuesto representado por la fórmula 4. El compuesto representado por la fórmula 4 y los solvatos e hidratos del mismo es cristalino, de tipo cristalino, o amorfo.

55 También se desvela en el presente documento un compuesto representado por la fórmula R_{P-4} :



El compuesto representado por la fórmula R_{P-4} también puede ser parte de un solvato, un hidrato, o un solvato/hidrato mixto. El solvato se denomina $R_{P-4} \cdot nS$, mientras que el hidrato se denomina $R_{P-4} \cdot mH_2O$, donde S es un disolvente de red cristalina, n varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 y m varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula R_{P-4} podría no existir como solvato, hidrato, o solvato/hidrato mixto, pero tener cierta cantidad ventajosa adsorbida de disolvente (S), agua, o tanto S como agua. En este caso, la cantidad de S o agua puede variar de aproximadamente un 0 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso basado en el peso del compuesto representado por la fórmula R_{P-4} . El compuesto representado por la fórmula R_{P-4} y los solvatos e hidratos del mismo es cristalino, de tipo cristalino, o amorfo.

También se desvela en el presente documento R_{P-4} cristalino.

También se desvela en el presente documento R_{P-4} cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 6,6, 7,1, 9,0, 11,6, 17,9, 20,7, 24,1, 24,4, y 26,2.

También se desvela en el presente documento un R_{P-4} cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 6,6, 7,1, 9,0, 11,0, 11,6, 12,0, 16,0, 17,9, 19,6, 20,7, 21,0, 21,7, 21,9, 22,2, 23,1, 24,1, 24,4, 26,1, 27,3, 27,7, y 28,2.

También se desvela en el presente documento R_{P-4} cristalino que tiene un patrón de difracción de XRPD básicamente como se muestra en la Figura 2.

También se desvela en el presente documento R_{P-4} que tiene los siguientes picos de FT-IR (cm^{-1}): 1742, 1713, 1679, 1460, 1377, 1259, 1157, y 1079.

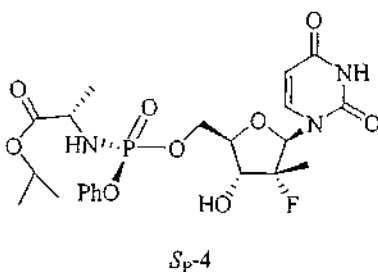
También se desvela en el presente documento R_{P-4} que tiene un espectro de FT-IR básicamente como se muestra en la Figura 15.

También se desvela en el presente documento R_{P-4} básicamente puro.

También se desvela en el presente documento R_{P-4} cristalino básicamente puro.

También se desvela en el presente documento R_{P-4} amorfo básicamente puro.

También se desvela en el presente documento un compuesto representado por la fórmula S_{P-4} :



El compuesto representado por la fórmula S_{P-4} también puede ser parte de un solvato, un hidrato, o un solvato/hidrato mixto. El solvato se denomina $S_{P-4} \cdot nS$, mientras que el hidrato se denomina $S_{P-4} \cdot mH_2O$, donde S es un disolvente de red cristalina, n varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 y m varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula S_{P-4} podría no existir como solvato o hidrato, pero tener cierta cantidad ventajosa adsorbida de disolvente (S) o agua. En este caso, la cantidad de S o agua puede variar de aproximadamente un 0 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso basado en el peso del compuesto representado por la fórmula S_{P-4} . El compuesto representado por la fórmula S_{P-4} y los solvatos e hidratos del mismo es cristalino, de tipo cristalino, o amorfo.

También se desvela en el presente documento Sp-4 cristalino.

5 También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino monoclinico, que tiene preferentemente los siguientes parámetros de celda unidad $a \sim 12,88 \text{ \AA}$, $b \sim 6,17 \text{ \AA}$, $c \sim 17,73 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 92,05^\circ$.

También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino monoclinico, que tiene preferentemente los siguientes parámetros de celda unidad $a \sim 20,09 \text{ \AA}$, $b \sim 6,10 \text{ \AA}$, $c \sim 23,01 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 112,29^\circ$.

10 También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino monoclinico, que tiene preferentemente los siguientes parámetros de celda unidad $a \sim 12,83 \text{ \AA}$, $b \sim 6,15 \text{ \AA}$, $c \sim 17,63 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 91,75^\circ$.

También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino monoclinico, que tiene preferentemente los siguientes parámetros de celda unidad $a \sim 12,93 \text{ \AA}$, $b \sim 6,18 \text{ \AA}$, $c \sim 18,01 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 96,40^\circ$.

15 También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 5,2, 7,5, 9,6, 16,7, 18,3, 22,2.

20 También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 5,0, 7,3, 9,4, y 18,1.

También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 4,9, 6,9, 9,8, 19,8, 20,6, 24,7, y 26,1.

25 También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 6,9, 9,8, 19,7, 20,6, y 24,6.

También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 5,0, 6,8, 19,9, 20,6, 20,9, y 24,9.

30 También se desvela en el presente documento un Sp-4 cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 5,2, 6,6, 7,1, 15,7, 19,1, y 25,0.

35 También se desvela en el presente documento Sp-4 cristalino que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8, y 23,3.

También se desvela en el presente documento Sp-4 cristalino que tiene un patrón de difracción de XRPD básicamente como el que se muestra en una cualquiera de la Figura 3, la Figura 4, la Figura 5, la Figura 6, la Figura 7, la Figura 8, y la Figura 21.

40 También se desvela en el presente documento Sp-4 que tiene los siguientes picos de FT-IR (cm^{-1}) a aproximadamente: 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208, y 1082.

45 También se desvela en el presente documento Sp-4 que tiene un espectro de FT-IR básicamente como el que se muestra en la Figura 7.

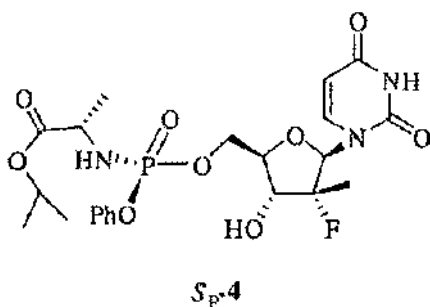
También se desvela en el presente documento Sp-4 básicamente puro.

También se desvela en el presente documento Sp-4 cristalino básicamente puro.

50 También se desvela en el presente documento Sp-4 amorfo básicamente puro.

Realizaciones:

55 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona (S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino representado por la fórmula Sp-4:



que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8, y 23,3.

5 De acuerdo con una realización, el (S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino tiene reflexiones 2θ de XRPD ($^\circ$) a aproximadamente: 6,08, 8,2, 10,38, 10,85, 12,17, 12,7, 13,73, 14,1, 15,91, 16,83, 17,17, 17,66, 17,95, 18,79, 19,1, 19,41, 19,8, 20,11, 20,82, 21,81, 22,03, 23,03, 23,26, 23,64, 23,89, y 24,73 con intensidades (%) de 66,7, 62,1, 29,8, 10,4, 12,0, 66,4, 14,9, 13,8, 3,1, 8,7, 19,7, 56,2, 37,7, 59,0, 14,3, 37,2, 46,0, 68,8, 100,0, 36,8, 7,4, 14,2, 21,6, 6,3, 7,0, y 3,3, respectivamente.

15 El (S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino del primer aspecto de la presente invención se denomina en lo sucesivo en el presente documento "Sp-4 cristalino de la presente invención".

Dosificación, administración, y uso

20 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el Sp-4 cristalino de la presente invención y un medio farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica comprende otro agente antiviral. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

25 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el Sp-4 cristalino de la presente invención para su uso como un medicamento.

30 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el Sp-4 cristalino de la presente invención para su uso en el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C opcionalmente en combinación con otro agente antiviral. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

35 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un medicamento que comprende Sp-4 cristalino de la presente invención. De acuerdo con una realización, el medicamento comprende otro agente antiviral. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

40 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de Sp-4 cristalino de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C.

45 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de Sp-4 cristalino de la presente invención y otro agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC. De acuerdo con una realización, el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

50 Algunos agentes virales posibles incluyen, pero no se limitan a: virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, virus de la Hepatitis A, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, poliovirus, virus de la diarrea viral bovina, virus de la encefalitis japonesa, o los virus que pertenecen a los grupos de *pestivirus*, *hepacivirus*, o *flavivirus*.

El medio farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar entre un excipiente, vehículo, diluyente, y medio equivalente.

55

El Sp-4 cristalino de la presente invención se puede formular en una amplia diversidad de formas de dosificación y vehículos de administración orales. La administración oral puede ser en forma de comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas de gelatina duras y blandas, soluciones, emulsiones, jarabes, o suspensiones. El Sp-4 cristalino de la presente invención es eficaz cuando se administra mediante administración con supositorio, entre otras vías de administración. La forma más conveniente de administración es generalmente oral usando un régimen de dosificación diario conveniente que se puede ajustar de acuerdo con la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente a la medicación antiviral. El Sp-4 cristalino de la presente invención junto con uno o más excipientes, vehículos, o diluyentes convencionales, se puede ubicar en la forma de composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación unitaria pueden estar comprendidas por ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos activos adicionales y las formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo que corresponda con el intervalo pretendido de dosificación diaria que se va a emplear. Las composiciones farmacéuticas se pueden emplear en forma de sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o líquidos tales como suspensiones, emulsiones, o cápsulas rellenas para uso oral; o en la forma de supositorios para la administración rectal o vaginal. Una preparación habitual contendrá de aproximadamente un 5 % aproximadamente un 95 % del compuesto o compuestos activos (p/p).

El Sp-4 cristalino de la presente invención se puede administrar solo pero se administrará generalmente en mezcla con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente adecuados seleccionados con respecto a la ruta destinada de administración y la práctica farmacéutica convencional.

Las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos, o un material de encapsulación. En los polvos, el vehículo es generalmente un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla generalmente con un vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Algunos vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares. Las preparaciones en forma sólida pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromas, estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares. Algunos ejemplos de formulaciones sólidas se muestran a modo de ejemplo en los documentos de Patente EP 0524579; US 2002/0142050; US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360; US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; US 6.267.985; US 6.294.192; US 6.383.471; US 6.395.300; US 6.569.463; US 6.635.278; US 6.645.528; US 6.923.988; US 6.932.983; US 7.060.294; y US 7.462.608.

Las formulaciones líquidas también son adecuadas para la administración oral e incluyen formulaciones líquidas que incluyen emulsiones, jarabes, elixires y suspensiones acuosas. Estas incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse en preparaciones en forma líquida poco antes de su uso. Algunos ejemplos de formulaciones líquidas se muestran a modo de ejemplo en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 3.994.974; 5.695.784; y 6.977.257. Se pueden preparar emulsiones en soluciones, por ejemplo, en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulgentes tales como lecitinas, monooleato de sorbitán, o goma arábiga. Se pueden preparar suspensiones acuosas por dispersión del componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y otros agentes de suspensión bien conocidos.

El Sp-4 cristalino de la presente invención se puede formular para administración en forma de supositorios. En primer lugar, se puede fundir una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos y ácidos grasos o manteca de cacao y el componente activo se dispersa de forma homogénea, por ejemplo, mediante agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte a continuación en moldes de tamaño conveniente, y se deja enfriar, y solidificar.

El Sp-4 cristalino de la presente invención se puede formular para administración vaginal. Los pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones contienen además del ingrediente activo vehículos tales como los conocidos en la técnica por ser apropiados. Ciertas de estas formulaciones también se pueden usar junto con un condón o sin agente espermicida.

Las formulaciones adecuadas junto con vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticos se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pennsylvania. El científico experto en formulación puede modificar las formulaciones sin las enseñanzas de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una vía particular de administración sin hacer inestables las composiciones que contienen los compuestos contemplados en el presente documento o comprometer su actividad terapéutica.

Además, el Sp-4 cristalino de la presente invención se puede formular junto con liposomas o micelas. En cuanto a los liposomas, se contempla que los compuestos purificados se puedan formular de una forma como se desvela en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.797.285; 5.013.556; 5.077.056; 5.077.057; 5.154.930; 5.192.549; 5.213.804; 5.225.212; 5.277.914; 5.316.771; 5.376.380; 5.549.910; 5.567.434; 5.736.155; 5.827.533; 5.882.679; 5.891.468; 6.060.080; 6.132.763; 6.143.321; 6.180.134; 6.200.598; 6.214.375; 6.224.903; 6.296.870; 6.653.455; 6.680.068; 6.726.925; 7.060.689; y 7.070.801.

En cuanto a las micelas, se contempla que los compuestos purificados se puedan formular de una forma como se desvela en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.145.684 y 5.091.188.

El término "medicamento" significa una sustancia usada en un método de tratamiento y/o profilaxis de un sujeto con necesidad del mismo, en el que la sustancia incluye, pero no se limita, una composición, una formulación, una forma de dosificación, y similares, que comprende el Sp-4 cristalino de la presente invención.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad requerida para reducir los síntomas de una enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requisitos del individuo en cada caso particular. Esa dosificación puede variar dentro de amplios límites dependiendo de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad que se va a tratar, la edad y estado general de salud del paciente, otros medicamentos con los que se está tratando al paciente, la vía y la forma de administración y las preferencias y la experiencia del practicante médico implicado. Para administración oral, una dosificación diaria entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 10 g, incluyendo todos los valores intermedios, tales como 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,050, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,175, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, y 9,5, por día debería ser apropiada en monoterapia y/o en terapia de combinación. Una dosificación diaria particular está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 g por día, incluyendo todos los valores incrementales de 0,01 g (es decir, 10 mg) intermedios, una dosificación diaria preferente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,8 g por día, más preferentemente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,6 g por día, y lo más preferentemente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,25 g por día, incluyendo cada uno de los cuales todos los valores incrementales de 0,01 g intermedios. Generalmente, el tratamiento se inicia con una "dosis de carga" inicial elevada para reducir o eliminar rápidamente el virus seguido de una disminución de la dosis hasta un nivel suficiente para prevenir la reaparición de la infección. El experto habitual en el tratamiento de las enfermedades que se describen en el presente documento podrá establecer, sin experimentación excesiva y en función de su conocimiento, experiencia y las divulgaciones de la presente solicitud, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que se desvela en el presente documento para una enfermedad y un paciente dados.

La eficacia terapéutica se puede determinar a partir de ensayos de la función hepática que incluyen, pero no se limitan a, niveles proteicos tales como proteínas séricas (por ejemplo, albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (por ejemplo, alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, γ -glutamiltranspeptidasa, etc.), síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol, y síntesis de ácidos biliares; una función metabólica hepática, que incluye, pero no se limita a, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y de amoníaco. Alternativamente, la eficacia terapéutica se puede monitorizar por medición de ARN de VHC. Los resultados de estos ensayos permitirán que se optimice la dosis.

El Sp-4 cristalino de la presente invención se puede administrar con una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente antiviral; en el que la administración es simultánea o alternativa. Se entiende que el tiempo entre la administración alternativa puede variar entre 1-24 horas, que incluye cualquier subintervalo intermedio incluyendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, y 23 horas.

Algunos ejemplos de "otro agente antiviral" incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de la proteasa NS3 del VHC (véanse los documentos de Patente EP 1881001, US 2003187018, US 2005267018, WO 2003006490, WO 200364456, WO 2004094452, WO 2005028502, WO 2005037214, WO 2005095403, WO 2007014920, WO 2007014921, WO 2007014922, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007015824, WO 2008010921, y WO 2008010921); inhibidores de NS5B del VHC (véanse los documentos de Patente US 2004229840, US 2005154056, US 2005-98125, US 20060194749, US 20060241064, US 20060293306, US 2006040890, US 2006040927, US 2006166964, US 2007275947, US 6784166, US 20072759300, WO 2002057287, WO 2002057425, WO 2003010141, WO 2003037895, WO 2003105770, WO 2004000858, WO 2004002940, WO 2004002944, WO 2004002977, WO 2004003138, WO 2004041201, WO 2004065367, WO 2004096210, WO 2005021568, WO 2005103045, WO 2005123087, WO 2006012078, WO 2006020082, WO 2006065335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO 2007039142, WO 2007039145, WO 2007076034, WO 2007088148, WO 2007092000, y WO 2007095269); inhibidores de NS4 del VHC (véanse los documentos de Patente WO 2005067900 y WO 2007070556); inhibidores de NS5a del VHC (véanse los documentos de Patente US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251, y WO 2006120252); agonistas de receptores de tipo Toll (véase el documento de Patente WO 2007093901); y otros inhibidores (véanse los documentos de Patente WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852, y WO 2004035571); y compuestos desvelados en el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/053.015, presentado el 21 de marzo de 2008 (US 2010/0016251), interferón- α , interferón- β , interferón- α pegilado, ribavirina, levovirina, viramidina, otro inhibidor nucleósido de polimerasa de VHC, un inhibidor no nucleósido de polimerasa de VHC, un inhibidor de proteasa de VHC, un inhibidor

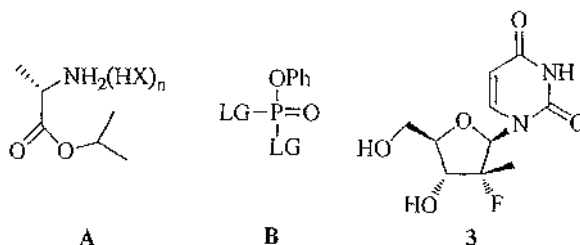
de helicasa del VHC o un inhibidor de fusión del VHC.

Cuando el S_{P-4} cristalino de la presente invención se administra en combinación con otro agente antiviral, la actividad se puede aumentar con respecto al compuesto precursor. Cuando el tratamiento es terapia de combinación, tal administración puede ser simultánea o secuencial con respecto a la de los derivados de nucleósido. "Administración simultánea", como se usa en el presente documento, incluye de ese modo la administración de los agentes al mismo tiempo o a tiempos diferentes. La administración de dos o más agentes al mismo tiempo se puede conseguir mediante una formulación individual que contiene dos o más ingredientes activos o mediante la administración básicamente simultánea de dos o más formas de dosificación con un agente activo individual.

Se ha de entender que en el presente documento las referencias al tratamiento se extienden a la profilaxis así como al tratamiento de afecciones existentes. Además, el término "tratamiento" de una infección por VHC, como se usa en el presente documento, también incluye el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o una afección asociada con o mediada por la infección por VHC, o los síntomas clínicos de la misma.

Preparación

En el presente documento se desvela un proceso para preparar uno cualquiera de los compuestos **4**, R_{P-4} , o S_{P-4} , que comprende: a) hacer reaccionar un alanato de isopropilo, **A**, un di-LG-fenilfosfato, **B**, 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende al menos uno de S_{P-4} y R_{P-4}



en la que X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y LG es un grupo saliente; b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto protector para obtener una segunda mezcla que comprende al menos uno de S_{P-4} protegido y R_{P-4} protegido; y c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con el fin de obtener **4**, S_{P-4} , o R_{P-4} .

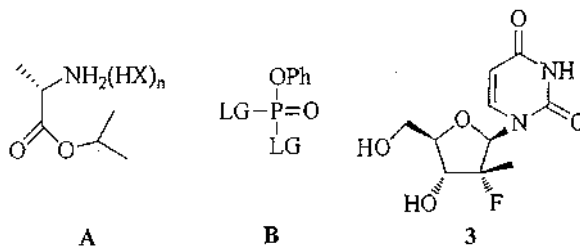
El alanato de isopropilo puede estar presente en forma de su sal de ácido clorhídrico, la cual es preferentemente, básicamente anhidra.

La base puede ser N-metilimidazol.

La proporción molar de **A**-**B**-**3** puede ser aproximadamente 1,6-a-1,3-a-1.

El compuesto protector puede ser cloruro de t-butil-dimetil-sililo.

También se desvela en el presente documento un proceso para preparar S_{P-4} o R_{P-4} , que comprende: a) hacer reaccionar un alanato de isopropilo, **A**, un di-LG-fenilfosfato, **B**, 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende al menos uno de S_{P-4} y R_{P-4}



en la que X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y LG es un grupo saliente; y b) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con el fin de obtener S_{P-4} o R_{P-4} purificado.

El proceso anterior puede incluir además purificar adicionalmente la segunda mezcla o el R_{P-4} purificado por disolución o suspensión de la segunda mezcla o la mezcla de R_{P-4} purificado en un disolvente; seguido opcionalmente por siembra con R_{P-4} cristalino; y adición de suficiente antidisolvente para obtener R_{P-4} cristalino.

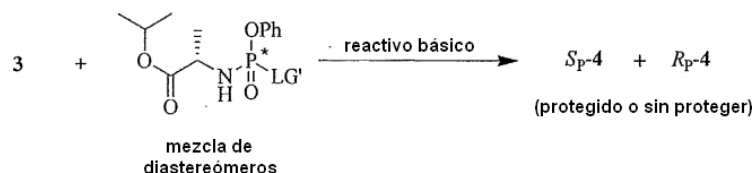
5 El proceso anterior puede incluir además purificar adicionalmente la segunda mezcla o el S_{P-4} purificado por d) disolución o suspensión de la segunda mezcla o el S_{P-4} purificado en un disolvente seguido de siembra con S_{P-4} cristalino a aproximadamente la temperatura ambiente; recogida de un primer sólido la mayoría del cual comprende S_{P-4}; disolución del primer sólido en un disolvente a su temperatura de reflujo; y refrigeración o adición de un antidisolvente para obtener un segundo sólido.

10 El proceso anterior puede incluir además purificar adicionalmente S_{P-4} por d) disolución o suspensión de la segunda mezcla o la mezcla de S_{P-4} purificado en un primer disolvente seguido de adición de un antidisolvente de modo que se obtenga una primera composición en la cual se retira el disolvente/antidisolvente residual por decantación para tener un residuo; tratamiento del residuo con una solución que contiene el primer disolvente y antidisolvente para producir una segunda composición mediante lo cual se produce un primer sólido tras reducir la presión; disolución o suspensión del primer sólido usando un segundo disolvente de modo que se obtenga una tercera composición; adición de cristales semilla de S_{P-4} a la tercera composición; recogida de un segundo sólido; disolución o suspensión del segundo sólido en un tercer disolvente, calentado opcionalmente a la temperatura de reflujo del tercer disolvente para obtener una cuarta composición, y, si fuera necesario, refrigeración de la cuarta composición para obtener un tercer sólido que comprende S_{P-4} que se recoge por filtración.

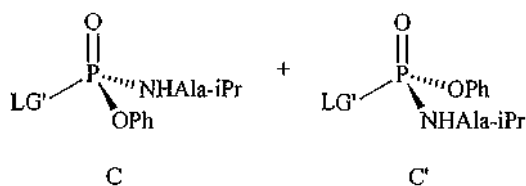
20 En el proceso anterior, S_{P-4} se puede purificar adicionalmente mediante la segunda mezcla o el S_{P-4} purificado por d) adición de gel de sílice la segunda mezcla o al S_{P-4} purificado seguido de evaporación de disolvente para proporcionar una suspensión seca; agitación de la suspensión seca en una primera combinación de disolvente/antidisolvente para obtener una primera suspensión húmeda; decantación de la primera combinación de disolvente/antidisolvente a partir de la primera suspensión húmeda para obtener una segunda suspensión húmeda y una primera composición; adición a la segunda suspensión húmeda de una segunda combinación de disolvente/antidisolvente seguido de agitación; decantación de la segunda combinación de disolvente/antidisolvente a partir de la segunda suspensión húmeda para obtener una tercera suspensión húmeda y una segunda composición; opcionalmente repetición de las etapas g)-h) sobre la tercera suspensión húmeda o las suspensiones húmedas adicionales; evaporación del disolvente a partir de la segunda composición, y opcionalmente cualquier composición adicional obtenida a partir de la etapa opcional i) para obtener un primer sólido; disolución o suspensión del primer sólido en una solución que contiene un tercer disolvente y opcionalmente un cuarto disolvente para obtener una tercera composición; opcionalmente adición de cristales semilla de S_{P-4} a la tercera composición; obtención a partir de la tercera composición de un segundo sólido que comprende S_{P-4}; y opcionalmente recristalización del segundo sólido usando un tercer disolvente para obtener un tercer sólido que comprende S_{P-4}.

35 El experto habitual en la materia entenderá que los compuestos se pueden separar mediante extracción tradicional, cristalización tradicional o técnicas cromatográficas tradicionales. Algunas técnicas cromatográficas tradicionales incluyen, pero no se limitan a, cromatografía sobre gel de sílice (usando, por ejemplo, 3-5 % de metanol en DCM o 4-6 % de isopropanol en DCM) para producir niveles aumentados de un isómero (50-100 %) y a continuación cristalizarlo. Alternativamente, se podría usar cromatografía en fase inversa (usando, por ejemplo, 1-30 % de fase móvil acuosa de acetonitrilo). Además, los compuestos se pueden aislar mediante cromatografía de fluido supercrítico SFC con dióxido de carbono como disolvente principal y alcoholes tales como etanol como modificadores, usando preferentemente los medios quirales apropiados, tales como, Daicel Chiralpack IA. Alternativamente, se puede emplear cromatografía SMB usando los medios quirales apropiados, tales como, Daicel ChiralPack IA, usando una mezcla de disolventes, tal como hexanos/isopropanol o disolventes individuales, tales como acetato de etilo.

45 También se desvela en el presente documento un proceso para preparar S_{P-4}, que comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con 3 3'-O-protégido o sin proteger, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende S_{P-4} protegido o sin proteger



50 en la que el isopropil-alanil-fosforamidato está comprendido por una mezcla de diastereómeros representada por las siguientes estructuras:



en la que la proporción de C:C' es aproximadamente 1:1.

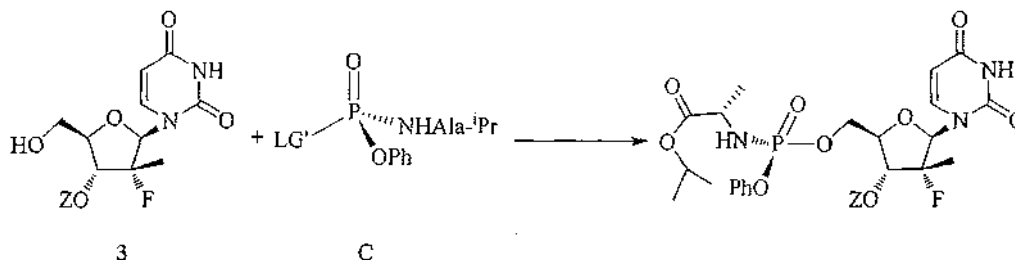
- 5 El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de C:C' puede ser mayor o igual de aproximadamente 1:1.

El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de C:C' puede ser mayor de aproximadamente 1:1.

- 10 El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción C:C' puede ser al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1, o aproximadamente 99:1.

- 15 LG' se selecciona entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido, y pentafluorofenóxido, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio, y la proporción de C:C' puede ser al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1, o aproximadamente 99:1.

- 20 El proceso anterior puede comprender a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato (**C**) con 3'-O-protegido o sin proteger, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende $\text{S}_{\text{P-4}}$ protegido o sin proteger

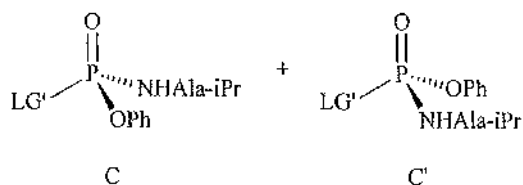


- 25 en la que Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo saliente; y b) opcionalmente someter el $\text{S}_{\text{P-4}}$ protegido o sin proteger obtenido a cromatografía, extracción, o cristalización con el fin de obtener $\text{S}_{\text{P-4}}$ protegido o sin proteger purificado. LG' puede ser tosilato, alcanforsulfonato, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo atractor de electrones; más preferentemente, LG' se puede seleccionar entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido, o pentafluorofenóxido.

Cuando $\text{S}_{\text{P-4}}$ está protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso se dirige además a la desprotección del $\text{S}_{\text{P-4}}$ protegido.

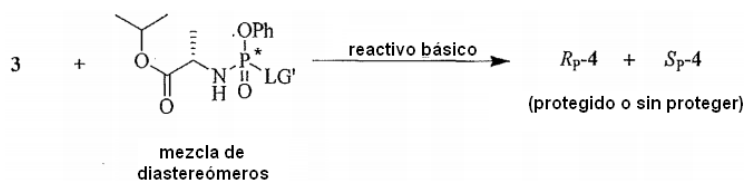
- 35 La reacción se puede llevar a cabo en un disolvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano u otro disolvente de éter solo o en combinación entre sí o con un nitrilo C_2 a C_7 , tal como acetonitrilo.

- El proceso puede comprender además 1) hacer reaccionar $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})_2$, en la que LG, independiente de LG', es un grupo saliente, con (i) alanato de isopropilo y una primera base para obtener $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$, seguido de hacer reaccionar $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$ con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, (ii) fenol y una primera base para obtener $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{OPh})$, seguido de hacer reaccionar $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{OPh})$ con alanato de isopropilo y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, o (iii) combinar alanato de isopropilo, fenol, y al menos un base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**; o 2) hacer reaccionar $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})_2$, en la que LG es un grupo saliente, con (i) alanato de isopropilo y una primera base para obtener $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$, seguido de reacción de $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$ con un precursor de grupo saliente (LG'H) y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,

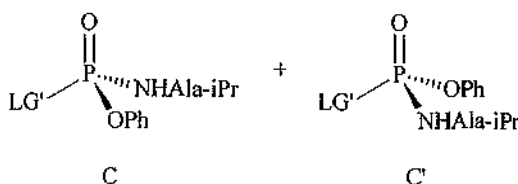


y someter la mezcla a cromatografía o cristalización de la mezcla para obtener **C**. El alanato de isopropilo puede estar presente en forma de su sal de ácido clorhídrico, la cual es preferentemente, básicamente anhidra.

5 También se desvela en el presente documento un proceso para preparar **R_p-4**, que comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con un 3 3'-O-protegido o sin proteger, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende **R_p-4** protegido o sin proteger



10 en la que el isopropil-alanil-fosforamidato está comprendido por una mezcla de diastereómeros representados por las siguientes estructuras:



15 en la que la proporción de **C':C** es aproximadamente 1:1.

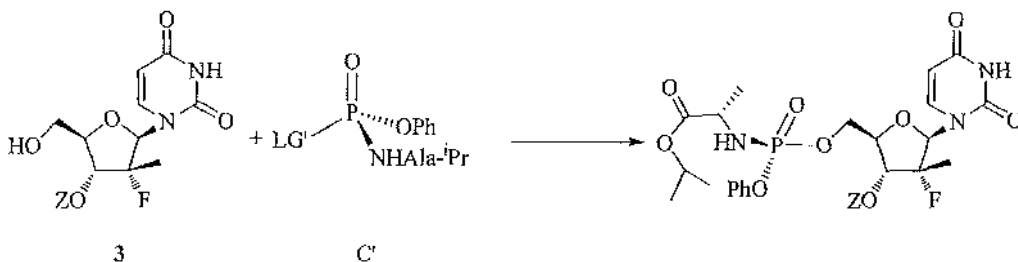
20 El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de **C':C** puede ser mayor o igual de aproximadamente 1:1.

El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de **C':C** puede ser mayor de aproximadamente 1:1.

25 El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de **C':C'** puede ser al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1, o aproximadamente 99:1.

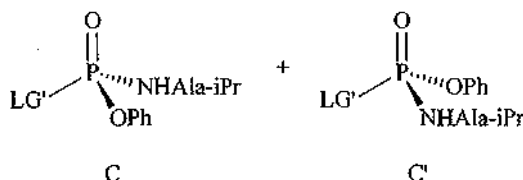
30 **LG'** puede ser p-nitrofenóxido, el reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio, y la proporción de **C':C** puede ser al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1, o aproximadamente 99:1.

35 El proceso anterior puede comprender: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato (**C'**) con un **3** 3'-O-protegido o sin proteger, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende **R_p-4** protegido o sin proteger



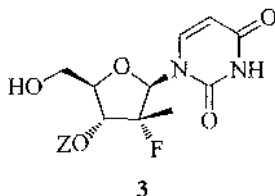
en la que Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo saliente; y b) someter opcionalmente el *R_P-4* protegido o sin proteger obtenido a cromatografía, extracción, o cristalización con el fin para obtener *R_P-4* protegido o sin proteger purificado. LG' puede ser tosilato, alcanforsulfonato, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo atractor de electrones; más preferentemente, LG' se puede seleccionar entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, y pentafluorofenóxido. Cuando *R_P-4* está protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso se dirige además a la desprotección de *R_P-4* protegido. La reacción se puede llevar a cabo en un disolvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano u otro disolvente de éter solo o en combinación entre sí o con un nitrilo C₂ a C₇, tal como acetonitrilo.

El proceso anterior puede comprender más 1) hacer reaccionar (LG')P(O)(LG)₂, en la que LG, independiente de LG', es un grupo saliente, con (i) alanato de isopropilo y una primera base para obtener (LG')P(O)(LG)(NHAla-*i*Pr), seguido de hacer reaccionar (LG')P(O)(LG)(NHAla-*i*Pr) con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, (ii) fenol y una primera base para obtener (LG')P(O)(LG)(OPh), seguido de hacer reaccionar (LG')P(O)(LG)(OPh) con alanato de isopropilo y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, o (iii) combinar alanato de isopropilo, fenol, y al menos un base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**; o 2) hacer reaccionar (PhO)P(O)(LG)₂, en la que LG', independiente de LG, es un grupo saliente, con (i) alanato de isopropilo y una primera base para obtener (PhO)P(O)(LG)(NHAla-*i*Pr), seguido de hacer reaccionar (PhO)P(O)(LG)(NHAla-*i*Pr) con un precursor de grupo saliente y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,



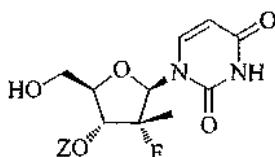
y someter la mezcla a cromatografía o cristalización de la mezcla para obtener **C'**. El alanato de isopropilo puede estar presente en forma de su sal de ácido clorhídrico, la cual es preferentemente, básicamente anhidra.

También se desvela en el presente documento un compuesto 3



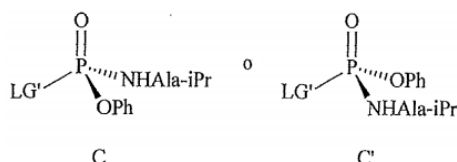
en el que Z es un grupo protector o hidrógeno; que es útil para la preparación de *R_P-4* o *S_P-4*.

El compuesto 3 se puede seleccionar entre un compuesto que tiene la siguiente estructura



- 3a:** Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃
- 3b:** Z = -C(O)OCH₂Ph
- 3c:** Z = -Si(Me)₂*t*Bu
- 3d:** Z = -Si(*i*Pr)₂OSi(*i*Pr)₂OH

También se desvela en el presente documento un compuesto, su sal, hidrato, solvato, o combinación de los mismos, representado por las siguientes estructuras



donde LG' es un grupo saliente, que es útil para la preparación de R_P-4 o S_P-4 .

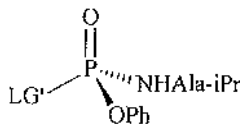
LG' puede ser tosilato, alcanforsulfonato, un arilóxido, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo atractor de electrones.

LG' se puede seleccionar entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitro-fenóxido, 2,4-diclorofenóxido, o pentafluorofenóxido.

LG' puede ser pentafluorofenóxido o 4-nitro-fenóxido.

Se desvela en los siguientes compuestos: Compuesto C, en el que LG' es 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido, o pentafluorofenóxido; compuesto C, en el que LG' es 4-nitrofenóxido o pentafluorofenóxido; compuesto C, en el que LG' es 4-nitrofenóxido; compuesto C cristalino, en el que LG' es 4-nitrofenóxido; compuesto C, en el que LG' es pentafluorofenóxido; compuesto C cristalino, en el que LG' es pentafluorofenóxido.

También se desvela en el presente documento un proceso para preparar un compuesto representado por la fórmula estructural



C

cristalizar el compuesto a partir de una composición, que comprende

- a) una primera composición;
- b) un segundo precursor de grupo saliente;
- c) una base no nucleofílica; y
- d) una composición líquida;

en la que la primera composición comprende el compuesto y su correspondiente diastereómero basado en P.

La cantidad molar del compuesto y la cantidad molar de su diastereómero basado en P pueden ser iguales o diferentes.

La cantidad molar del compuesto puede ser mayor que la cantidad molar de su correspondiente diastereómero basado en P o viceversa.

El segundo precursor de grupo saliente puede ser 2,4-dinitrofenol, 4-nitrofenol, 2-nitrofenol, 2-cloro-4-nitro-fenol, 2,4-diclorofenol, o pentafluorofenol.

LG' puede ser pentafluorofenóxido. El segundo precursor de grupo saliente puede ser pentafluorofenol. La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,01 equivalentes molares a aproximadamente 10 equivalentes molares con respecto a la cantidad molar del compuesto y su diastereómero basado en P y todos los equivalentes molares intermedios. La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,1 equivalentes molares a aproximadamente 1 equivalentes molares con respecto a la cantidad molar del compuesto y su diastereómero basado en P y todos los equivalentes molares intermedios.

La cristalización se puede producir a una temperatura que varía de aproximadamente -10 °C a aproximadamente +40 °C y todos los valores de temperatura intermedios. La cristalización se puede producir a aproximadamente temperatura ambiente.

La base no nucleofílica se puede seleccionar entre carbonato potásico, carbonato de cesio, di-isopropilamina, di-isopropiletilamina, trietilamina, quinuclidina, naftaleno-1,8-diamina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, 1,8-diazabicycloundec-7-eno, 4-dimetilamino-piridina, piridina, una 2,6-di-alquil C_{1-6} -piridina, a 2,4,6-tri-alquil C_{1-6} -piridina, y las mezclas de las mismas. En un primer subaspecto, la base no nucleofílica es trietilamina o 1,8-diazabicycloundec-7-eno. La base no nucleofílica puede ser trietilamina.

La base no nucleofílica puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 equivalentes molares a aproximadamente 10 equivalentes molares, y todos los equivalentes molares intermedios, con respecto a la cantidad molar total del compuesto y su diastereómero basado en P. La base no nucleofílica puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 equivalentes molares a aproximadamente 1 equivalente molar, y

todos los equivalentes molares intermedios, con respecto a la cantidad molar total del compuesto y su diastereómero basado en P.

5 La solubilidad del compuesto puede ser menor que la solubilidad de su correspondiente diastereómero basado en P entre la composición líquida o viceversa.

10 La composición líquida puede comprender al menos uno de un disolvente y un antidisolvente. La composición líquida puede comprender al menos uno de un alcohol C₁ a C₈, un éter C₂ a C₈, una cetona C₃ a C₇, un éster C₃ a C₇, un clorocarburo C₁ a C₂, un nitrilo C₂ a C₇, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂, y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de un éter C₂ a C₈, un éster C₃ a C₇, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂, y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de un éter C₂ a C₈, un éster C₃ a C₇, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de acetato de etilo, t-butil-metil éter, y hexano. La composición líquida puede comprender acetato de etilo y hexano. La composición líquida puede comprender t-butil-metil éter, y hexano.

15 La cantidad de composición líquida puede variar de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml por cada gramo de la primera composición y todos los valores de ml/g intermedios.

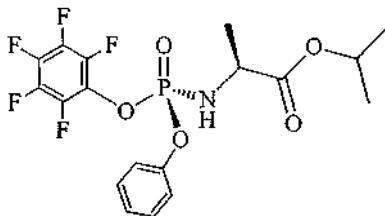
20 Se puede añadir el compuesto cristalino a la composición. El proceso puede comprender añadir de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 1 % en peso, y todos los valores de % en peso intermedios, de compuesto cristalino a la primera composición.

El proceso puede comprender además

25 a) hacer reaccionar PhOP(O)(LG)₂ y ⁱPr-Ala-NH-HCl en presencia de una primera base para obtener (PhO)P(O)(LG)(NHAla-ⁱPr);
b) hacer reaccionar (PhO)P(O)(LG)(NHAla-ⁱPr) con un primer precursor de grupo saliente (LG'H) en presencia de una segunda base para obtener la composición que comprende el compuesto y su diastereómero basado en P;

30 en el que LG y LG', independientes entre sí, son grupos salientes; en el que el primer precursor de grupo saliente y el segundo precursor del grupo saliente son iguales o diferentes; y
en el que la primera base y la segunda base son iguales o diferentes. También se desvela en el presente documento un proceso para preparar (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino que tiene la siguiente estructura,

35



que comprende:

40 cristalizar (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo a partir de una segunda composición que comprende

45 a) una primera composición;
b) pentafluorofenol;
c) una base no nucleofílica; y
d) una composición líquida;

50 en el que la segunda composición comprende (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo y (S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo.

La cantidad molar del (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo y la cantidad molar del (S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo pueden ser iguales o diferentes.

55 La cantidad molar del (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo puede ser mayor que la cantidad molar del (S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo.

La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,01 equivalentes molares a aproximadamente 10 equivalentes molares (y todos los valores de equivalentes molares intermedios) con respecto a la cantidad molar de (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo y

(S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo.

5 La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,1 equivalentes molares a aproximadamente 1 equivalente molar (y todos los valores de equivalentes molares intermedios) con respecto a la cantidad molar de (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo y (S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo.

10 La cristalización se puede producir a una temperatura que varía de aproximadamente -10 °C a aproximadamente +40 °C y todos los valores de temperatura intermedios. La cristalización se puede producir a aproximadamente temperatura ambiente.

15 La base no nucleofílica se puede seleccionar entre carbonato potásico, carbonato de cesio, di-isopropilamina, di-isopropiletilamina, trietilamina, quinuclidina, naftaleno-1,8-diamina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, 1,8-diazabicycloundec-7-eno, 4-dimetilamino-piridina, piridina, a 2,6-di-alquil C₁₋₆-piridina, a 2,4,6-tri-alquil C₁₋₆-piridina, y las mezclas de las mismas. La base no nucleofílica puede ser trietilamina o 1,8-diazabicycloundec-7-eno. La base no nucleofílica puede ser trietilamina.

20 La base no nucleofílica puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 equivalentes molares (y todos los valores de equivalentes molares intermedios) con respecto a la cantidad total de (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo y (S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo.

25 La solubilidad del (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo puede ser que la solubilidad de (S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo en la composición líquida.

La composición líquida puede comprender al menos uno de un disolvente y un antidisolvente. La composición líquida puede comprender al menos uno de un alcohol C a C₈, un éter C₂ a C₈, una cetona C₃ a C₇, un éster C₃ a C₇, un clorocarburo C a C₂, un nitrilo C₂ a C₇, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂, y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂.

30 La composición líquida puede comprender al menos uno de un éter C₂ a C₈, un éster C₃ a C₇, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂, y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de un éter C₂ a C₈, un éster C₃ a C₇, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de acetato de etilo, t-butil-metil éter, y hexano. La composición líquida puede comprender acetato de etilo y hexano. La composición líquida puede comprender t-butil-metil éter, y hexano.

35 La cantidad de composición líquida puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 ml por cada gramo (y todos los valores de ml/g intermedios) de la primera composición.

40 El proceso anterior puede comprender añadir (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino a la segunda composición, por ejemplo añadir de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 1 % en peso (y todos los valores de % en peso intermedios) de (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino basado en el peso total de (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo en la primera composición.

45 También se desvela en el presente documento (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino obtenido mediante el proceso de la decimoquinta reivindicación.

50 También se desvela en el presente documento un proceso para preparar (S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo, que comprende:

cristalizar (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo a partir de una segunda composición que comprende

- 55 a) una primera composición;
b) pentafluorofenol;
c) una base no nucleofílica; y
d) una composición líquida;

60 en el que la primera composición comprende (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo y (S)-2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo.

65 El proceso anterior para preparar (S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo, puede comprender:

poner en contacto (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo con un producto obtenido haciendo reaccionar un haluro de t-butilmagnesio con 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona con un haluro de t-butilmagnesio.

5 La puesta en contacto se puede producir en un medio que tiene una temperatura que varía de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C y todos los valores de temperatura intermedios.

10 La puesta en contacto se puede producir en un medio que tiene una temperatura que varía de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 30 °C y todos los valores de temperatura intermedios.

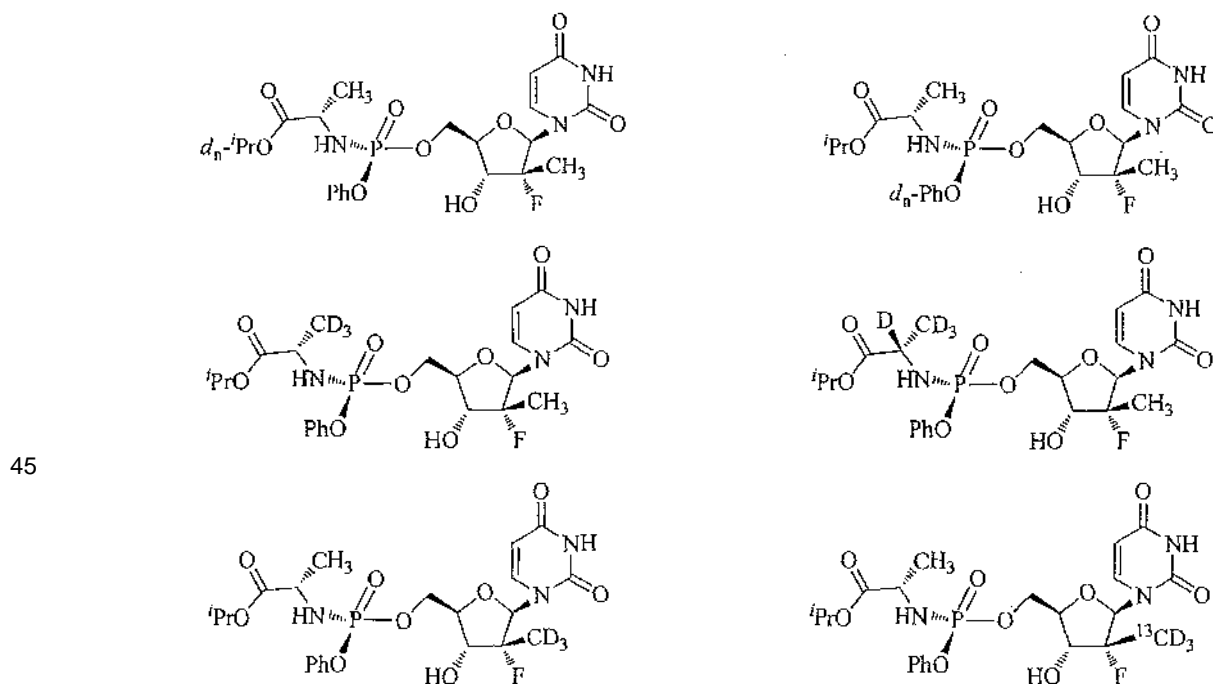
15 La proporción molar de haluro de t-butilmagnesio con respecto a 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 2,2. La proporción molar de haluro de t-butilmagnesio con respecto a 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona puede ser aproximadamente 2,1.

El haluro de t-butilmagnesio puede ser cloruro de t-butilmagnesio.

20 También se desvela en el presente documento un proceso para preparar (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo básicamente puro, que comprende:

25 obtener (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones pertinentes que se desvelan en el presente documento, y
 30 cristalizar el (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo formado de ese modo.

También se desvela en el presente documento un análogo marcado isotópicamente de R_p-4 o S_p-4 . La expresión análogo "marcado isotópicamente" se refiere a un análogo de R_p-4 o S_p-4 que es un "análogo deuterado", un "análogo marcado con ^{13}C ", o un "análogo deuterado/marcado con ^{13}C ". La expresión "análogo deuterado" significa un compuesto descrito en el presente documento, en el que un isótopo 1H , es decir, hidrógeno (H), está sustituido con un isótopo 2H , es decir, deuterio (D). La sustitución con deuterio puede ser parcial o completa. La sustitución con deuterio parcial significa que al menos un hidrógeno está sustituido con al menos un deuterio. Por ejemplo, para R_p-4 o S_p-4 , el experto habitual en la materia puede contemplar al menos los siguientes análogos deuterados parciales (donde "dn" representa el número n de átomos de deuterio, tal como, para un grupo isopropilo n = 1-7, mientras que para un grupo fenilo, n = 1-5), así como los representados posteriormente.



Aunque se muestra que los grupos metilo representados anteriormente están completamente deuterados, se podrá reconocer que también son posibles las variaciones parcialmente deuteradas, tales como, -CDH₂ y -CD₂H. También se contemplan las marcas isotópicas de la furanosa y la base. Asimismo, las expresiones "análogo marcado con ¹³C" y "análogo deuterado/marcado con ¹³C" se refieren a un compuesto descrito en el presente documento, en el que un átomo de carbono está enriquecido con un isótopo ¹³C que significa que el grado de enriquecimiento excede la abundancia natural habitual de aproximadamente un 1,1 %.

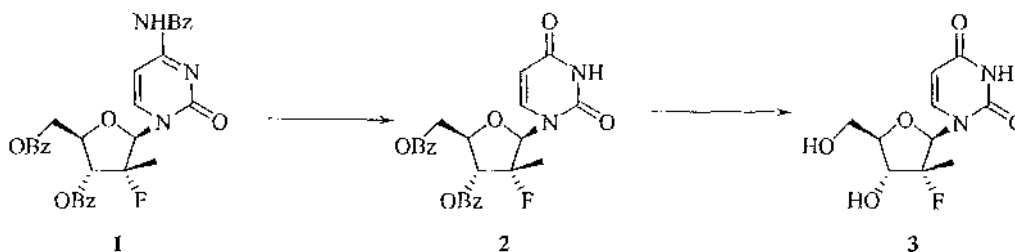
Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para facilitar una mejor comprensión de la presente divulgación, no limitada a modo de ejemplos.

Aspectos de síntesis

Con el fin de preparar un nucleósido de uridina, se podría sacar partido de un compuesto intermedio de citidina tribenzoilada en la síntesis de ciertos análogos 3',5'-diacilados de 3 (véase posteriormente) ya producidos de forma eficaz a escala de planta piloto (véanse los documentos de Patente WO 2006/031725 o US 2006/0122146).

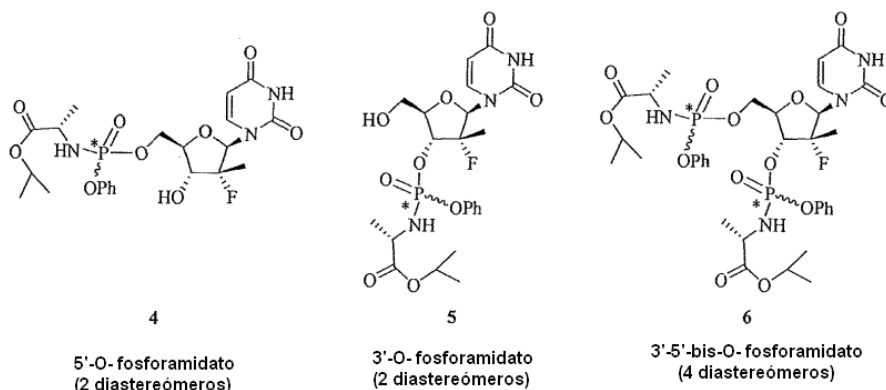
Se ha descubierto que el siguiente método es escalable y rentable.



Se obtiene 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina (1) mediante un método que se desvela en los documentos de Patente WO 2006/031725 y WO 2008/045419.

Se trata 1 con ácido acético acuoso al 70 % para formar 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (2). Los ésteres de benzoílo se pueden hidrolizar mediante diversos métodos tales como, por ejemplo, alcóxidos en disolvente alcohólico, tales como metóxido sódico en metanol, carbonato potásico en metanol, o análogos de etanol, alquilaminas tales como metilamina en metanol, butilamina etc. Se eligió amoníaco etanólico para el trabajo a mayor escala. El producto de uridina (3) se puede purificar por cristalización para proporcionar un rendimiento de un 70 % a partir de la citidina tribenzoilada (1).

Numerosos procedimientos de la bibliografía detallan diferentes rutas y condiciones para preparar fosforamidatos usando varias veces equivalentes de reactivo. Véase, por ejemplo, McGuigan *et al.* J. Med. Chem. 2005, 48, 3504-3515 y McGuigan *et al.* J. Med. Chem. 2006, 49, 7215. Para procesos de trabajo a escala, existe solo un ejemplo conocido en la actualidad, que se desvela en Lehsten *et al.*, Org. Process Res. Dev. 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). En esta referencia, los autores introducen el concepto de un "procedimiento en un solo paso" en el que se hacen reaccionar la sal de clorhidrato de un aminoácido y diclorofosfato de fenilo conjuntamente con N-metilimidazol en diclorometano. Posteriormente, se añade el nucleósido para formar el producto de 5'-O-fosforamidato deseado, que en el caso presente produciría un compuesto representado por la fórmula 4. Desafortunadamente, el procedimiento de Lehsten tiene desventajas. Por ejemplo, el procedimiento de Lehsten utilizó un exceso mucho mayor de reactivos del que era necesario que se añadió al coste y a la dificultad de la purificación cromatográfica. Además, Lehsten sugirió que se podría controlar la selectividad de la reacción del 5'-hidroxilo con respecto al 3'-hidroxilo en comparación con una referencia de la bibliografía mediante el uso de temperaturas menores y la adición lenta del nucleósido.



El uso del procedimiento de Lehsten para los compuestos desvelados en el presente documento proporcionó aproximadamente un 1-5 % de los diastereómeros monosustituídos de 3'-O-fosforamidato (**5**) y aproximadamente un 10-30 % del producto disustituído (**6**). Dado que la polaridad de los 3'-diastereómeros era muy similar a los 5'-diastereómeros (**4**) deseados, la separación cromatográfica fue muy difícil. El escalado del proceso fue casi imposible sin descartar una parte considerable de los 5'-diastereómeros (**4**) menos polares o aceptar un mayor nivel de contaminación de los 3'-diastereómeros (**5**). En un escalado inicial de 50 g, el producto resultante contenía una contaminación del 3'-diastereómero (**5**) de aproximadamente un 3 %, que se eluyó conjuntamente con el 5'-diastereómero (**4**) menos polar.

En el presente documento se desvelan condiciones de reacción que usan menores cantidades de reactivos y un método para retirar selectivamente la impureza de los diastereómeros de 3'-O-fosforamidato (**5**) con una separación cromatográfica más fácil mediante lo cual se proporcionan los diastereómeros de 5'-O-fosforamidato (**4**) deseados con mucho mayor pureza.

Para la estequiometría de reactivos, se realizó un estudio en el que se cambió sistemáticamente la estequiometría de los reactivos y se monitorizaron los resultados mediante RMN de fósforo de la reacción en bruto como había informado Lehsten. En los procesos con mayor éxito, se compararon el rendimiento aislado y la pureza del producto deseado. Se observó que el 5'-hidroxilo primario reacciona con una velocidad mayor que el 3'-hidroxilo secundario. Esto crea una situación competitiva entre el progreso de reacción de consumir todo el nucleótido de partida y convertir los productos 5'- y 3'-monosustituídos (**4** y **5**) en los productos 5',3'-disustituídos (**6**). El producto 3'-monosustituído se convierte en el producto disustituído a una velocidad mayor que el producto 5'-monosustituído, de modo que es posible reducir el nivel de contaminación del 3'-diastereómero empujando la reacción más hacia los productos disustituídos. Sin embargo, con una forma eficaz para retirar los 3'-diastereómeros, la reacción se puede optimizar para producir más del 5'-diastereómeros deseado sin tener que sacrificar que se convierta tanto del producto 5'-monosustituído en el disustituído (**6**). También se observó que el clorhidrato de aminoácido es muy higroscópico. Dado que el agua presente podía consumir una cantidad equivalente de reactivo de diclorofosfato de fenilo, se debe tener cuidado en mantener el aminoácido básicamente anhidro y se debería hacer básicamente anhidro antes de su uso. En resumen, Lehsten había informado que la proporción óptima de aminoácido con respecto a diclorofosfato de fenilo con respecto al nucleósido de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 1,3 aproximadamente 1 es óptima en condiciones en las que el 3'-diastereómero se puede retirar de forma eficaz y cuando el clorhidrato de aminoácido es básicamente anhidro. Mediante el uso de una cantidad menor de los reactivos, se consigue un ahorro de coste junto con una simplificación de la separación cromatográfica del producto deseado a partir de los productos secundarios de reactivo y a partir del nivel reducido de los bis diastereómeros.

En un procedimiento alternativo, se preparó un derivado 3'-hidroxi-bloqueado de **3** usando un grupo bloqueante de t-butildimetilsililo en dos etapas. Este se convirtió a continuación en su derivado de 5'-fosforamidato. El deseo fue que el grupo sililo se pudiera retirar a continuación y no hubiera ningún isómero 3' (**5**) o 3',5'-bis fosforamidatos (**6**). Se demostró un enfoque similar por Borch y Fries (documento de Patente de Estados Unidos 5.233.031) en un rendimiento global bajo en un fosforamidato de alquilo.

Otro enfoque alternativo fue usar la síntesis directa y a continuación usar química para ayudar a diferenciar las impurezas del 3'-diastereómero **5** de los 5'-diastereómeros **4** deseados para ayudar en la separación. Se deseó un grupo que reaccionara selectivamente con el hidroxilo primario libre de la impureza de 3'-O-fosforamidato **5** con respecto al hidroxilo secundario libre del 5'-O-fosforamidato **4** deseado. También se deseó que el grupo bloqueante cambiara considerablemente la polaridad del producto de 5'-O-bloqueado 3'-O-fosforamidato resultante del 5'-O-fosforamidato **4** deseado. No habría ninguna etapa extra necesaria para retirar el grupo bloqueante ya que los 5'-diastereómeros **4** deseados no cambiarían. Los 3'-diastereómeros alterados químicamente permitirían a continuación una separación cromatográfica más fácil o una separación mediante soportes secuestradores especiales o mediante extracciones.

Específicamente, el grupo bloqueante terc-butildimetilsililo (tBDMS) cumple estos criterios y fue el primero en demostrarse y usarse posteriormente a escala de múltiples kilogramos. En ciertas condiciones tales como en piridina como disolvente y base, el grupo tBDMS reacciona con alta selectividad en la posición del hidroxilo primario con respecto a la posición del hidroxilo secundario 3'. La reacción de fosforamidoato usa N-metilimidazol (NMI) como base.

5 En presencia de NMI, la siliación es menos selectiva. Preferentemente, la cantidad de NMI se debería reducir. Esto se puede conseguir fácilmente después de la reacción de fosforamidoato por lavado de la solución de reacción con ácido clorhídrico 1 N. El NMI y el nucleósido de partida remanente se retiran, dejando una mezcla en bruto de productos mono y disustituidos y productos secundarios de reactivo. Esta se disuelve a continuación en piridina y se trata con

10 cloruro de terc-butildimetilsililo. El producto 3'-monosustituido 5 se convierte en unas pocas horas o menos en el 5'-O-tBDMS-3'-O-fosforamidoato 7. El progreso de la reacción se puede monitorizar mediante HPLC. La polaridad de este producto siliado 7 es menor que el bis-fosforamidoato 6 y se retira fácilmente por cromatografía. Usando este método, fue posible reducir el nivel de 3'-monofosforamidoato 5 a menos de un 0,1 % del producto 5' 4 en comparación con un 1-3 % sin el tratamiento de sililo. De forma similar, el tratamiento con cloruro de dimetoxitriphenilmetilo (DMT-CI) en las mismas condiciones funcionó igual de bien. También fue más fácil identificar el producto de reacción de DMT

15 mediante el TLC ya que las moléculas que contienen DMT se tiñen de color naranja intenso tras calentamiento o exposición a ácidos. También se pueden prever muchos otros grupos bloqueantes, como se ha indicado anteriormente.

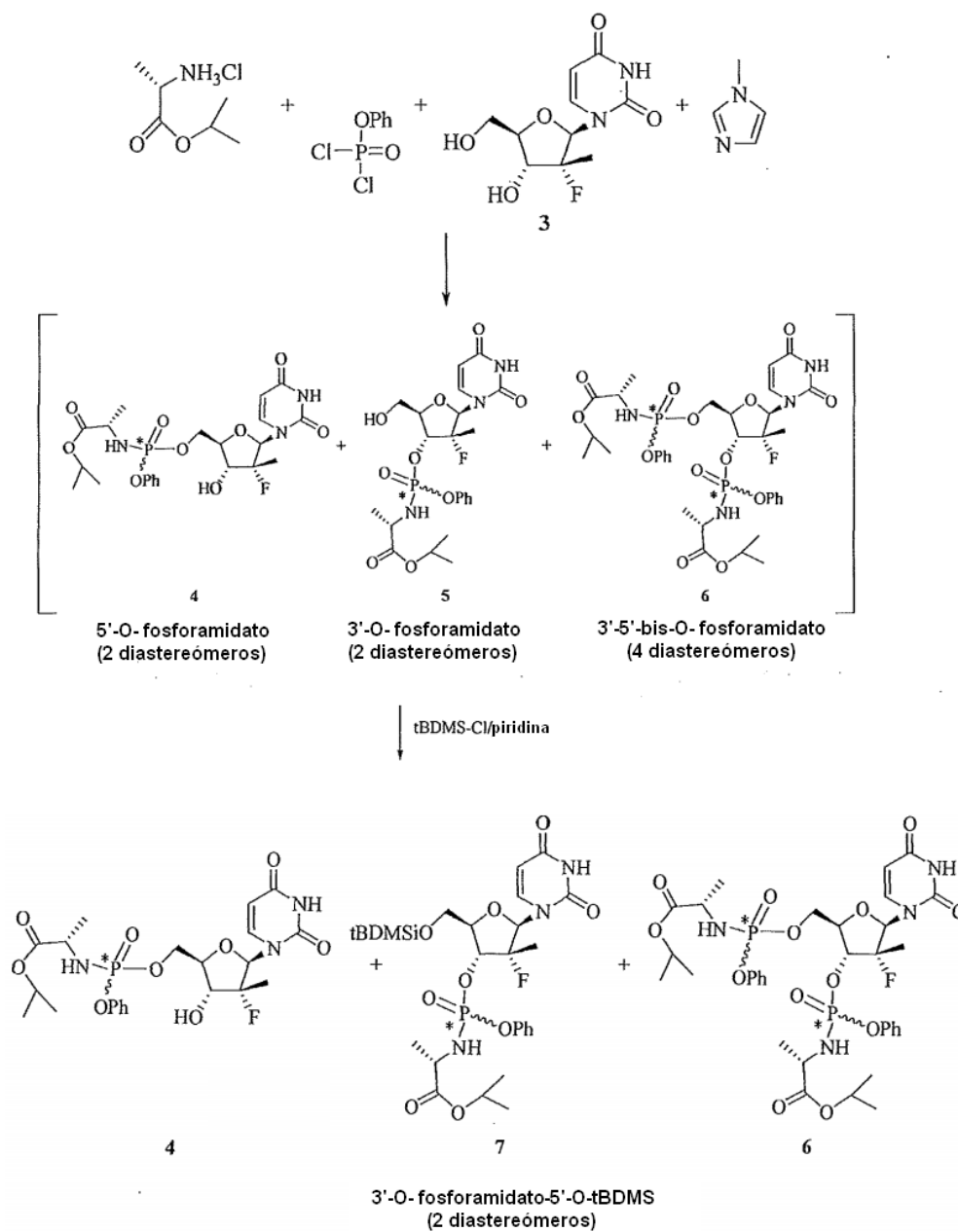
Tanto las condiciones de reacción como el secuestro de la impureza 3' son métodos generales y se podrían aplicar a la

20 mayoría de los nucleósido fosforamidoatos con un hidroxilo 3' libre. El resto de fosforamidoato podría ser cualquier combinación de éster de aminoácido y alcohol aromático. El resto de nucleósido podría ser cualquier nucleósido en el que un 5' fosforamidoato podría conducir a un 5'-monofosfato y se podría metabolizar adicionalmente a la forma 5'-trifosfato.

25 El siguiente esquema es el esquema de reacción principal ilustrado para preparar isopropil L-alanato fenil fosforamidoato de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina siendo los productos mayoritarios el 5'-O-fosforamidoato deseado (4, dos diastereómeros) y los productos minoritarios el 3'-O-fosforamidoato (5, dos diastereómeros) y el 3',5'-bis-O-fosforamidoato (6, cuatro diastereómeros). Los reactivos se añaden en las proporciones estequiométricas como se describe el método de la sección de preparación. Se deja que la reacción transcurra hasta que

30 aproximadamente un 5 % del material de partida permanece según se juzga mediante visualización UV en cromatografía en capa fina (TLC). Además, UPLC/EM mostró que se había formado aproximadamente un 10 % del 3',5' bis-fosforamidoato 6 en comparación con el producto 5' deseado. Después de inactivación y procesamiento acuoso ácido, el residuo en bruto de la fase orgánica se preparó para la siliación. En las condiciones de reacción descritas, el grupo sililo reaccionó preferentemente con el hidroxilo 5' libre del 3'-O-fosforamidoato para formar 7. La reacción

35 continuó hasta que el 3'-O-fosforamidoato ya no fue detectable mediante UPLC/EM.



Después del procesamiento de la reacción de sililación, el producto deseado se somete a cromatografía sobre gel de sílice y se eluye con un gradiente de metanol en diclorometano (1-4 %). El 5'-monofosforamidato 4 deseado eluye el último.

Método de preparación

Referencia

Ejemplo 1. Preparación de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3)

En un matraz de 10 l, se añadieron 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina (500 g, 0,874 mol) y ácido acético acuso al 70 % (7,5 l). La solución se calentó a reflujo (110 °C) durante 20 h. TLC indicó la reacción completa (R_f 0,6 en 5 % de metanol en diclorometano (DCM)). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (2 l). Después de agitación durante 2 h, el precipitado resultante se recogió por filtración y el sólido se aclaró con agua (5 l) y se secó en la atmósfera a temperatura ambiente durante 12 h para proporcionar 360 g (88 %). Este compuesto intermedio de dibenzoiluridina se usó directamente en la siguiente etapa por adición de la totalidad del mismo a amoniaco metanólico preparado recientemente (5,4 l, aproximadamente 25 %) a 0 °C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 h y a continuación se dejó calentar hasta 15 °C durante 24 h. TLC indicó una

reacción completa (Rf 0,4 en 10 % de metanol en DCM). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y se concentró a presión reducida para dar el producto bruto (216 g). El producto en bruto se agitó con acetato de etilo (325 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. El sólido resultante se recogió por filtración y se lavó con acetato de etilo (216 ml). El sólido se secó al vacío a temperatura ambiente durante 4 h para proporcionar 160 g (78 %) del producto deseado con un 98,7 % de pureza por HPLC. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 11,44 (s a, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, C-6H), 5,97 (d, 1H, C-1'H), 5,64 (d, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (m, 3H, C-5'-Ha, C-3'H, C-4'H), 3,63-3,60 (m, 1H, C5'-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'-CH₃). ES-EM M-1 259.

Referencia

Ejemplo 2. Preparación de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[[[(1R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-2-il metoxi]-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (4)

Sinónimo: mezcla diastereomérica de 5'-O-(isopropil-L-alanato, fenil fosforamidil)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina.

Un matraz de 3 bocas de 5 l se equipó con un agitador mecánico, baño de solución salina saturada en hielo, termómetro interno, y atmósfera de nitrógeno. El matraz se encargó con clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (82,0 g, 0,490 moles) y diclorometano anhidro (0,80 l). Mientras este se encontraba en agitación, se añadió diclorofosfato de fenilo (85,0 g, 0,40 moles) en una porción y se agitó. Mientras se mantenía la temperatura interna entre -5 y 5 °C, se añadió una solución de N-metilimidazol (NMI, 250 g, 3,07 moles) en diclorometano (250 ml) durante un período de media hora. La solución se mantuvo en agitación durante 1 h en este intervalo de temperatura. Se añadió 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (3,80,0 g, 0,307 moles) a 0 °C en una porción y a continuación se dejó que el matraz de reacción se calentara lentamente en el baño de solución salina. A 1 h, la temperatura interna alcanzó -2 °C. TLC (5 % de metanol en DCM) a 1 h mostró que se había consumido más de un 50 % de nucleósido. El baño se retiró y el matraz de reacción alcanzó la temperatura ambiente durante 1 h más. TLC después de 3 h y 5 h mostró que se había consumido un total de un 95 % del nucleósido de partida. La mezcla de reacción se inactivó por adición de metanol (100 ml) y agitación de la reacción durante 5 minutos.

La mezcla de reacción se lavó con HCl 1 N (2 x 500 ml), seguido de solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 500 ml). La fase orgánica separada se secó sobre sulfato sódico anhidro (50 g) y se filtró. La solución se evaporó a presión reducida y a continuación en alto vacío hasta sequedad para dar el producto en bruto en forma de un aceite viscoso (170 g). Se tomaron los RMN del producto en bruto (³¹P y ¹H). RMN ³¹P indicó que aproximadamente un 1 % de la integración total de fósforo se debía a la presencia del isómero 3' 5.

Al producto en bruto se añadió piridina anhidra (1700 ml). El disolvente se evaporó a presión reducida y a continuación en alto vacío con el fin de reducir el contenido de agua de la mezcla en bruto mediante evaporación conjunta. El aceite resultante se redisolvió en piridina anhidra (500 ml) y a continuación se añadió un exceso de cloruro de t-butildimetilsililo (9,0 g, 60 mM). La reacción se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitorizó mediante UPLC/EM. Después de 3 horas, la impureza 3' 5 no se pudo detectar más y la reacción se interrumpió por adición de metanol (50 ml).

La reacción se evaporó a presión reducida hasta un aceite. El residuo se disolvió en acetato de etilo (1,5 l) y se lavó con HCl 1 N (2 x 500 ml), seguido de solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 500 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro (50 g), se filtró y se evaporó a presión reducida para dar el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo.

El aceite en bruto se diluyó con el mismo volumen de diclorometano y se cargó sobre un cartucho de gel de sílice de 2,5 kg en un módulo de compresión radial a 100 psi de presión de aire. Usando una bomba de gradiente a 60 psi y un caudal de 400 ml/min, el cartucho se lavó con cloruro de metileno (4 l), seguido de un gradiente de 1-4 % de metanol en cloruro de metileno (48 l). La mayoría de las impurezas principales (fosfato de di-(isopropilalanil)fenilo, 3',5'-bis fosforamidato (6), aducto de 3'-fosforamidato-5'-TBDMS (7)) eluyeron con ~3 % de gradiente. El producto deseado eluyó entre un 3 y un 4 % de metanol. Las fracciones que contenían el producto se dividieron en dos porciones. La primera contenía pequeñas cantidades de impurezas superiores y la última era producto puro. El primer conjunto de fracciones contenía pequeñas cantidades de impurezas menos polares (impurezas superiores) tales como el 3',5'-bis fosforamidato y el fosfato de di-alanilfenilo y la mayoría del diastereómero R_p y requirió una segunda purificación en columna. (La terminología relativa, superior frente a inferior se refiere a la elución en cromatografía sobre gel de sílice en fase normal, donde el "isómero superior" significa el primer isómero en eluir). El segundo conjunto de fracciones no tenía ninguna cantidad significativa de impurezas - solo el R_p remanente y la mayoría de los diastereómeros S_p. Posteriormente se combinaron con las fracciones pasadas dos veces por la columna. El disolvente se evaporó a presión reducida y la espuma de color blanco resultante se secó adicionalmente (0,20 mm Hg) durante 1 h para dar 42 g de la porción impura (4:1 del isómero superior frente al inferior basado en RMN ³¹P) y 38 g de la porción pura (1:3 del isómero superior frente al inferior). La porción impura se volvió a pasar por la columna de una forma similar para dar 3,8 g de isómero superior 97 % puro (fracción reservada) y 36 g de producto puro en una proporción 4:1. Las dos porciones principales se disolvieron en DCM, se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se secaron (50 °C,

0,2 mm Hg, 24 h) para obtener 74 g (45,7 %) de producto puro **4** con una proporción diastereomérica de 48: 51, en forma de una espuma de color blanco, y pf de aproximadamente 75-85 °C.

Con el fin de producir un sólido amorfo de la mezcla diastereomérica, se agitaron 74 g de la espuma de color blanco con t-butilo metilo éter (750 ml) dando como resultado una solución parcial y un residuo sólido gomoso. Mientras se agitaba, se añadieron lentamente heptanos (750 ml) y la suspensión se agitó mecánicamente durante 1 hora hasta que la mayoría de la goma se convirtió en un sólido de color blanco. El sólido se raspó con una espátula y la suspensión resultante se filtró. El sólido se lavó con heptanos (4 x 50 ml) y se secó al vacío (50 °C, 0,2 mm Hg, 24 h) para dar un polvo amorfo de color blanco (64 g) con un punto de fusión amplio de aproximadamente 70-80 °C. RMN ¹H y ³¹P confirmaron la estructura y HPLC mostró una pureza de un 99,8 % con una proporción diastereomérica de 46:54 (también confirmada por RMN ³¹P).

Método alternativo para preparar una mezcla sólida de **4**. Después de cromatografía, el residuo se evaporó conjuntamente con diclorometano dos veces (5 ml/g) y se secó durante 24 h a 35-40 °C a 35-45 mTorr. El residuo de espuma se tamizó a través de un tamiz de 250 micrómetros y se secó adicionalmente en las mismas condiciones hasta que el diclorometano residual cayó por debajo de 400 ppm según se mide mediante GC de espacio de cabezal. El polvo amorfo fino de color blanquecino a blanco resultante tiene un intervalo de temperatura de transición vítrea de 53,7 a 63,5 °C.

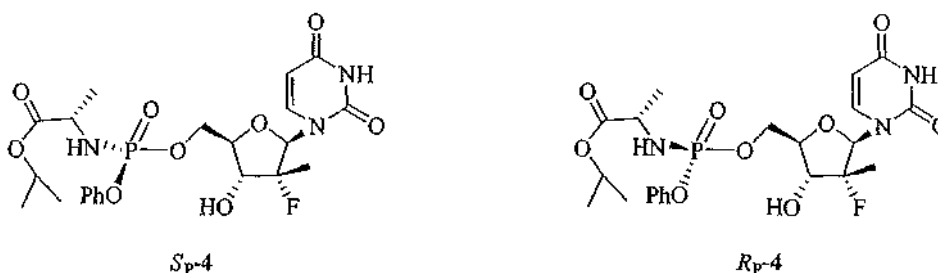
Caracterización de la mezcla de isómeros (**4**): RMN ¹H (CDCl₃) δ 10,05 (s a, 1H, NH, S_P), 10,00 (s a, 1H, NH, R_P), 7,49 (d, 1H, C6-H, S_P), 7,36 (m, 5H, C6-H, R_P, aromáticos), 7,23-7,14 (m, 6H, R_P/S_P, aromáticos), 6,18 (d a, 2H, C1'-H, R_P/S_P), 5,63 (d, 1H, C5-H, S_P), 5,58 (d, 1H, C5-H, R_P), 5,01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂, R_P/S_P), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, R_P/S_P), 4,12 (m, 2 H, ala-CH-CH₃, R_P/S_P), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, R_P/S_P), 1,39-1,22 (m, 12H, todos CH₃, R_P/S_P).

RMN ³¹P (CDCl₃) δ 3,60 (R_P), 3,20 S_P con respecto a fosfato de trifenilo a -17,80 ppm. ES-EM M+1 530,2. Análisis elemental: % calculado (incluyendo un 0,29 % de agua que se descubre mediante análisis de Karl Fisher) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90; F, 3,58; P, 5,84. % encontrado: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Discusión sobre la separación de los isómeros

El compuesto **4**, debido a la quiralidad en el fósforo, está comprendido por dos diastereómeros, que se denominan S_P-**4** y R_P-**4**. La asignación estereoquímica se realizó basándose en el análisis de rayos X de cristal individual de S_P-**4**. Tanto R_P-**4** como S_P-**4** proporcionaron un producto cristalino.

Los procedimientos para la cristalización se indican posteriormente.



Referencia

Ejemplo 3. Cristalización del isómero R_P-**4**. La fracción cromatografiada que contiene la primera elución, el isómero menos polar R_P-**4** (3,8 g, 97 % puro), se disolvió en isopropanol (36 g) y se diluyó con heptanos hasta turbidez (72 g). La solución se sembró y se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El sólido resultante se recogió por filtración al vacío, se lavó con heptanos (2 x 20 ml) y se secó (50 °C, 0,2 mm, 24 h) hasta 2,3 g de agujas muy pequeñas de color blanco de pf 136,2-137,8 °C. Se encontró que la pureza por HPLC del material resultante era un 99,02 %.

R_P-**4**: RMN ¹H (CDCl₃) δ 9,10 (s a, 1H, NH), 7,36 (m, 2H, o-aromáticos), 7,26-7,16 (m, 4 H, C6-H, m,p-aromáticos), 6,16 (d a, 1H, C1'-H), 5,58 (d, 1H, C5-H), 5,01 (sept, 1H, CH-(CH₃)₂), 4,52-4,47 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,10 (d, 1H, C3'-H), 4,02-3,76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 1,37-1,20 (m, 12H, todos CH₃).

Referencia

Ejemplo 4. Preparación y cristalización de S_P-**4**.

Método I: precipitación directa a partir de **4** en bruto: a una solución en agitación de clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (10,5 g, 61,5 mmol, secada azeotrópicamente, 2 veces, con 50 ml de tolueno cada vez) en diclorometano

(100 ml) se añadió diclorofosfato de fenilo (7,5 ml, 50 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -10 °C y a continuación se añadió una solución de NMI (30,5 ml, 384,3 mmol) en 30 ml de diclorometano durante un periodo de 30 min. Después de completar la adición, la mezcla se agitó entre -10 y -15 °C durante 1 h. A la mezcla anterior se añadió 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3) (10 g, 38,4 mmol) en una porción y la mezcla se agitó por debajo de -10 °C durante 3 h y a continuación se dejó calentar lentamente hasta 20 °C (6 h). La mezcla se agitó a esa temperatura durante una noche (15 h) y a continuación se inactivó con 10 ml de metanol. El disolvente se evaporó y el residuo se redisolvió en EtOAc (200 ml). La fase de EtOAc se lavó con agua (100 ml), HCl 1 N (3 x 75 ml), solución acuosa al 2 % de NaHCO₃ (50 ml) y solución salina saturada (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se secó en alto vacío durante 2 h para dar una espuma de color blanco (22 g).

La espuma anterior se disolvió en 33 ml de DCM y a continuación se añadieron 65 ml de IPE (isopropil éter) para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de un pequeño lecho de Celite y el filtrado se agitó con semillas de S_P-4 durante 72 h a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C - se ha de indicar que la refrigeración de la suspensión a 0 °C condujo a la formación de un aceite del producto en bruto). El sólido de color blanco se filtró, se lavó con IPE (20 ml) y se secó para dar 4,58 g (mezcla ~85:15 de S_P-4:R_P-4 respectivamente según se determina mediante RMN ³¹P) de un polvo de color blanco. El sólido anterior se suspendió en 23 ml de DCM y a continuación se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 15 h. El sólido de color blanco se filtró, se lavó con 4,5 ml de DCM frío y se secó en alto vacío a 45 °C para dar S_P-4 puro, pf 93,9-104,7 °C, pureza por HPLC 99,74 % (3,11 g, 15,2 % a partir del nucleósido de uridina).

RMN ¹H de S_P-4 (CDCl₃) δ 8,63 (s a, 1H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, o-aromáticos), 7,26-7,18 (m, 3H, m,p-aromáticos), 6,18 (d a, 1H, C1'-H), 5,70 (d, 1H, C5-H), 5,02 (sept, CH-(CH₃)₂), 4,53 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,11 (d, 1H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 3,77 (s a, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C2'-CH₃), 1,37 (d, 3H, ala-CH₃), 1,24 (d, 6H, CH-(CH₃)₂).

Método 2: formación de un aceite a partir de 4 en bruto: a una solución en agitación de clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (20,6 g, 123 mmol, secada azeotrópicamente, dos veces, con 75 ml de tolueno cada vez) en diclorometano (200 ml) se añadió diclorofosfato de fenilo (14,9 ml, 100 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -10 °C y a continuación se añadió una solución de NMI (61,3 ml, 769 mmol) en 60 ml de diclorometano durante un período de 30 min. Después de completar la adición, la mezcla se agitó entre -10 °C y -15 °C durante 1 h. A la mezcla anterior se añadió 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3) (20 g, 76,9 mmol) en una porción y la mezcla se agitó por debajo de -10 °C durante 3 h y a continuación se dejó calentar lentamente a 20 °C (6 h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante una noche (15 h) y a continuación se inactivó con 10 ml de metanol. El disolvente se evaporó y el residuo se redisolvió en EtOAc (400 ml). La fase de EtOAc se lavó con agua (200 ml), HCl 1 N (3 x 100 ml), solución acuosa al 2 % de NaHCO₃ (100 ml) y solución salina saturada (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se secó en alto vacío durante 2 h para dar una espuma de color blanco (43 g). La espuma anterior se disolvió en 86 ml de EtOAc en un matraz de fondo redondo de dos bocas equipado con un agitador mecánico. Mientras se agitaba, se añadieron lentamente 100 ml de heptano y la suspensión se agitó durante 1 h. La fase superior se decantó y el residuo se agitó de nuevo con 50 ml de soluciones 2:3 de EtOAc/heptano durante 10 min y a continuación se decantó. El residuo se secó en alto vacío para dar una espuma de color blanco (31 g).

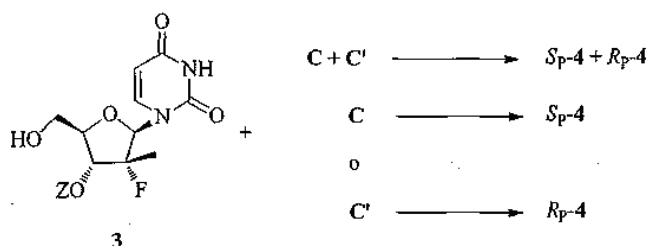
La espuma anterior se disolvió en 46 ml de DCM y a continuación se añadieron 95 ml de IPE para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de un pequeño lecho de Celite y el filtrado se agitó con semillas de S_P-4 durante 72 h a temperatura ambiente. El sólido de color blanco se filtró, se lavó con IPE (30 ml) y se secó para dar 7,33 g (mezcla ~85:15 de S_P-4 : R_P-4 respectivamente según se determina mediante RMN ³¹P) de un polvo de color blanco. El sólido anterior se suspendió en 36 ml de DCM y a continuación se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 15 h. El sólido de color blanco se filtró, se lavó con 7,5 ml de DCM frío y se secó en alto vacío a 45 °C para dar S_P-4 > 99 % puro, (4,78 g, 11,6 % a partir del nucleósido de uridina).

Método 3: carga sobre gel de sílice de 4 en bruto: se produjeron 5,0 g de 4 de la misma forma que la mezcla de diastereómeros justo antes de la etapa de cromatografía en columna partiendo de aproximadamente 2,5 g de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3). El producto bruto se disolvió en 10 ml de DCM y se añadieron a la solución 10 g de gel de sílice. El disolvente se evaporó para dar una suspensión seca. La suspensión se agitó con 40 ml de 50 % de EtOAc/hexanos durante 15 min y a continuación se filtró. El gel de sílice se lavó con 10 ml adicionales de 50 % de EtOAc/hexanos. El gel de sílice se lavó a continuación con un 15 % de MeOH/DCM (100 ml) y se recogió separadamente. El disolvente se evaporó y se secó en alto vacío para dar 4,0 g de un residuo (espuma). El residuo se disolvió en DCM (6 ml) y a continuación se añadieron ~9 ml de IPE para preparar una solución saturada. A continuación, la mezcla se agitó suavemente durante una noche con semillas de S_P-4 a temperatura ambiente. El sólido de color blanco se filtró y se lavó con IPE (5 ml) para dar 1,28 g de producto. RMN ³¹P reveló que el producto anterior contiene una mezcla 77:23 de S_P-4 : R_P-4 respectivamente. Esta se recristalizó a partir de 20 ml de DCM para obtener 0,75 g de S_P-4 > 99 % puro (aproximadamente 12 % a partir del nucleósido de uridina). Esta preparación de S_P-4 no requiere que se realice la etapa de siliación para la mezcla, de modo que el procedimiento de reacción completo se ha mostrado anteriormente. Los aspectos de las formas cristalinas individuales y polimórficas de S_P-4 se presentan posteriormente.

Método 4: se disolvieron 40,0 g de mezcla 1:1 de 4 en 90 ml de diclorometano. Se añadió diisopropil éter (70 ml) a la

solución anterior para dar una solución saturada. (La cantidad de diisopropil éter basándose en la pureza del producto). La solución se sembró con S_{P-4} puro (> 99 %) y la mezcla se agitó suavemente con un agitador a temperatura ambiente durante 20 h (se observó la formación de un sólido después de 2 h). El sólido se filtró, se lavó con 40 ml de la mezcla de diisopropil éter/diclorometano (1:1) y se secó para dar un sólido de color blanco (16,6 g, S_{P-4} 89,35 % puro mediante RMN). Este sólido se suspendió en 83 ml de diclorometano y se calentó a reflujo durante 3 h. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. El sólido se filtró y se lavó con 10 ml de DCM frío. El sólido se secó al vacío para dar S_{P-4} (13,1 g, 99,48 % puro mediante HPLC). Se redisolieron 11 g de este sólido en 330 ml de DCM en condiciones calientes. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se mantuvo a esta temperatura durante una noche. El producto cristalino se filtró y se secó para dar 10,5 g de S_{P-4} (99,74 % mediante HPLC).

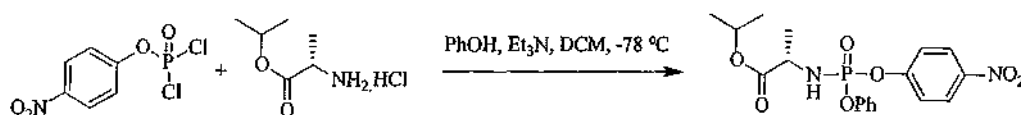
Los compuestos S_{P-4} y R_{P-4} se pueden preparar alternativamente, de acuerdo con la novena o la décima realización, haciendo reaccionar el nucleósido (protegido o sin proteger) **3** con un isopropil-alanil-fosforamidato (mezcla de **C** y **C'**, **C** o **C'**), como se muestra en la siguiente ecuación.



P.D. Howes *et al.* Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2003, Vol. 22, N^{os} 5-8, pág. 687-689 ("Howes") desvela 2'- y 5'-fosforamidatos obtenidos mediante una reacción con cloruro de t-butilmagnesio. Allí, Howes desvela que cuando se hace reaccionar un nucleósido de 3'-desoxicitidina con éster de metilo de ácido (S)-2-[cloro-fenoxi-fosforilamino]propiónico en presencia de 1,2 equivalentes de cloruro de t-butilmagnesio, se produce la fosforilación selectiva en la posición 2', pero que con un equivalente adicional de cloruro de t-butilmagnesio se produce la fosforilación selectiva en la posición 5'. La presente divulgación se debería contrastar con lo que se desvela en el Esquema 1 de Howes.

Referencia

Ejemplo 5-1. Preparación de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico

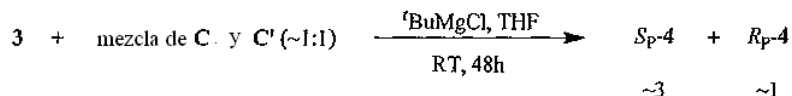


A una solución en agitación de fosforodichloridato de 4-nitrofenilo (12,8 g, 50 mmol) en diclorometano (100 ml) se añadió una solución de fenol y trietilamina (7,7 ml, 55 mmol) en diclorometano (100 ml) a -78 °C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y a continuación se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (8,38 g, 50 mmol) en diclorometano (100 ml) a 0 °C. A la mezcla se añadió una segunda porción de trietilamina (14,6 ml, 105 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y a continuación el disolvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (150 ml) y el sólido de color blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido. El compuesto en bruto se sometió a cromatografía usando un gradiente de 0-20 % de acetato de etilo/hexanos para dar el producto (17 g, 83 % de rendimiento) en forma de una mezcla de diastereómeros en una proporción aproximadamente 1:1. **RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-d₆):** δ -0,31, -0,47; **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 8,31-8,27 (m, 2H), 7,51-7,37(m, 4H), 7,27-7,19(m, 3H), 6,70-6,63(m, 1H), 4,85-4,78(m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,21-1,19 (m, 3H), 1,11-1,09 (m, 6H); **EM (IEN) m/z 407 (M-1)⁺.** **RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃):** δ -2,05, -2,10; **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 8,22 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26-7,18 (m, 3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88 (m, 1H), 1,38 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,22 (dd, J = 6,2 & 3,0 Hz, 6H); **EM (IEN) m/z 407 (M-1)⁺.**

Referencia

Ejemplo 5-2. Preparación de S_P -4/ R_P -4.

5

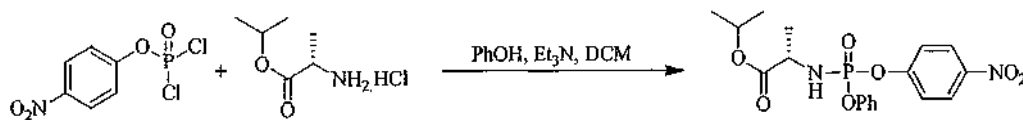


10 A una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (130 mg, 0,5 mmol) en THF seco (1,5 ml) se añadió una solución 1,0 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,05 ml, 1,05 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 5 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (mezcla 1:1 de isómeros, 408 mg, 1 mmol) en THF (1,5 ml) durante un período de 5 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 48 h y a continuación se inactivó con NH_4Cl acuoso saturado (20 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (50 ml) y agua (20 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de color amarillo pálido. La cromatografía en columna del residuo usando un gradiente de un 0-2 % de MeOH/diclorometano proporcionó un sólido espumoso de color blanco (125 mg, 47 % de rendimiento, mezcla de S_P -4/ R_P -4 en una proporción de aproximadamente 3,05:1,0).

20 Referencia

Ejemplo 6. Preparación y aislamiento no cromatográfico de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico

25



30 Se secó previamente clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (330 g, 1,97 mol) mediante evaporación conjunta con tolueno (2 x 400 ml) a presión reducida y a continuación secado en un horno de vacío (50 °C, 0,2 mm Hg, 17 h). A una solución en agitación de fosforodichloridato de 4-nitrofenilo (500,0 g, 1,953 mol) en diclorometano anhidro (3,0 l) se añadió una solución de fenol (183,8 g, 1,953 mol) y trietilamina (300 ml, 2,15 mol) en diclorometano (900 ml) a una temperatura interna de -60 °C durante un período de 3 horas. La mezcla se agitó a esta temperatura durante un periodo adicional de 30 min y a continuación se dejó calentar hasta -5 °C durante 2,5 horas. El éster de aminoácido secado previamente se añadió a -5~0 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 10 min. El residuo de sal de aminoéster en el matraz de adición se transfirió a la mezcla de reacción a través de aclarado con diclorometano (2 x 100 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 40 min y se añadió una segunda porción de trietilamina (571 ml, 4,10 mol) durante un período de 40 min a 0 °C. La mezcla se agitó a 0~10 °C durante 3 h y a continuación el sólido de color blanco (clorhidrato de trietilamina) se retiró por filtración y se aclaró con diclorometano (3 x 300 ml). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se trituró con metil t-butil éter (MTBE, 4 l). La sal sólida adicional formada de ese modo se retiró por filtración y se aclaró con MTBE (3 x 150 ml). El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite transparente de color pardo claro. El residuo se evaporó conjuntamente con hexanos (2 x 140 ml) para retirar cualquier MTBE residual y se secó adicionalmente al vacío a 40 °C durante 2 horas. El residuo seco se mezcló con diisopropil éter (IPE, 1,1 l) y se agitó a 5 °C en un baño de hielo-agua. Se añadió a la solución una pequeña cantidad de semillas de cristal del isómero deseado S_P del producto y la mezcla se agitó a 5 °C durante más de 22 h para formar una suspensión espesa media. Esta se dejó reposar en un congelador (-10 °C) durante 44 h. El producto precipitado se recogió a través de filtración y se aclaró con disolventes mixtos de IPE y hexanos enfriados previamente (1:1,3 x 190 ml). El sólido se secó al vacío (0,5 mm Hg) a temperatura ambiente hasta que se obtuvo un peso constante para dar 227,23 g (rendimiento: 28,5 %) en forma de un sólido en polvo de color blanco. La proporción de los dos diastereómeros S_P : R_P fue 9,65/1 basado en RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6 , δ -0,31 (S_P), -0,47). El producto se recrystalizó por disolución en IPE (840 ml) mientras se calentaba en un baño a 60 °C. La solución anterior se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se añadió una pequeña cantidad de semillas de cristal del isómero S_P . Se formó un sólido en polvo de color blanco en 2 horas y el matraz se almacenó en un congelador (-10 °C) durante 16 horas. El sólido finamente cristalino de color blanco obtenido se filtró, se lavó con IPE enfriado previamente (3 x 50 ml) y se secó al vacío (ambiente, 0,5 mm Hg) hasta un peso constante para dar un sólido blanco de color blanco (177,7 g, 22 % de rendimiento global o 44 % de rendimiento global basado en el rendimiento teórico del isómero S_P) con una proporción diastereomérica de 48/1 basada en RMN P. Pf 62-66 °C.

50 **RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6):** δ -0,31; **RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,41-7,37 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, J = 13,6, 10,0 Hz, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,10 (d, J = 6,4 Hz, 6H);

60

RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃): δ -2,05; (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0,31; **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 8,22 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26-7,18 (m, 3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88 (m, 1H), 1,38 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,22 (dd, J = 6,2 & 3,0 Hz, 6H); **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,41-7,37 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, J = 13,6, 10,0 Hz, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,10 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

EM (IEN) m/z 407 (M-1)⁺.

La estereoquímica de **8** (isómero S_P) se confirmó mediante cristalografía de rayos X de cristal individual, véanse los detalles proporcionados posteriormente.

Referencia

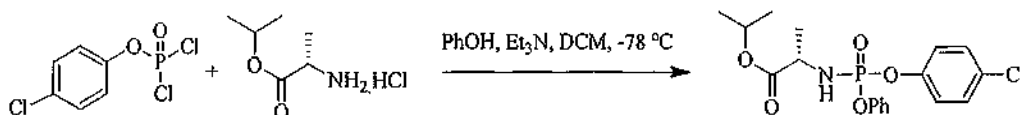
Ejemplo 7. Separación de la mezcla diastereomérica de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico mediante SFC

Una mezcla de la mezcla de diastereómeros (4,8 g) enriquecida con el isómero R_P se sometió a SFC usando una columna ChiralPak AD-H (2 x 15 cm) y se eluyó con un 35 % de isopropanol en dióxido de carbono a 100 bar. Se usó una inyección de carga de 4 ml se muestra a una concentración de 17 mg/ml de metanol. El isómero R_P [éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] eluyó en primer lugar. Las fracciones apropiadas de los procesos múltiples se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar 2,9 g del isómero R_P [éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] en forma de un aceite viscoso de color amarillo claro y 1,9 g del isómero S_P [éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] en forma de un sólido de color blanco. Los datos analíticos del isómero R_P son similares al producto aislado mediante el método de cristalización anterior.

Datos analíticos para éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero R_P): RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0,47; RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,46-7,38 (m, 4H), 7,27-7,20 (m, 3H), 6,68 (dd, J = 13,8, 10,2 Hz, 1H), 4,86-4,77 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,20 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,10 (dd, J = 6,2,2,2 Hz, 6H); EM (IEN) m/z 407 (M-1)⁺.

Referencia

Ejemplo 8-1. Preparación de (±) éster de isopropilo del ácido 2-[(4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico:



A una solución en agitación de fosforodichloridato de 4-cloro-fenilo (2,45 g, 10,0 mmol) en diclorometano (20 ml) se añadió una solución de fenol (0,94 g, 10 mmol) y trietilamina (1,56 ml, 11 mmol) en diclorometano (20 ml) a -78 °C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y a continuación se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (1,67 g, 10 mmol) en diclorometano (50 ml) a 0 °C. A la mezcla se añadió una segunda porción de trietilamina (2,92 ml, 21 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y a continuación el disolvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (30 ml) y el sólido de color blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido. El compuesto en bruto se sometió a cromatografía usando un gradiente de 10-20 % de acetato de etilo/hexanos para dar el producto (2,0 g, 50 % de rendimiento) en forma de una mezcla de diastereómeros en una proporción de aproximadamente 1:1. **RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃):** δ -1,58, -1,62; **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 7,06-7,51 (m, 8H), 7,15-7,28 (m, 2H), 7,29-7,47 (m, 2H), 4,0-4,10 (m, 1H), 3,82-3,88 (m, 3H), 1,35-1,36 (dd, 6H); 1,19-1,22 (m, 3H). **EM (IEN) m/z** 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización, o cromatografía, como se ha indicado anteriormente.

Referencia

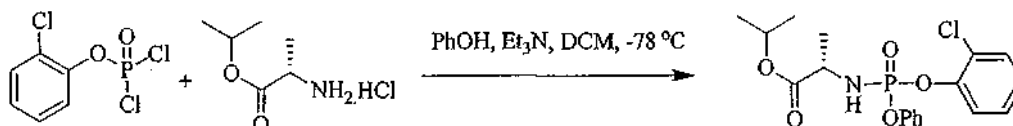
Ejemplo 8-2. Preparación de (S)-2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi(fenoxi)-fosforilamino)propanoato de isopropilo (4).

A una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (3, 2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (2-[(4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico (4,08 g, 10 mmol)

en THF (15 ml) durante un período de 10 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 72. Una banda conjunta de TLC con producto auténtico mostró que se había formado aproximadamente un 5 % del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

5 Referencia

Ejemplo 9-1. Preparación de (±) éster de isopropilo del ácido 2-[(2-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico racémico.



A una solución en agitación de fosforodichloridato de 2-cloro-fenilo (9,8 g, 40 mmol) en diclorometano (80 ml) se añadió una solución de fenol (3,76 g, 40 mmol) y trietilamina (6,16 ml, 44 mmol) en diclorometano (80 ml) a -78 °C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y a continuación se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (6,7 g, 40 mmol) en diclorometano (150 ml) a 0 °C. A la mezcla se añadió una segunda porción de trietilamina (11,6 ml, 84 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y a continuación el disolvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (100 ml) y el sólido de color blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido. El compuesto en bruto se sometió a cromatografía usando un gradiente de 10-20 % de acetato de etilo/hexanos para dar el producto (11,3 g, 72 % de rendimiento) en forma de una mezcla de diastereómeros en una proporción de aproximadamente 1:1. **RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃):** δ -1,58, -1,61; **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 7,06-7,51 (m, 8H), 5,02-5,94 (m, 1H), 4,10-4,16 (m, 1H), 3,31-3,94 (m, 1H), 1,18-1,35 (m, 3H), 1,38-1,40 (dd, 6H); **EM (IEN) m/z** 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización, o cromatografía, como se ha indicado anteriormente.

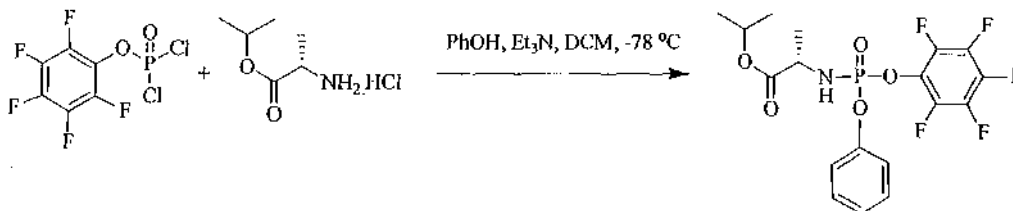
Referencia

Ejemplo 9-2. Preparación de (S)-2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi(fenoxi)-fosforilamino)propanoato de isopropilo.

A una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (3, 2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido 2-[(2-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (racémico, 4,08 g, 10 mmol) en THF (15 ml) durante un período de 10 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 72 h. Una banda conjunta de TLC con producto auténtico mostró que se había formado aproximadamente un 5-10 % del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

Referencia

Ejemplo 10-1. Preparación de (±) éster de isopropilo del ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico.



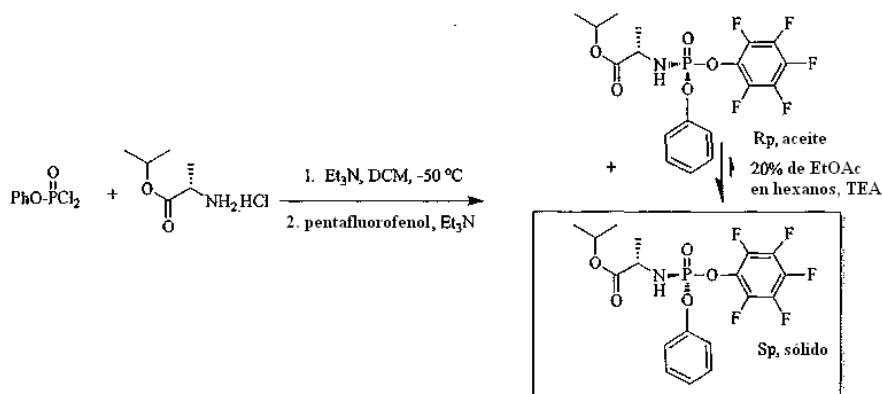
A una solución en agitación de fosforodichloridato de pentafluorofenilo (6,0 g, 20 mmol) en diclorometano (40 ml) se añadió una solución de fenol y trietilamina (3,08 ml, 22 mmol) en diclorometano (40 ml) a -78 °C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y a continuación se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (3,35 g, 20 mmol) en diclorometano (100 ml) a 0 °C. A la mezcla se añadió una segunda porción de trietilamina (5,84 ml, 42 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y a continuación el disolvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (60 ml) y el sólido de color blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido en forma de una mezcla de diastereómeros en una proporción de aproximadamente 1:1. **RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃):** δ -0,49,-0,58. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización, o cromatografía,

como se ha indicado anteriormente.

Referencia

- 5 **Ejemplo 10-2. Preparación de mezcla diastereomérica de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico y aislamiento del diastereómero individual éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico mediante resolución dinámica inducida por cristalización con múltiples cosechas**

10



15 A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l equipado con un agitador mecánico y un termómetro de baja temperatura se añadieron 60 g (284 mmol) de diclorofosfato de fenilo y 300 ml de diclorometano anhidro. La solución se enfrió a 0 °C en atmósfera de nitrógeno y se añadió rápidamente sal de clorhidrato de alanato de isopropilo (secada en horno al vacío, 47,7 g, 284 mmol) en forma de un sólido. La mezcla se agitó y se enfrió a -55 °C en un baño de hielo seco-acetona. Se añadió una solución de 60,32 g de trietilamina (596 mmol) en 300 ml de diclorometano a través de un embudo de adición durante 70 minutos. La mezcla turbia de color blanco se agitó a -55 °C durante media hora y a continuación a temperatura se aumentó lentamente a -5 °C durante 1,5 h. Se añadió a la mezcla una mezcla enfriada previamente (temperatura ambiente) de pentafluorofenol (52,42 g, 284 mmol) y trietilamina (32,11 g, 317 mmol) en 180 ml de diclorometano a través de un embudo de adición durante 1 h a 0 °C y la mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 4 horas. El precipitado de color blanco (TEA·HCl) se retiró por filtración y se aclaró con diclorometano (3 x 50 ml). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo sólido de color blanco se trituroó en 880 ml de t-butil metil éter (TBME) a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión de color blanco se filtró y el sólido se aclaró con TBME (3 x 150 ml). El sólido se distribuyó en una mezcla de acetato de etilo (600 ml) y agua (150 ml). La fase orgánica se separó y se lavó con agua (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró para proporcionar 29,92 g (66 mmol) de producto (isómero S_P, según se confirma mediante cristalografía de rayos X, véase posteriormente) en forma de un sólido de pluma de color blanco.

30 El filtrado de la trituración de TBME anterior se concentró a presión reducida hasta un residuo sólido de color blanco y el sólido se trituroó en 450 ml de mezcla de acetato de etilo y hexanos (20:80, v/v) a temperatura ambiente durante 75 minutos. El sólido (sólido 1) se recogió por filtración y se aclaró con un 20 % de acetato de etilo en hexanos (75 ml, 2 x 30 ml). El licor madre se concentró para proporcionar un sólido de color blanquecino que se trituroó en un 20 % de acetato de etilo en hexanos (185 ml) a temperatura ambiente durante 17 horas. Se recogió un sólido de color blanco (sólido 2) por filtración y aclarado con un 20 % de acetato de etilo en hexanos (2 x 10 ml). El sólido 1 y el sólido 2 se combinaron y se disolvieron en 1,2 l de acetato de etilo. La solución se lavó con agua (3 x 150 ml), solución salina saturada (50 ml) y se secó sobre MgSO₄. La solución se concentró a presión reducida para proporcionar 72,8 g (161 mmol) de producto puro. La cantidad total de producto fue 102,72 g (226 mmol, 80 %). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7,38-7,33 (m, 2 H), 7,27-7,24 (m, 2 H), 7,23-7,19 (m, 1H), 5,04 (sept, 1 H), 4,18-4,09 (m, 1 H), 4,01-3,96 (m, 1H), 1,45 (d, 3 H), 1,25 (dd, 6 H). RMN ³¹P (CDCl₃, 162 MHz) δ: -0,50.

Referencia

- 45 **Ejemplo 10-3: Preparación de mezcla diastereomérica de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico y aislamiento del diastereómero individual éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico mediante resolución dinámica inducida por cristalización en una cosecha individual**

50 A un matraz seco de tres bocas de 1 l equipado con un termómetro de baja temperatura y un agitador mecánico se cargó fosforodichloridato de fenilo (25 g, 118,5 mmol). Se añadió diclorometano anhidro (125 ml) y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió rápidamente sal de éster de alanina (secada al horno) (19,86 g, 1 equiv.) en atmósfera de N₂

mientras se agitaba. La solución se enfrió a aproximadamente -50 °C (temperatura interna (en un baño de acetona/hielo seco en atmósfera de N₂). Se añadió otra agota una solución de trietilamina (25,2 g, 2,1 equiv.) en DCM (125 ml) a través de un embudo de adición durante 0,5 h a -50 °C y la suspensión de color blanco resultante se agitó a aproximadamente -50 °C durante 0,5 h. La mezcla se dejó calentar hasta 0 °C durante 1,5 h y a continuación se añadió una solución enfriada mezclada previamente de pentafluorofenol (21,82 g, 1 equiv.) y TEA (13,2 g, 1,1 equiv.) (precaución: liberación de calor mientras se mezcla pentafluorofenol y TEA) en 75 ml de DCM durante 0,5 h a 0 °C a través de un embudo de adición. La mezcla se agitó a 0 °C durante un periodo adicional de 4 h.

La mezcla se filtró a través de un embudo Buchner y el clorhidrato de trietilamina sólido recogido se aclaró con DCM (3 x 40 ml). El filtrado se comprobó mediante RMN ³¹P (proporción de aproximadamente 1,14:1 favoreció del diastereómero S_P - pico campo bajo) y se dividió en dos partes de igual peso. Una de ellas se concentró a presión reducida. El residuo sólido de color blanco (31 g) se trituró en una mezcla de EtOAc y hexanos (150 ml, 20:80, v/v) a TA durante 17 h dejando tiempo para la resolución dinámica del isómero menos soluble S_P. La suspensión de color blanco se filtró y el sólido se aclaró con un 20 % de EtOAc en hexanos (2 x 25 ml). El sólido (22,58 g) se comprobó mediante RMN ¹H y RMN ³¹P y contenía producto en forma de un isómero contaminado con sal de clorhidrato de trietilamina. El sólido se disolvió y se repartió en 310 ml de EtOAc y 100 ml de agua. Después de la separación de la fase orgánica, la fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (3 x 80 ml), solución salina saturada (50 ml) y se secó sobre MgSO₄. La solución se concentró a presión reducida y a continuación se secó en alto vacío a TA hasta un peso constante para proporcionar 17,36 g de producto en forma de un sólido de color blanco a partir de una mitad de la reacción. El rendimiento es un 64 %. El licor madre anterior se concentró hasta un residuo gomoso (7,89 g) que contenía los reactivos con una proporción de 1:1,2 (deseado/indeseado) basado en RMN ³¹P.

Referencia

Ejemplo 10-4. Preparación de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico

Se cargó DCM (11,5 l) en un reactor de vidrio limpio y seco. Se cargó diclorofosfato de fenilo (2,3 kg, 10,9 mol) en el reactor en atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a continuación a 0 °C. A continuación se añadió clorhidrato de éster de isopropilo de L-alanina (1,83 kg, 10,9 mol) en una porción y se continuó la agitación durante 30 min. La masa de reacción se enfrió a -50 °C de temperatura interna mediante el uso de un baño de hielo seco/acetona. Se añadió lentamente una mezcla de TEA (2,1 equiv., 3,17 l) en DCM (11,5 l) a la solución de reacción anterior durante un período de 8 h para mantener la temperatura interna entre -40 y -50 °C. Después de completar la adición, la reacción se mantuvo en el mismo intervalo de temperatura durante aproximadamente 1 h. La mezcla se dejó calentar a 0 °C durante aproximadamente 4 h.

Mientras tanto, en otro reactor, se cargó DCM (6,9 l), y se añadió a continuación pentafluorofenol (2,0 Kg, 10,9 mol) en atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a 0 °C, a continuación se añadió TEA (1,1 equiv., 1,65 l) a la solución de pentafluorofenol (exotérmica) durante un periodo de aproximadamente 2 h. La solución resultante se añadió a su vez lentamente a la primera solución que contenía el diclorofosfato de fenilo y el éster de aminoácido mientras se mantenía la temperatura entre 0 y 5 °C durante un período de aproximadamente 7 h. Después de completar la adición, se continuó la agitación en ese intervalo de temperatura durante aproximadamente 4 h. El progreso de la reacción se monitorizó mediante HPLC. Cuando restaba menos de un 5 % de pentafluorofenol, se detuvo la reacción. Se ha de indicar que HPLC quiral indicó una mezcla equitativa de diastereómeros del producto en este punto.

La suspensión de reacción se filtró a través de un filtro Nutsche para retirar la mayoría de la sal de clorhidrato de trietilamina suspendida. La torta de sal se lavó con una cantidad en exceso de DCM (9 l) y este lavado se añadió al filtrado principal. El filtrado se concentró a presión reducida a 35 °C para dar un residuo sólido. El residuo sólido se evaporó conjuntamente con hexano (4 l) para reducir adicionalmente los niveles de DCM residual. A este sólido residual se añadieron 6 l de MTBE/hexano al 20 % y la suspensión se agitó durante aproximadamente 17 h a temperatura ambiente y se monitorizó mediante HPLC. El pH de la solución permaneció básico debido a la TEA residual. Durante este tiempo, tuvo lugar una resolución dinámica en la que el sólido precipitado fue el isómero deseado S_P-4 y el sobrenadante permaneció en equilibrio entre S_P-4 y R_P-4.

La suspensión se hizo pasar a través de un filtro Nutsche y el producto sólido deseado, todavía contaminado con clorhidrato de TEA, se lavó con MTBE/hexano al 5 % (1 l). El sólido se disolvió en acetato de etilo (35 l) y la solución se lavó con agua (3 x 35 l) y solución salina saturada (10 l) y a continuación la solución se secó sobre sulfato sódico sólido, se filtró y se concentró a presión reducida manteniendo la temperatura del reactor por debajo de 44 °C. El residuo sólido se evaporó conjuntamente con hexano (4 l). El reactor se llevó a temperatura ambiente y se añadió MTBE/hexano al 5 % (5 l). La suspensión espesa se agitó durante 15 min y a continuación el sólido se recogió por filtración. El sólido recogido se lavó con de hexano (2,5 l) y se secó en alto vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante para dar el producto final (S_P-4) en forma de un sólido de color blanco, 2,6 kg (53 %); 99,5 % puro mediante HPLC, 0,4 % del otro R_P-4.

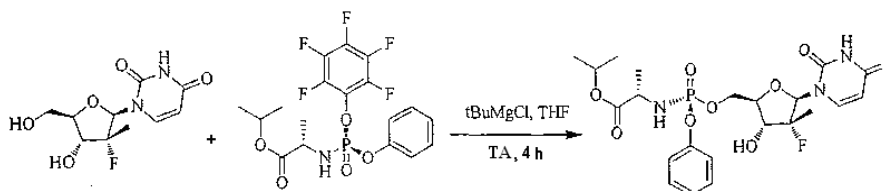
Referencia

Ejemplo 10-5. Preparación de
(S)-2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de isopropilo

A una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (3, 2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de *tert*-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico en bruto (4,08 g, 10 mmol) en THF (15 ml) durante un período de 10 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 72 h. Una banda conjunta de TLC con producto auténtico mostró que se había formado aproximadamente un 40-50 % del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

Referencia

Ejemplo 10-6. Preparación de
(S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de isopropilo (S_P-4) usando éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico y únicamente purificación por cristalización

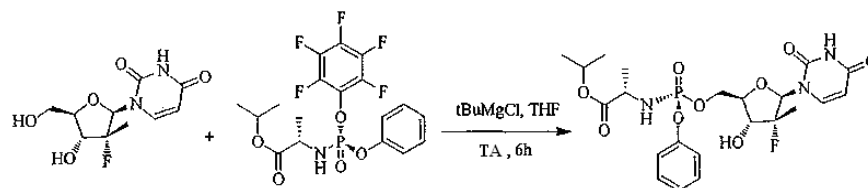


A una solución en agitación de 3 (10 g, 38,46 mmol, secada al vacío a 50 °C durante 20 h) en THF seco (165 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de *tert*-butilmagnesio en THF (47,5 ml, 80,77 mmol) durante un período de 20 min mientras se mantenía el matraz en un baño de agua fría (5 °C) en una atmósfera de nitrógeno. Después de completar la adición, el baño frío se retiró y la suspensión de color blanco se agitó a temperatura ambiente (20 °C) durante 30 min. A continuación se añadió a la mezcla de reacción una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico (20,9 g, 46,11 mmol) en THF anhidro (165 ml) durante un período de 30 min. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (20 °C) durante 3,3 h. Se continuó la agitación durante un período adicional de 1,5 h, momento en el que TLC indicó > 95 % de conversión y ninguna diferencia significativa en la intensidad de la impureza de 3',5'-bis-fosforamido desde 2 h. La mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl saturado ac. (10 ml) y a continuación el disolvente se evaporó a 25 °C. El residuo se repartió entre acetato de etilo (400 ml) y mezcla de cloruro de amonio saturado (60 ml)/agua (20 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con cloruro de amonio saturado (80 ml) y agua (3 x 60 ml). La fase acuosa se mantuvo separadamente hasta este punto. La fase orgánica se lavó con carbonato sódico ac. al 5 % (3 x 50 ml) y agua (2 x 60 ml). La primera fase acuosa se extrajo con acetato de etilo adicional (100 ml), se lavó con agua (2 x 20 ml) y a continuación la fase acuosa obtenida de los lavados de carbonato sódico se extrajo con el mismo extracto de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 20 ml) y se combinó con la porción principal. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron para dar un sólido espumoso (19,32 g). El residuo se disolvió en 60 ml de diclorometano (precipitó un sólido de color blanco y se formó una torta en aproximadamente cinco minutos) y a continuación se añadieron 25 ml de IPE. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El sólido de color blanco se filtró, se lavó con mezcla 1:1 fría (0 °C) de IPE/diclorometano (20 ml) y se secó para dar 11,77 g (58 % de rendimiento) del producto en forma de un sólido amorfo de color blanco. El sólido anterior se redisolvió en diclorometano (350 ml), se filtró y se evaporó a presión atmosférica (temperatura del baño de 45 °C) hasta un volumen de ~120 ml. La solución se dejó reposar a temperatura ambiente (21 °C) durante 20 h. El sólido cristalino de color blanco (solvato de diclorometano) se recogió por filtración, se lavó con diclorometano (10 ml) frío (0 °C) y se secó en alto vacío durante 4 h a temperatura ambiente para dar el producto no solvatado puro (10,62 g, 52 % de rendimiento) en forma de agujas de color blanco. Pureza por HPLC 99,8 %. Las propiedades espectrales coinciden con los valores informados en el presente documento.

Referencia

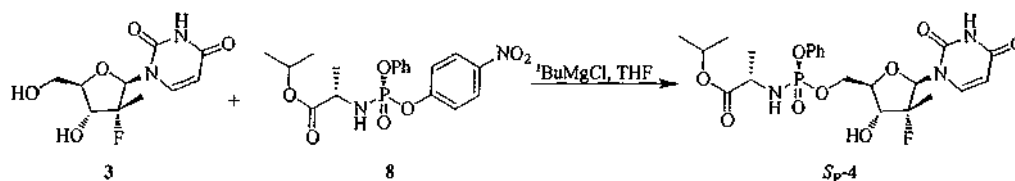
Ejemplo 10-7. Preparación de
(S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de isopropilo (S_P-4) usando éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico, con condiciones de reacción y

procesamiento modificados y únicamente purificación por cristalización



5 A una suspensión en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (3,5,0 g, 19,1 mmol, secada al vacío a 50 °C durante 20 h) en THF seco (75 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio en THF (23,7 ml, 40,35 mmol) usando un embudo de adición durante un período de 30 min a -5 °C. La suspensión de color blanco se agitó a esta temperatura durante 30 min y a continuación se calentó a temperatura ambiente (20 °C), temperatura a la que se agitó durante un periodo adicional de 30 min. La mezcla de reacción se enfrió a 5 °C y a continuación se añadió una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxy)-fenoxifosforilamino]propiónico (10,45 g, 23,06 mmol) en THF (50 ml) durante un período de 30 min. La mezcla se agitó a 5 °C durante 18 h, se enfrió a -5 °C y a continuación se inactivó con HCl 2 N (25 ml). Se añadió tolueno (100 ml) a la mezcla y se calentó a temperatura ambiente. Después de 20 min, las fases separaron. La fase orgánica se lavó con HCl 1 N (2 x 10 ml), agua (10 ml), Na₂CO₃ acuoso al 5 % (4 x 10 ml), agua (2 x 10 ml) y solución salina saturada (10 ml). Todas las fases acuosas se extrajeron de nuevo con tolueno (20 ml), y se lavaron con Na₂CO₃ acuoso al 5 % (2 x 5 ml), agua (10 ml) y solución salina saturada (5 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó hasta un volumen aproximado de 20 ml. Se añadió diclorometano (20 ml) a la solución y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El sólido se filtró, se lavó con mezcla 1:1 de MTBE/DCM (2 x 10 ml) y se secó en alto vacío para dar un sólido de color blanco (7,7 g). En este momento, HPLC del sólido indicó un 98,21 % de Sp-4, un 0,18 % de 3 sin reaccionar y un 0,67 % de impureza de 3',5'-bis-fosforamidato. El sólido anterior de Sp-4 se redisolvió en diclorometano (77 ml, calentado en un recipiente de presión a 55 °C) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 h. El sólido cristalino se filtró y se lavó con diclorometano frío (5 ml, 0 °C) y se secó en alto vacío para dar el producto puro en forma de un sólido de color blanco (6,9 g, 68 % de rendimiento, 99,79 % puro mediante HPLC).

La preparación y purificación de C o C' proporciona acceso directo a Sp-4 o Rp-4, como se ilustra en los siguientes ejemplos.



30 **Referencia**

Ejemplo 11. Preparación de Sp-4 (escala de 32 mg): a una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona 3 (32 mg, 0,12 mmol) en THF seco (1 ml) se añadió una solución 1 M de cloruro de t-butilmagnesio (0,26 ml, 0,26 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 3 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxy)-fenoxy]-fosforilamino]propiónico (8, isómero Sp) en THF (0,5 ml) durante un período de 3 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 42 h y a continuación se interrumpió con NH₄Cl saturado acuoso (10 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo y agua. El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía usando un gradiente de 0-4 % de metanol/diclorometano para dar Sp-4 en forma de un sólido espumoso (29 mg, 44,5 % de rendimiento). RMN ¹H y ³¹P están de acuerdo con lo que se desvela en el presente documento.

45 **Referencia**

Ejemplo 12. Preparación de Sp-4 (escala de 2,6 g, sin cromatografía): a una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxy)-fenoxy]-fosforilamino]propiónico (8, isómero Sp, 4,08 g, 10 mmol) en THF (15 ml) durante un período de 10 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 60 h y a continuación se inactivó con NH₄Cl saturado acuoso (20 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (150 ml) y secuencialmente, Na₂CO₃ acuoso al 10 % (3 x 20 ml) y agua (20 ml). El extracto orgánico

combinado se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de color amarillo pálido (3,8 g). El residuo se disolvió en diclorometano (7,6 ml) y a continuación se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. El sólido de color blanco se filtró, se lavó con IPE/diclorometano 1:1 (5 ml) y se secó al vacío para dar el producto puro en forma de un sólido de color blanco (1,85 g, 35 % de rendimiento).

5

Referencia

Ejemplo 13. Preparación de S_P -4 usando NaHMDS: a una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (71 mg, 0,27 mmol) en THF seco (2,0 ml) se añadió una solución 2,0 M de bis(trimetilsilil)amida sódica (NaHMDS) en THF (270 μ l, 0,54 mmol) a -78 °C durante un período de 2 min. Después de 30 min, se añadió a la mezcla una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8**, isómero S_P , 111 mg, 0,27 mmol) en THF (1 ml). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a esta temperatura durante 2 h y a continuación se calentó a -20 °C, temperatura a la cual se agitó durante un período adicional de 20 h. TLC indicó ~30 % de material de partida nucleósido sin reaccionar. Por lo tanto, se añadieron a la mezcla de reacción 0,5 equivalentes adicionales del reactivo (55 mg, 0,14 mmol) en THF (0,5 ml) y se agitó durante otras 6 h. La mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada de cloruro de amonio y a continuación se repartió entre acetato de etilo y agua. El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró para dar un residuo de color pardo claro. La cromatografía en columna del producto en bruto usando un gradiente de 0-5 % de metanol/diclorometano proporcionó S_P -4 (22 mg, 15 % de rendimiento), 3'-fosforamidato (**5**, isómero S_P , 11,5 mg, 16 % de rendimiento) y bis fosforamidato (**6**, S_P , isómero S_P , 12,6 mg).

10

15

20

Referencia

Ejemplo 14. Preparación de R_P -4 (escala de 260 mg): a una solución en agitación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (260 mg, 1 mmol) en THF seco (6 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,23 ml, 2,1 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 5 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero R_P) en THF (3 ml) durante un período de 3 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 96 h y a continuación se inactivó con NH_4Cl saturado acuoso (10 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (50 ml) y agua (2 x 20 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de color amarillo pálido (490 mg). El residuo se sometió a cromatografía usando un gradiente de 0-5 % de metanol/diclorometano para dar el producto en forma de un sólido de color blanco (160 mg, 30 % de rendimiento).

25

30

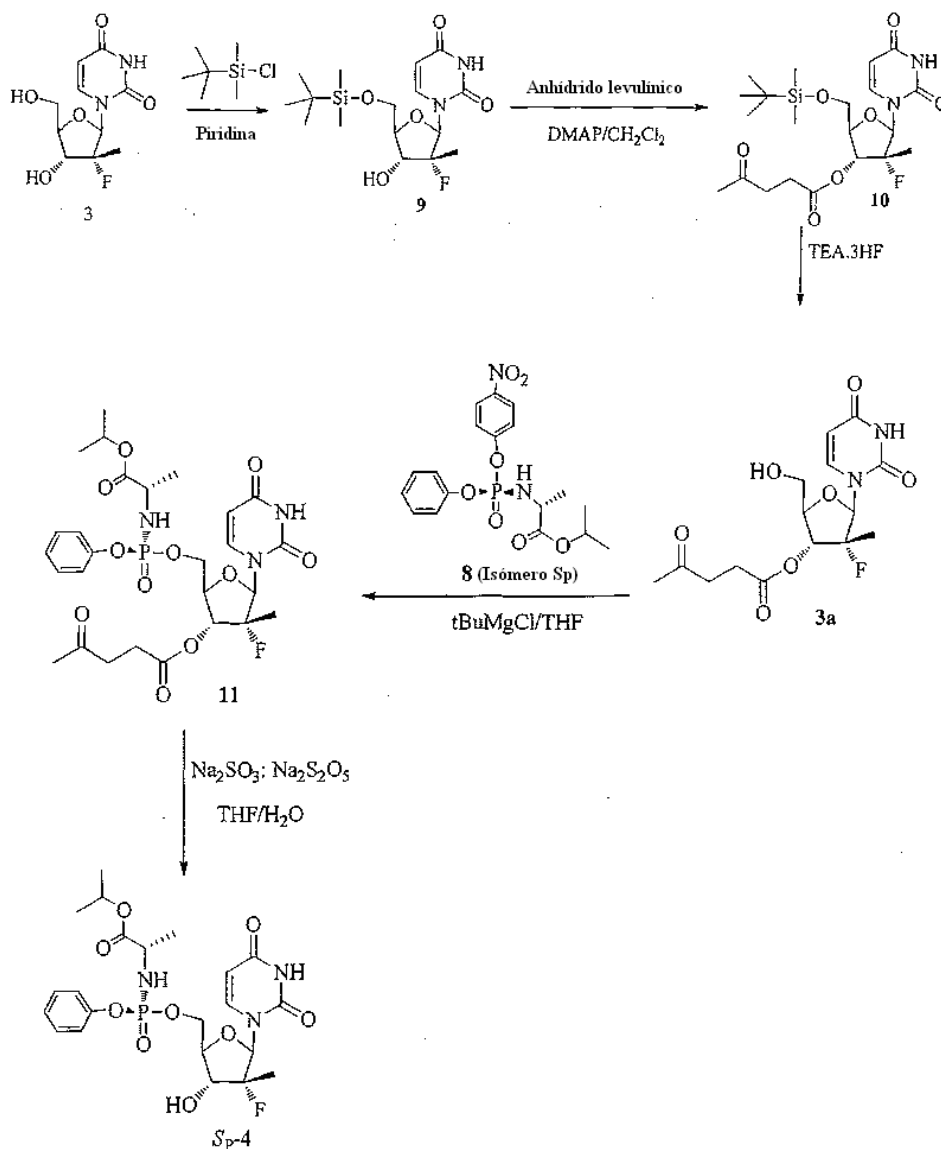
35

La preparación de S_P -4 o R_P -4 también se puede conseguir haciendo reaccionar 3' 3'-protegido con el reactivo apropiado **C** o **C'** o una mezcla que contenga **C** y **C'**, como se ilustra en los siguientes ejemplos.

40

Referencia

Ejemplo 15. Preparación de S_P -4 con 3a como compuesto intermedio sintético



Referencia

5 Ejemplo 15-1. Síntesis de 5'-O-*tert*-butildimetilsilil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (9):

A una solución en agitación de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3, 81,1 g, 312 mmol) en piridina seca (750 ml) se añadió gota a gota una solución de TBDMSCl (103,19 g, 685,6 mmol) en piridina seca (500 ml) durante un período de 45 min a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió metanol (85 ml) a la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 10 min y a continuación los disolventes se retiraron por destilación a presión reducida. Se añadió agua caliente (45 °C) (1 l) a la masa de reacción y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 500 ml), se lavó con agua (1 x 500 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. El acetato de etilo se retiró por destilación y el residuo obtenido se evaporó conjuntamente con tolueno (2 x 500 ml) para dar 9 en bruto en forma de una espuma de color blanco. Rendimiento = 116,9 g (cuantitativo). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 0,1 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 1,22 (d, 3H, J = 21 Hz), 2,50 (s, 2H), 3,75-4,05 (m, 4H), 5,54 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,73 (s, 1H), 6,0 (d, 1H, J = 18 Hz), 7,81 (d, 1H, J = 9 Hz), 8,57 (s a, 1H), 11,1 (s, 1H).

Referencia

20 Ejemplo 15-2. Síntesis de 5'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3'-O-levulinil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (10):

A una solución en agitación del nucleósido 9 (116,9 g, 312,1 mmol) en DCM (1 l) se añadió DMAP (30,5 g, 249,7 mmol) y esta se mantuvo en agitación a TA durante 20 min. Se añadió a la mezcla una solución de anhídrido levulínico (133,6 g, 642,3 mmol) en DCM (200 ml) y se mantuvo en agitación durante 24 h. TLC de la mezcla indicó

que se había completado la reacción. Se añadió agua fría (500 ml) y la mezcla se agitó durante 20 min. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con solución sat. de bicarbonato sódico (2 x 250 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y a continuación el disolvente se destiló a presión reducida para dar un aceite de color amarillo. Rendimiento en bruto: 197,6 g (135 %). El material se usó como tal para la siguiente etapa. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 0,11 (s, 6H), 0,94 (s, 9H), 1,34 (d, 3H, J = 21 Hz), 2,22 (s, 3H), 2,6-2,89 (m, 4H), 3,72 (m, 1H), 4,01 (d, 1H, J = 12 Hz), 4,23 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,33 (dd, 1H, J = 15 Hz), 5,73 (d, 1H, J = 6 Hz), 6,26 (d, 1H, J = 15 Hz), 8,12 (d, 1H, J = 12 Hz), 8,72 (s a, 1H).

Referencia

Ejemplo 15-3. Síntesis de 3'-O-levulinil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (3a):

Se disolvió **10** en bruto (197,6 g, ~312,1 mmol) en DCM (1 l) a lo cual se añadió TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) y se mantuvo en agitación durante una noche a temperatura ambiente. TLC de la mezcla indicó que la reacción se había completado en aproximadamente un 50 %. Se añadió otro equivalente de TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 6 h. En este punto, TLC indicó aproximadamente un 10 % de material de partida sin reaccionar. Se añadieron otros 0,25 equiv. de TEA.3HF (12,5 g, 78,0 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante una noche. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad para dar un aceite de color amarillo. El producto bruto de todos los lotes se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-2 % de MeOH en DCM) para dar 124,1 g de 3'-levulinato en forma de una espuma sólida de color blanco (90 % de rendimiento de purificación en tres etapas a partir de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina). RMN ¹H: (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,55 (d, 3H, CH₃, J = 20 Hz), 2,36 (s, 3H, CH₃), 2,8-3,03 (m, 5H, CH₂CH₃), 3,91-3,96 (dd, 1H, CH'), 4,2-4,25 (m, 1H, CH'), 4,34 (dd, 1H, CH, J = 8 Hz), 5,25 (dd, 1H, J = 16 Hz), 5,93 (d, 1H, J = 8 Hz), 8,20 (d, 1H, J = 8 Hz), 9,18 (s, 1H).

Referencia

Ejemplo 15-4. Síntesis estereoselectiva de (S)-éster de isopropilo del ácido (S)-2-[[[(1R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-(4-oxopentanoil)-4-metil-tetrahydrofuran-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (11):

A una solución del nucleósido (**3a**, 1,00 mmol, 358 mg) en 5 ml de THF anhidro que se enfrió a 0 °C se añadió tBuMgCl (1,7 M en THF, 2 equiv.) y se dejó que se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante media hora. A esta mezcla se añadió reactivo (aproximadamente un 97 % de pureza quiral) éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero S_P) (408 mg, 1,00 mmol, 1,00 equiv.) en una porción y se mantuvo en agitación a ta. Después de 16 h, había ~30 % de material de partida restante. La mezcla de reacción se interrumpió con 10 ml de solución saturada de NH₄Cl, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). La fase orgánica combinada se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó hasta sequedad para dar una espuma de color amarillo pálido (500 mg). Esta se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice usando un 2-5 % de metanol en cloruro de metileno para dar el producto en forma de una espuma de color blanco (275 mg) de aproximadamente un 97 % de pureza quiral P y material de partida sin reaccionar (162 mg). Basado en el material de partida consumido, el rendimiento fue de un 76 %. RMN ³¹P (CDCl₃, 162 MHz): 3,7 ppm; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,22 (dd, 6H, J = 6,4 Hz), 1,37 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,63-2,9 (m, 4H), 4,0 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,2-4,33 (m, 1H), 4,57 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,96-5,00 (sept, 1H), 5,2 (dd, 1H, J = 9 Hz), 5,42 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,19 (d, 1H, J = 18 Hz), 7,15-7,35 (m, 5H), 7,5 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 8,2 (s a, 1H).

Referencia

Ejemplo 15-5. Síntesis de (S)-éster de isopropilo del ácido (S)-2-[[[(1R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-hidroxi-4-metil-tetrahydrofuran-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (S_P-4)

Se preparó una solución de sulfito sódico por adición de Na₂S₂O₃ (1,51 g) y Na₂S₂O₅ (0,57 g) en agua (25 ml). A una solución del levulinato (**11**, 250 mg, 0,40 mmol) en THF anhidro (2,5 ml) se añadió 1,0 ml de la solución de sulfito sódico. Esta se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (15 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml), se secó y se evaporó para dar cuantitativamente un producto sólido de color blanco con aproximadamente un 97 % de pureza quiral P que coincidió con las propiedades físicas y espectrales de S_P-4 producido directamente a partir del nucleósido sin proteger.

Referencia

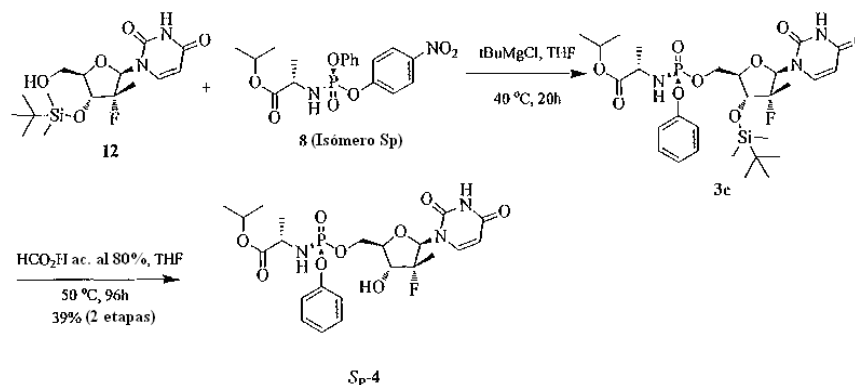
Ejemplo 16. Procedimiento alternativo para preparar S_P-4 a partir de 3a.

A una solución en agitación de éster de (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-fluoro-2-hidroximetil-4-metil-tetrahydrofuran-3-ilo del ácido 4-oxo-pentanoico (**3a**, 210 mg, 0,59 mmol) en THF seco (1,5 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,07 ml, 1,82 mmol) a temperatura ambiente durante un período de 2 min. Inicialmente, se observó

un precipitado de color blanco y después de 10 min la mezcla de reacción se volvió una solución de color amarillo oscuro. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8** (isómero S_P), 382 mg, 0,94 mmol) en THF (1,5 ml) durante un período de 3 min. La mezcla se calentó a 40 °C durante 5 h momento en el que TLC y RMN ¹H indicaron menos de un 2 % de material de partida sin reaccionar. La reacción se interrumpió con cloruro de amonio saturado acuoso y a continuación se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica combinada se lavó con solución acuosa al 10 % de Na₂CO₃ (3 x 10 ml), seguido de agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró para dar un residuo de color pardo (410 mg). El producto en bruto se disolvió en tetrahidrofurano (1,0 ml) y a continuación se añadió una solución acuosa de la mezcla de sulfito sódico (37 mg, 0,295 mmol) y metabisulfito sódico (224 mg, 1,18 mmol) en 1 ml de agua. La mezcla se calentó a 45 °C durante 20 h momento en el que se observó solo aproximadamente un 10 % de conversión por TLC, por lo que se añadió una cantidad adicional de sulfito sódico (74 mg) y metabisulfito sódico (448 mg) y el calentamiento se continuó durante un período adicional de 52 h. En este momento, se observó aproximadamente un 40 % de conversión por TLC. La mezcla de reacción se repartió entre agua y acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró para dar un residuo de color pardo (210 mg). La cromatografía en columna del residuo usando un gradiente de 0-5 % de MeOH/DCM proporcionó material de partida sin reaccionar (89 mg) y S_P-4 (57 mg, 18 % de rendimiento, 24 % basado en el material de partida recuperado).

Referencia

Ejemplo 17. Preparación de S_P-4 con 3c como compuesto intermedio sintético



Referencia

Ejemplo 17-1. Preparación de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2,4-diona, **12**.

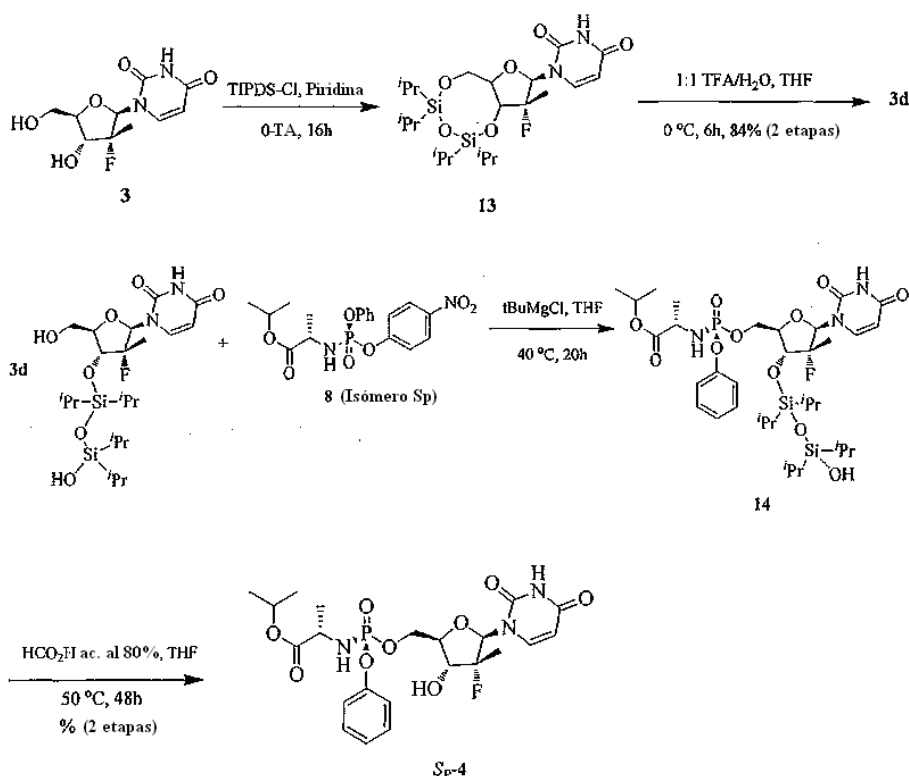
A una solución de **3** (10,0 g, 38,43 mmol) en piridina (50 ml) se añadió diclorometano (50 ml). La solución se enfrió a 0 °C. A la solución se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (14,32 g, 42,27 mmol) y la solución se agitó a 0 °C durante 5 h. Se añadió metanol (5 ml) para interrumpir la reacción. La solución se concentró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se repartió entre acetato de etilo (500 ml) y agua (50 ml). La solución orgánica se lavó con solución salina saturada (50 ml) y se secó (sulfato sódico, 4 g). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (100 ml). A la solución se añadieron imidazol (7,83 g, 115 mmol) y cloruro de t-butildimetilsililo (8,68 g, 57,6 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió metanol para interrumpir la reacción (5 ml) y el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se repartió entre acetato de etilo (500 ml) y agua (50 ml). La solución orgánica se secó (sulfato sódico, 4 g) y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (10-40 % de EtOAc en Hexano) para dar el producto intermedio 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS. Este se trató a su vez con ácido trifluoroacético al 1 % en diclorometano (200 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió agua (20 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante un periodo adicional de 1 h. Se añadió lentamente metanol (5 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante un periodo adicional de 1 h. Se añadió hidróxido de amonio para ajustar el pH de la solución a 7. La solución orgánica se separó, se secó (sulfato sódico, 4 g) y se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (1-5 % de metanol en diclorometano) para dar **12** en forma de 7,5 g de un sólido de color blanco con un 50 % de rendimiento en las tres etapas. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm) 11,48 (s a, 1H, NH), 7,94 (d, 1H, H-6), 6,00 (d, 1H, H-1'), 5,69 (d, 1H, H-5), 4,06 (dd, 1H, 3'-H), 3,85 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3,58 (d a, 1H, H-5'b), 1,27 (d, 3 H, 2-CH₃), 0,89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0,12 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

Referencia

Ejemplo 17-2. Preparación de S_P-4 usando 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroxi-3-metil-tetrahidrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2,4-diona (3c).

A una solución en agitación de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroxi-3-metil-tetrahidrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2,4-diona (**12**, 374 mg, 1 mmol) en THF seco (3 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,8 ml, 3,1 mmol) a temperatura ambiente durante un período de 2 min. Inicialmente, se observó un precipitado de color blanco y después de 10 min la mezcla de reacción se volvió una solución transparente de color amarillo oscuro. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8**, isómero S_P , 653 mg, 1,6 mmol) en THF (2,5 ml) durante un período de 3 min. La mezcla se calentó a 40 °C durante 20 h momento en el que TLC y RMN 1H indicaron menos de un 5 % de material de partida sin reaccionar. La mezcla de reacción se inactivó con cloruro de amonio saturado acuoso y a continuación se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con solución acuosa al 10 % de Na_2CO_3 (3 x 10 ml), seguido de agua (20 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró para dar un residuo de color pardo que contenía **3c** (850 mg). El producto en bruto se disolvió en tetrahidrofurano (2 ml) y se añadieron 0,8 ml de ácido fórmico acuoso al 80 % a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 96 h. Se observó aproximadamente un 70 % de conversión por TLC. La mezcla de reacción se vertió en bicarbonato sódico acuoso saturado frío y a continuación se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró para dar un residuo de color pardo (220 mg). La cromatografía en columna del residuo usando un gradiente de 0-5 % de MeOH/DCM proporcionó material de partida sin reaccionar (21 mg) y S_P-4 (77 mg, 35 % de rendimiento, 39 % de rendimiento basado en el material de partida recuperado).

Referencia

Ejemplo 18. Preparación de S_P-4 con **3d** como compuesto intermedio sintético

Referencia

Ejemplo 18-1. Preparación de **3d**

A una solución en agitación de **3** en piridina (20 ml) a 0 °C se añadió gota a gota TIPDS-Cl durante un período de 15 min. La mezcla se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente temperatura a la que se agitó durante 16 h. La

piridina se evaporó y el residuo se evaporó conjuntamente con tolueno (50 ml). El residuo se trituró a continuación con hexanos y el precipitado de color blanco se retiró por filtración usando un lecho de Celite. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un sólido espumoso (12,97 g). El producto en bruto (13) se redisolvió en tetrahidrofurano (75 ml) y se añadió una solución acuosa de TFA (75 ml, TFA/agua 1:1) a 0 °C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 6 h. TLC indicó ~5 % de material de partida. La mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado hasta pH 8 y a continuación se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó con agua, se secó y se concentró para dar un sólido cristalino de color blanco. La trituración adicional del sólido con hexanos (30 ml) proporcionó un sólido de color blanco que se filtró y se secó en alto vacío para dar **3d** (10,1 g, 84 % de rendimiento en 2 etapas). **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 8,83 (s a, 1H), 7,94 (d a, J = 6,0 Hz, 1H), 6,10 (d a, J = 18,4 Hz, 1H), 5,71 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 4,43 (s a, 1H), 4,36 (dd, J = 22,6, 9,0 Hz, 1H), 4,27 (s a, 1H), 4,10 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 4,03 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 3,92 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 1,39 (d, J = 22,0 Hz, 3H), 1,11-0,92 (m, 28H).

Referencia

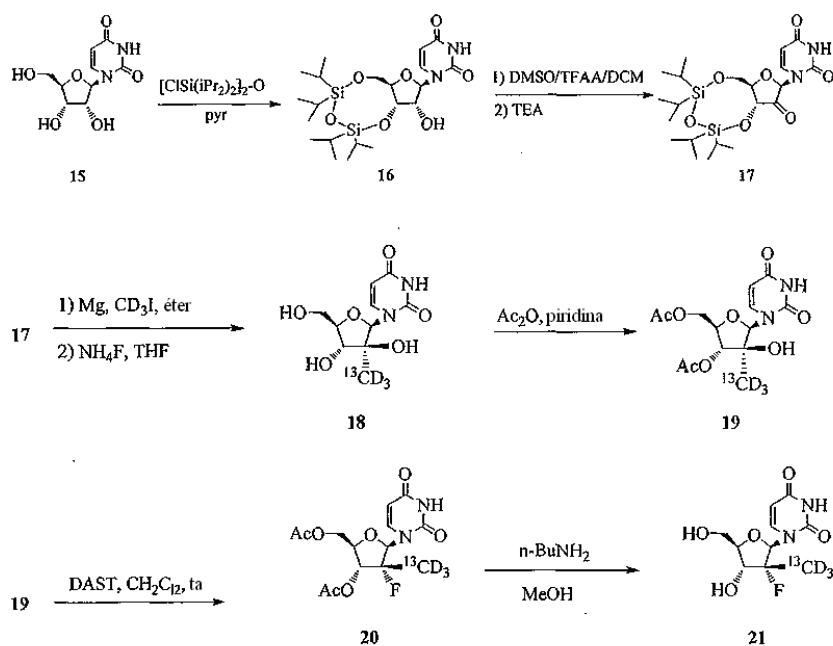
15 Ejemplo 18-2. Preparación de Sp-4

A una solución en agitación de **3d** (520 mg, 1 mmol) en THF seco (5 ml) se añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,8 ml, 3,1 mmol, 3,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxyfosforilamino]propiónico (**8**, isómero Sp, 653 mg, 1,6 mmol) en THF (1 ml) durante un período de 3 min. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 60 h. RMN ¹H y ³¹P de la muestra en bruto indicó una mezcla de diastereómeros de aproximadamente 1:0,76. La mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (20 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (150 ml) y secuencialmente, Na₂CO₃ acuoso al 10 % (3 x 20 ml) y agua (20 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de color amarillo pálido (**14**, 878 mg).

El compuesto anterior, **14**, se redisolvió en tetrahidrofurano (3 ml) y a continuación se añadió ácido fórmico acuoso al 80 %. La mezcla se calentó a 55 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, y a continuación se inactivó con bicarbonato sódico acuoso saturado (pH 7,0). La mezcla de reacción se repartió a continuación entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico y se concentró para dar 560 mg del residuo. El residuo se sometió a cromatografía usando un gradiente de 0-5 % de metanol/diclorometano para dar material de partida sin reaccionar (**14**, 242 mg) y Sp-4 (80 mg, 15 % de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco.

Referencia

35 Ejemplo 19. Preparación de Sp-4 marcado isotópicamente



40

Referencia

Ejemplo **19-1.** **Preparación** **de**
1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-hidroxi-2,2,4,4-tetraisopropiltetrahydro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-il)pirimidi
n-2,4(1H,3H)-diona, 16

Se evaporó conjuntamente hasta sequedad uridina (**15**, 100,0 g, 409,5 mmol) con piridina anhidra (600 ml) y Serra suspendió en piridina anhidra (700 ml). A esta suspensión fina en agitación se añadió 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (135,7 g, 482,5 mmol) durante 60 min a temperatura ambiente. Después de agitación de la suspensión fina durante 17 h a temperatura ambiente, la reacción se interrumpió por adición de metanol (20 ml) y a continuación se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre acetato de etilo (1,5 l) y agua (2 l). La fase orgánica se lavó además con ácido clorhídrico al 5 % (2 x 1 l), solución salina saturada (500 ml), se secó sobre sulfato sódico sólido (50 g), se filtró y se concentró a presión reducida hasta el producto en bruto, aproximadamente 250 g. El residuo se sometió a una columna de filtración usando gel de sílice (1,75 kg) y un gradiente de acetato de etilo en hexanos de 20-65 %. Se juzgaron las fracciones de producto puro mediante el TLC homogénea (Rf 0,55 en hexanos-acetato de etilo 1:1), se combinaron y se concentraron a presión reducida y se secaron (40 °C, 0,2 mm Hg, 24 h) para proporcionar 145,5 g (76 %) de **16** en forma de una espuma sólida de color blanco. También se recogió una fracción adicional (35 g) de **16** ligeramente impuro. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm) 11,35 (s, 1H, NH), 7,66 (d, 1H, J = 7,6 Hz, H-6), 5,57 (d, 1H, J = 4,8 Hz, 2'-OH), 5,50-5,49 (m, 2H, 1'-H y H-5), 4,14-4,18 (m, 3H, 2', 3', 4'-H), 3,97-3,87 (m, 2H, 5'-Ha y Hb), 1,02-0,95 (m, 28H, CH(CH₃)₂).

Referencia

Ejemplo **19-2.** **Preparación** **de**
1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-tetraisopropil-9-oxotetrahydro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]tri-oxadisilocin-8-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona, 17

A un matraz de fondo redondo seco de tres bocas se añadieron DCM anhidro (600 ml) y DMSO (30,82 g, 394,5 mmol). La solución se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco/acetona en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió anhídrido trifluoroacético (puro, 77,7 g, 369,8 mmol) a través de una jeringa durante 40 min y proporcionó una mezcla turbia. A la mezcla se añadió gota a gota una solución del derivado de uridina **16** en DCM (600 ml) durante 75 min a -78 °C a través de un embudo de adición. La mezcla heterogénea se agitó durante 2 h a -78~-65 °C y a continuación se añadió rápidamente trietilamina anhidra (92 ml) a través de una jeringa para formar una solución transparente de color amarillo claro. Después de 1 h a baja temperatura, la reacción se completó según se muestra mediante TLC (30 % de EtOAc en hexanos). El baño de refrigeración se retiró y la mezcla de reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se interrumpió por adición de NH₄Cl sat. (180 ml). Se añadió agua (200 ml) y la fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo de nuevo con DCM (300 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (3 x 400 ml), solución salina saturada (150 ml), y se secó sobre Na₂SO₄. La retirada del disolvente proporcionó un residuo pegajoso de color pardo.

El residuo de aceite en bruto (que contenía trazas de DCM) se almacenó durante una noche en el congelador. Después de una noche, se observó cierta cantidad de sólido cristalino en el aceite. El aceite se disolvió en 500 ml de hexanos a temperatura ambiente. La solución se almacenó en el congelador durante 24 horas y se formó más sólido. El sólido se recogió a través de filtración y se aclaró con DCM frío al 10 % en hexanos (1 l) para retirar la mayoría de color naranja. El sólido (**17**) se secó al vacío durante 2 h y a continuación se secó al aire durante 24 h. El sólido pesó 21 g después de secado a 50 °C al vacío. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (10-70 % de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar una cantidad adicional de 37 g (rendimiento combinado de un 97 %) de **17** en forma de un sólido de color naranja claro.

Referencia

Ejemplo **19-3.** **Preparación** **de**
1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)-3-¹³C-perdeuteriometil-tetrahydrofuran-2-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona, 18

Se lavó magnesio (3,53 g, 147 mmol), con ácido clorhídrico acuoso al 5 % y se secó (50 °C, 0,2 mm Hg, 24 h), y se puso en un matraz de fondo redondo de dos bocas equipado con un agitador magnético y un condensador. El matraz se llenó con gas argón y a continuación se añadió éter anhidro (80 ml). Al magnesio en éter se añadió lentamente yoduro de perdeuterio-¹³C metilo (15,06 g, 110,3 mmol), que generó una reacción exotérmica. Después de que se enfriara la mezcla de reacción, el sobrenadante se transfirió a una solución de compuesto **17** seco (50 °C, 0,2 mm Hg, 15 h) (10,0 g, 20,63 mmol) en THF anhidro (1 l) a -50 °C durante 20 min. Se dejó que aumentara la temperatura hasta -40 °C y la mezcla se agitó entre -40 y -25 °C durante 4 h. Después de la finalización de la reacción, la mezcla se diluyó con EtOAc (1 l) a -50 °C y a continuación se añadió lentamente solución salina saturada (300 ml). La fase orgánica se separó y a continuación se lavó con solución saturada de cloruro de amonio (300 ml x 2) y se secó con sulfato sódico. Después de filtración y concentración a presión reducida, el residuo se disolvió en MeOH (250 ml). Se añadieron fluoruro de amonio (12 g) y TBAF (400 mg). La mezcla resultante se agitó a 90 °C durante 7 h y a continuación se

concentró con gel de sílice (20 g) a presión reducida. Después de secado exhaustivo al vacío, el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:20 a 1:10) para dar el compuesto **18** (5 g, 46 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm) 11,26 (s, 1H, NH), 7,65 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-6), 5,77 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H-1'), 5,57 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-5), 5,46 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz, HO-3'), 5,24 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, HO-2'), 5,14 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz, HO-5'), 3,74-3,56 (m, 4H, H-3', 4', 5', 5'').

Referencia

Ejemplo 19-4. Preparación de acetato de ((2R,3R,4S,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-hidroxi-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahydrofuran-2-il)metilo, 19

A una solución de compuesto **18** (5,00 g, 19,1 mmol) en piridina anhidra (100 ml) se añadió anhídrido acético (3 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 h, se diluyó con EtOAc (250 ml), se lavó con agua (50 ml x 3), y se secó con sulfato sódico. Después de filtración y concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (0 a 5 % de MeOH en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **19** (4,0 g, 68 %) en forma de un sólido de color gris.

Referencia

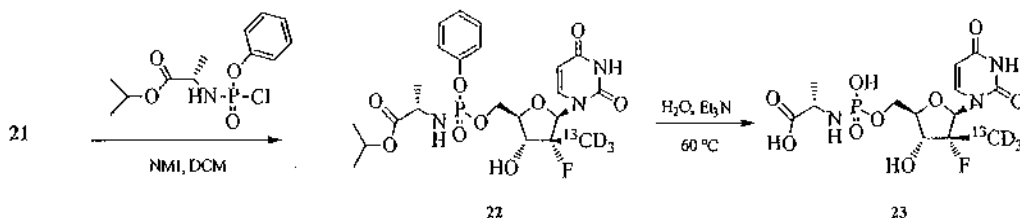
Ejemplo 19-5. Preparación de acetato de ((2R,3R,4R,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahydrofuran-2-il)metilo, 20

A una solución de compuesto **19** (2,33 g, 6,73 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (60 ml) se añadió lentamente DAST (1,33 ml, 10,1 mmol) a -78 °C. La mezcla resultante se agitó durante 30 min después de exponerse a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo dos reacciones adicionales a escala de 2,33 g y una reacción a escala de 1,00 g exactamente de la misma forma. Se combinaron las cuatro mezclas de reacción, se diluyeron con CH₂Cl₂ (300 ml), y se lavaron con hielo-agua (100 ml x 2) y a continuación con solución acuosa fría de NaHCO₃ (100 ml x 2). Después de secado, filtración, y concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (0 % a 50 % de EtOAc en hexanos, el compuesto salió aproximadamente un 48 %) para dar el compuesto **20** (2,0 g, 24 % a partir de 7,99 g totales de compuesto **19**) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) 8,27 (s, 1H, NH), 7,55 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-6), 6,17 (d, 1H, *J* = 18,8 Hz, H-1'), 5,78 (dd, 1H, *J* = 1,2, 8,4 Hz, H-5), 5,12 (dd, 1H, *J* = 9,6, 21,6 Hz, H-3'), 4,40-4,31 (m, 3H, H-4', 5', 5''), 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,15 (s, 3H, CH₃).

Referencia

Ejemplo 19-6. Preparación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-¹³C-perdeuteriometil-tetrahydrofuran-2-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona, 21

A una solución de compuesto **20** (2 g, 5,74 mmol) en metanol (20 ml) se añadió *n*-butilamina (6 ml). La mezcla resultante se agitó a ta durante 15 h y se concentró con gel de sílice al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (0 a 10 % de MeOH en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **21** (1,3 g, 85 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (CD₃OD) δ (ppm) 8,08 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-6), 6,13 (d, 1H, *J* = 18,4 Hz, H-1'), 5,70 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-5), 3,99 (d, 1H, *J* = 13,6 Hz, H-5'), 3,97-3,91 (m, 2H, H-3', 4'), 3,80 (dd, 1H, *J* = 2,0, 12,8 Hz, H-5''), ESMS (M+1) estimado 265, observado 265.



Referencia

Ejemplo 19-7. Preparación de (S)-2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de isopropilo, 22

A una solución del nucleósido **21** sin proteger (207 mg, 0,783 mmol) y *N*-metilimidazol (0,4 ml, 5 mmol) en THF (4 ml) se añadió gota a gota el fosforocloridato preparado previamente en THF (1,0 M, 2,35 ml, 2,35 mmol) a 0 °C. La reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se añadieron agua (1 ml) y EtOAc

(5 ml). La solución orgánica se lavó con citrato sódico monobásico sat. ac. (2 x 2 ml), NaHCO₃ sat. ac. (1 x 2 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice usando 0 a 5 % de ⁱPrOH en CH₂Cl₂ como eluyentes para dar el fosforamidoato, **22** (216 mg, 52 %, mezcla 1:1 de diastereómeros P) en forma de un sólido de color blanco: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,54 (s, 1H), 7,56 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,40-7,35 (m, 2H), 7,23-7,18 (m, 3H), 6,14-5,96 (m, 2H), 5,89 (dd, J = 5,6, 25,6 Hz, 1H), 5,55 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 4,85 (dc, J = 1,6, 6,0 Hz, 1H), 4,44-4,32 (m, 1H), 4,25 (m, 1H), 4,06-3,98 (m, 1H), 3,86-3,70 (m, 2H), 1,30-1,08 (m, 9H); RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-d₆) δ 4,90, 4,77; LRMS (IEN) [M + H]⁺ calculado para C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534,5, encontrado 534,4.

10 Referencia

Ejemplo 19-8. Preparación de ácido (2S)-2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahidrofuran-2-il)metoxi)(hidroxi)fosforil)amino)propanoico, 23

Se suspendió el fosforamidoato **22** (147 mg, 0,276 mmol) en trietilamina (2 ml) y agua (0,5 ml), y se calentó a 60 °C durante 30 h. A continuación se evaporaron los componentes volátiles a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice mediante elución con 50-70 % de ⁱPrOH en CH₂Cl₂ y a continuación, 0 a 20 % de NH₄OH en ⁱPrOH para dar **23** en forma de un sólido de color blanco (95 mg, 83 %): RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,00 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,98 (d, J = 19,2 Hz, 1H), 5,52 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,02-3,81 (m, 4H), 1,10 (d, J = 6,8 Hz, 3H); RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-d₆) δ 8,12; LRMS (IEN) [M + H]⁺ calculado para C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₉P 416,3, encontrado 416,4.

Propiedades de las muestras de R_P-4, 4, y S_P-4

Las muestras de R_P-4, 4, y S_P-4 se realizaron mediante difracción de rayos X de polvo (XRPD), espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), adsorción de vapor gravimétrica (GVS), solubilidad acuosa termodinámica, y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Referencia

Ejemplo 20. Difracción de rayos X de polvo

Las muestras de R_P-4, 4, y S_P-4 se realizaron mediante difracción de rayos X de polvo (XRPD) en el siguiente régimen.

a. Bruker AXS/Siemens D5000

Los patrones de difracción de rayos X de polvo se recogieron en un difractómetro Siemens D5000 usando la radiación K_α del Cu (40 kV, 40 mA), goniómetro θ-θ, divergencia de V20 y rendijas de recepción, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. Se comprueba el rendimiento del instrumento usando un patrón certificado de corindón (NIST 1976). El software usado para la recogida de datos fue Diffrac Plus XRPD Commander v2.3.1 y los datos se analizaron y se presentaron usando Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones ambientales

Las muestras procesadas en condiciones ambientales se prepararon en forma de especies de placa plana usando polvo según se recibió. Se empaquetaron con cuidado aproximadamente 35 mg de la muestra en una cavidad cortada en una oblea de silicio pulida de fondo cero (510). La muestra se hizo girar en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recogida de datos son: intervalo angular: 2 a 42° 2θ; tamaño de etapa: 0,05° 2θ; y tiempo de recogida: 4 s.etapa⁻¹.

b. Bruker AXS C2 GADDS

Los patrones de difracción de rayos X de polvo se recogieron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando la radiación K_α del Cu (40 kV, 40 mA), etapa XYZ automatizada, microscopio de video láser para posicionamiento del automuestreador y detector de área bidimensional HiStar. La óptica de rayos X consiste en un espejo individual de múltiples capas Gobel acoplado a un colimador estenopeico (*pinhole*) de 0,3 mm.

La divergencia del haz, es decir, el tamaño eficaz del haz de rayos X sobre la muestra, fue de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de barrido continuo de θ-θ con una distancia muestra-detector de 20 cm que proporciona un intervalo 2θ eficaz de 3,2°-29,7°. Por lo general, la muestra se debería exponer al haz de rayos X durante 120 segundos. El software usado para la recogida de datos fue GADDS para WNT 4.1.16 y los datos se analizaron y se presentaron usando Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones ambientales

5 Las muestras procesadas en condiciones ambientales se prepararon en forma de especies de placa plana usando polvo según se recibió sin moler. Se presionaron ligeramente aproximadamente 1-2 mg de la muestra en un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana.

Difracción de rayos X de polvo (XRPD)

10 Mediante XRPD, se descubrió que **4** era amorfo (véase la **Figura 1**). El análisis de XRPD de alta resolución de R_{P-4} preparado de acuerdo con el Ejemplo 3 confirmó un sólido cristalino que exhibía un patrón de polvo diferente al de S_{P-4} (preparado de acuerdo con el Ejemplo 4, Método 4), que también se confirmó que era un sólido cristalino. La tabla de resultados de XRPD para R_{P-4} y S_{P-4} se muestra en la **Tabla 1** excluyéndose todos los picos que exhibieron una intensidad $\leq 5\%$ (R_{P-4}) y $\leq 3\%$ (S_{P-4}).

15

Tabla 1. Datos de XRPD para R_{P-4} y S_{P-4} .

Datos de XRPD para R_{P-4}		Datos de XRPD para S_{P-4} (Forma 1)	
Ángulo 2-Theta °	Intensidad %	Ángulo 2-Theta °	Intensidad %
6,616	51,1	4,900	6,8
7,106	40,5	5,190	19,8
8,980	30,0	7,501	100,0
11,020	21,7	8,355	4,1
11,559	77,1	8,965	7,7
11,950	12,8	9,619	21,2
13,023	5,2	10,145	3,6
14,099	6,2	14,393	4,9
15,121	5,7	16,300	7,0
15,624	5,4	16,688	10,6
16,003	17,8	17,408	5,5
17,882	100,0	17,820	8,2
18,567	8,8	18,262	31,5
19,564	22,7	18,600	6,3
20,280	5,6	18,900	7,3
20,728	42,5	19,150	6,1
21,047	19,9	19,696	4,8
21,671	22,0	20,398	4,4
21,943	23,3	20,710	6,9
22,214	18,9	21,950	6,1
23,074	28,5	22,175	12,2
24,145	30,3	22,511	5,6
24,355	39,1	22,924	3,1
25,366	7,6	23,360	6,5
26,146	36,2	23,538	7,1
27,000	9,0	23,910	7,4
27,313	15,6	24,873	3,7
27,677	22,7	25,123	4,9
28,219	12,8	25,649	4,2
28,661	6,2	26,748	5,2

29,450	6,8	27,339	3,7
29,735	9,4	27,646	3,5
31,372	8,2	28,066	3,1
31,967	10,9	29,050	3,0
32,295	6,4	29,541	3,6
33,001	11,4	30,178	3,8
33,774	11,8	31,648	3,1
34,385	6,6	32,721	3,5
34,734	6,5	33,154	3,0
35,600	7,3	33,923	3,5
35,965	13,1	34,341	3,1
36,409	14,7	35,465	3,5
36,880	7,0	36,923	3,1
37,509	5,9	37,760	3,4
37,870	6,0	38,404	3,3
38,313	5,8	40,416	3,1
38,943	8,4		
40,093	6,6		
40,511	7,8		
41,429	6,5		

Se molió una muestra de S_P-4 con un mortero, y a continuación se hizo pasar sucesivamente a través de tamices de 500 y 250 µm para producir la muestra en forma de un polvo fino. Esta muestra se analizó nuevamente mediante XRPD de alta resolución, confirmando que no se produjo ningún cambio de forma.

5

Ejemplo 21. Estudios de cristalización para S_P-4

S_P-4 cristalino exhibe polimorfismo. Por lo tanto, un aspecto se refiere a un S_P-4 cristalino y sus formas polimórficas individuales. S_P-4 puede existir en al menos cinco formas polimórficas, denominadas Formas 1-5. Además, también se puede preparar S_P-4 amorfo. Una cristalización habitual proporciona disolver aproximadamente 100 mg de S_P-4 en un volumen apropiado de disolvente de cristalización (acetonitrilo (5 vol), cloroformo (5 vol), acetato de n-butilo (7 vol), diclorometano (50 vol), anisol (7 vol), y MTBE/heptano 1:1 (50 vol)) y a continuación permitir la evaporación de la solución a 5 °C. Se obtuvieron diversas formas cristalinas, pero cada forma, tras filtración y/o secado, proporcionó la Forma 1.

15

Las Formas 1, 2 y 3 son una forma no solvatada, un solvato 1:1 de DCM y un solvato 1:1 de cloroformo, respectivamente, como se confirmó mediante análisis por rayos X de cristal individual y XRPD. Las Formas 4 y 5 se obtuvieron a partir de la cristalización de S_P-4 de soluciones de acetonitrilo y anisol, respectivamente. No se pudieron recoger datos suficientes para determinar si las Formas 4 y 5 eran no solvatadas, hidratadas o solvatadas dado que no se obtuvieron cristales individuales de suficiente calidad. Las Formas 4 y 5 se transforman en la Forma 1 tras filtración. Se obtienen dos formas cristalinas adicionales tras cristalización de S_P-4 a partir de acetato de n-butilo ("BuAc") y una solución que contiene metil butil éter (MTBE) y heptano; tras filtración, estas dos formas cristalinas se convierten en la Forma 1. Las Formas 2 y 3 también se transforman en la Forma 1 tras aislamiento. La Forma 1 es una forma no solvatada que exhibe una amplia endoterma de fusión con una temperatura de inicio de 94,3 °C y ΔH_{fus} de 24,0 kJ mol⁻¹. En la **Figura 4** se representa un patrón de XRPD adicional de la Forma 1 de S_P-4.

20

25

Conversión de S_P-4, Forma 1 en S_P-4, Forma 6

La Forma 1 se puede convertir en la Forma 6 en al menos dos maneras.

30

En primer lugar, permitiendo que cristales finos de la Forma 1 se expongan a la humedad atmosférica durante varios días, se produce un monohidrato de la Forma 1 con una apariencia de una goma solidificada. Después de moler el monohidrato sólido en un polvo fino, el patrón de XRPD permanece consistente con la Forma 1. Tras dejarlo reposar en un recipiente abierto durante 6-10 semanas, el material molido cambia lentamente a la Forma 6 en forma de un sólido anhidro. La Forma 1 es estable durante al menos 2 años en un recipiente cerrado herméticamente.

35

5 Alternativamente, la Forma 1 se puede suspender en agua a 5-50 mg/ml a temperatura ambiente y en el transcurso de unas pocas horas se transforma en la Forma 6. La eficacia del proceso de transformación del agua se puede mejorar por calentamiento del agua hasta un punto que disuelva más Forma 1 y aumente la fluidez de la parte inmiscible de Sp-4 de una goma rígida a un aceite suspendido a aproximadamente el mismo nivel o superior. A lo largo del tiempo, la Forma 6 puede comenzar a cristalizar a 50 °C. El enfriamiento adicional de la suspensión a 0-10 °C conduce a una mayor recuperación de sólido. La cristalización a partir de agua también retira las impurezas traza más polares, conduciendo a una mejora de la pureza global.

10 La redisolución de la Forma 6 en un disolvente orgánico tal como diclorometano o acetonitrilo seguido de cristalización proporciona la Forma 1, incluso cuando se siembra con Forma 6 cristalina.

15 En un matraz de fondo redondo de una boca de 100 ml equipado con un septo de caucho y agitador magnético se cargaron 1,04 gramos de Sp-4, Forma 1. Pureza por HPLC 99,7 %. Se cargaron 40 ml de agua DI. Se comenzó a agitar la suspensión de forma vigorosa mientras se calentaba a 50 °C. Una vez se alcanzó la temperatura de 50 °C, la solución en su mayor parte homogénea se mantuvo durante 60 min, tiempo durante el cual comenzaron a precipitar sólidos a partir de la solución, formando una suspensión poco espesa. La suspensión se enfrió a 20 °C durante 90 min y se mantuvo durante 16 horas a 20 °C, seguido de enfriamiento adicional a 0-5 °C durante 30 min y se mantuvo a 0-5 °C durante 2,5 horas. La suspensión se filtró en un embudo de fritada de vidrio de porosidad media y se lavó con 10 ml de agua enfriada en hielo. La torta húmeda se secó por succión durante 2 horas antes de secarse en un horno de vacío una noche durante 23 horas a 50 °C. Se aislaron 0,88 g (84,6 % de recuperación) de Sp-4, Forma 6.

La Forma 6 tiene un punto de fusión observado de aproximadamente 124,5-126 °C.

25 **Referencia**

Ejemplo 21-1. Forma 1 de Sp-4

Un listado de los picos de la Forma 1 de Sp-4 se presenta en la **Tabla 2**.

Ángulo	Intensidad %
2-Theta °	%
5,0	74,8
7,3	100,0
7,8	2,2
8,2	6,8
8,8	9,3
9,4	23,5
10,0	8,4
11,4	4,2
13,3	3,0
14,2	6,1
14,9	3,5
16,1	7,9
16,6	13,2
17,3	15,4
17,7	10,1
18,1	42,6
18,4	7,6
18,7	11,4
18,9	5,7
19,3	5,0
19,6	2,9

20,2	8,5
20,5	11,5
20,8	3,6
21,8	7,2
22,0	14,5
22,4	9,6
23,2	5,3
23,4	5,8
23,5	4,6
23,8	7,4
24,0	3,1
24,7	2,5
25,0	13,0
25,5	3,1
26,6	4,5
27,2	3,2
27,5	2,2
28,1	2,9
30,0	3,2

Referencia

Ejemplo 21-2. Forma 2 de Sp-4

5

Un patrón de XRPD de la Forma 2 de Sp-4 se representa en la **Figura 5**.

Un listado de los picos de la Forma 2 de Sp-4 se presenta en la **Tabla 3**.

Ángulo 2-Theta°	Intensidad % %
4,9	44,1
5,1	19,1
6,9	62,1
8,7	6,8
9,8	28,6
10,1	10,4
13,7	7,0
16,7	3,1
19,5	8,9
19,8	45,5
20,1	18,6
20,4	3,6
20,6	25,6
20,9	15,9

21,1	10,9
22,1	3,4
24,6	38,7
24,7	100,0
25,1	61,2
26,1	53,3
39,0	6,3

Referencia**Ejemplo 21-3. Forma 3 de S_P-4**

5

Un patrón de XRPD de la Forma 3 de S_P-4 se representa en la **Figura 6**.

Un listado de los picos de la Forma 3 de S_P-4 se presenta en la **Tabla 4**.

Ángulo	Intensidad %
2-Theta °	%
5,0	10,0
6,9	23,3
9,8	22,6
19,7	34,8
20,6	100,0
21,8	10,5
24,6	65,3
34,7	4,1

10

Referencia**Ejemplo 21-4. Forma 4 de S_P-5**

15

Un patrón de XRPD de la Forma 4 de S_P-4 se representa en la **Figura 7**.

Un listado de los picos de la Forma 4 de S_P-4 se presenta en la **Tabla 5**.

Ángulo	Intensidad %
2-Theta °	%
5,0	29,8
6,8	100,0
8,2	4,8
8,7	5,2
9,9	3,8
13,7	1,7
14,9	4,8
19,9	22,5
20,4	2,1
20,6	20,0
20,9	20,0

24,7	3,4
24,9	29,9
25,1	1,5
36,8	3,1

Referencia

Ejemplo 21-5. Forma 5 de S_P-4

5

Un patrón de XRPD de la Forma 5 de S_P-4 se representa en la **Figura 8**.

Un listado de los picos de la Forma 5 de S_P-4 se presenta en la **Tabla 6**.

Ángulo	Intensidad %
2-Theta °	%
5,2	52,9
6,6	100,0
7,1	25,9
9,7	12,1
10,4	16,4
13,4	11,4
15,7	25,8
19,1	31,1
19,9	12,9
20,0	9,0
21,3	3,5
25,0	22,3
25,6	2,3
26,3	5,9
26,9	2,0
31,7	2,1

10

Ejemplo 21-5. Forma 6 de S_P-4

Un patrón de XRPD de la Forma 6 de S_P-4 se representa en la **Figura 21**.

15

Un listado de los picos de la Forma 6 de S_P-4 se presenta en la siguiente tabla.

Ángulo 2-Theta °	Espaciado d Å	Intensidad %
6,08	14,51	66,7
8,2	10,77	62,1
10,38	8,52	29,8
10,85	8,14	10,4
12,17	7,26	12,0
12,7	6,96	66,4
13,73	6,44	14,9
14,1	6,27	13,8

15,91	5,57	3,1
16,83	5,26	8,7
17,17	5,16	19,7
17,66	5,01	56,2
17,95	4,93	37,7
18,79	4,72	59,0
19,1	4,64	14,3
19,41	4,57	37,2
19,8	4,48	46,0
20,11	4,41	68,8
20,82	4,26	100,0
21,81	4,07	36,8
22,03	4,03	7,4
23,03	3,86	14,2
23,26	3,82	21,6
23,64	3,76	6,3
23,89	3,72	7,0
24,73	3,6	3,3

Referencia**Ejemplo 21-7. Sp-4 (amorfo)**

5

Un patrón de XRPD para Sp-4 amorfo se representa en la **Figura 9**.

Referencia**Ejemplo 22. Cristalografía de rayos X de cristal individual de Sp-4 y sus solvatos**

10

Referencia**Ejemplo 22-1. Cristalografía de rayos X de cristal individual de Sp-4 (Forma 1)**

15

La Figura 10 muestra una estructura cristalina de rayos X para la Forma 1 de Sp-4. Allí, la figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 1 a partir de la estructura cristalina mostrando el esquema de numeración empleado. Los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópico para los átomos que no son hidrógeno se muestran con un nivel de probabilidad del 50 %. Los átomos de hidrógeno se presentan con un radio arbitrariamente pequeño.

20

La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinamiento por mínimos cuadrados de matriz completa sobre F^2 con ponderación de $w^1 = \sigma^2(F_o^2) + (0,0592P)^2 + (0,6950P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementado en el algoritmo de escalado SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0,0871$ para todos los datos, R_1 convencional = 0,0329 en los valores de F de 7090 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, S = 1,016 para todos los datos y 870 parámetros. $\Delta/\sigma(\max)$ final 0,001, $\Delta/\sigma(\text{media})$, 0,000. Mapa de diferencia final entre +0,534 y -0,36 e \AA^{-3} .

25

Tabla 7. Parámetros del cristal individual de la Forma 1

Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Peso molecular	529,45				
Sistema cristalino	Monoclínico				
Grupo espacial	P2 ₁	a	20,0898(5) Å,	α	90°,
		b	6,10290(10) Å,	β	112,290(3)°,
		c	23,0138(6) Å,	γ	90°
V	2610,79(10) Å ³				
Z	4				
D _c	1,347 g.cm ⁻¹				
μ	1,475 mm ⁻¹				
Fuente, λ	Kα Cu, 1,54178 Å				
F(000)	1112				
T	100(1) K				
Cristal	Placa incolora, 0,12 x 0,09 x 0,03 mm				
Datos truncados a	0,80 Å				
θ _{max}	74,48°				
Integridad	99,4 %				
Reflexiones	14854				
Reflexiones únicas	7513				
R _{int}	0,0217				

Referencia**5 Ejemplo 22-2. Cristalografía de rayos X de cristal individual de Sp-4 (Forma 2)**

La Figura 11 muestra una estructura cristalina de rayos X para la Forma 2 de Sp-4. Allí, la figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 2 a partir de la estructura cristalina mostrando el esquema de numeración empleado. Los heteroátomos se resolvieron isotrópicamente debido a datos muy débiles. Los átomos de hidrógeno no se representan.

La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinamiento por mínimos cuadrados de matriz completa sobre F² con ponderación de $w^1 = \sigma^2(F_o^2) + (0,0975P)^2 + (10,6969P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementado en el algoritmo de escalado SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum[w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,1883$ para todos los datos, R₁ convencional = 0,0741 en los valores de F de 2525 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, S = 1,05 para todos los datos y 158 parámetros. Δσ(max) final 0,000, Δσ(media), 0,000. Mapa de diferencia final entre + 1,388 y -0,967 e Å⁻³.

Tabla 8. Parámetros del cristal individual de la Forma 2

Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ FN ₃ O ⁹ P				
Peso molecular	614,38				
Sistema cristalino	Monoclínico				
Grupo espacial	P2 ₁	a	12,8315(3) Å,	α	90°,
		b	6,14530(10) Å,	β	91,752(2)°,
		c	17,6250(4) Å,	γ	90°
V	1389,14(5) Å ³				
Z	2				
D _c	1,469 g.cm ⁻¹				

μ	3,196 mm ⁻¹
Fuente, λ	Cu-K, 1,54178 Å
$F(000)$	640
T	293(2) K
Datos truncados a	0,80 Å
θ_{\max}	62,23°
Integridad	91,1 %
Reflexiones	3528
Reflexiones únicas	2562
R_{int}	0,0227

Referencia

Ejemplo 22-3. Cristalografía de rayos X de cristal individual de Sp-4 (Forma 2)

5 La Figura 12 representan la estructura cristalina de rayos X (ORTEP -anisotrópica) de Sp-4 (Forma 2). Una estructura cristalina del solvato del cloruro de metileno de Sp-4 (Forma 2), C₂₃H₃₁N₃PO₉FCl₂, produce un grupo espacial monoclinico $P2_1$ (ausencias sistemáticas 0k0: k= impar) con a = 12,8822(14) Å, b = 6,1690(7) Å, c = 17,733(2) Å, β = 92,045(3)°, V = 1408,4(3) Å³, Z = 2 y $d_{\text{calc}} = 1,449$ g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron con un detector de área Rigaku Mercury CCD empleando radiación Mo-K α monocromada con grafito ($\lambda = 0,71073$ Å) a una temperatura de 143 K. El indexado preliminar se llevó a cabo partir de una serie de 12 imágenes de rotación de 0,5° con exposiciones de 30 segundos. Se recogieron un total de 648 imágenes de rotación con una distancia del cristal con respecto al detector de 35 mm, un ángulo de giro 2 θ de -12°, anchuras de rotación de 0,5° y exposiciones de 30 segundos: el barrido n° 1 fue un barrido de φ de 315° a 525° en $\omega = 10^\circ$ y $\chi = 20^\circ$; el barrido n° 2 fue un barrido de ω de -20° a 5° en $\chi = -90^\circ$ y $\varphi = 315^\circ$; el barrido n° 3 fue un barrido de ω de -20° a 4° en $\chi = -90^\circ$ y $\varphi = 135^\circ$; el barrido n° 4 fue un barrido de ω de -20° a 5° en $\chi = -90^\circ$ y $\varphi = 225^\circ$; el barrido n° 5 fue un barrido de ω de -20° a 20° en $\chi = -90^\circ$ y $\varphi = 45^\circ$. Las imágenes de rotación se procesaron usando CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), para producir un listado de valores sin promediar de F^2 y $\sigma(F^2)$ que a continuación se pasaron por el paquete de programa CrystalStructure (CrystalStructure: Paquete de Análisis de Estructura Cristalina, Rigaku Corp. Rigalcu/MSC (2002)) para procesamiento adicional y solución de la estructura en un ordenador Dell Pentium III. Se midieron un total de 7707 reflexiones en los intervalos $5,48 \leq 2\theta \leq 50,04^\circ$, $-14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$ para producir 4253 reflexiones únicas ($R_{int} = 0,0180$). Los datos de intensidad se corrigieron para los efectos de Lorentz y polarización y para absorción usando REQAB (transmisión máxima y mínima 0,824, 1,000).

25 La estructura se resolvió mediante métodos directos (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). J. Appl. Cryst., 32, 115-119). El refinamiento fue mediante de mínimos cuadrados de matriz completa basado en F^2 usando SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64, 112-122). Se usaron todas las reflexiones durante el refinamiento. El esquema de ponderación usado fue $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + 0,0472P^2 + 0,4960P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los átomos que no son hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de "monta". El refinamiento convergió para $R_1 = 0,0328$ y $wR_2 = 0,0817$ para 4046 reflexiones para las que $F > 4\sigma(F)$ y $R_1 = 0,0348$, $wR_2 = 0,0838$ y GOF = 1,056 para todas las 4253 reflexiones únicas distintas de cero y 358 variables ($R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR_2 = \{ \sum w (F_o^2 + F_c^2)^2 / \sum w (F_o^2)^2 \}^{1/2}$; GOF = $\{ \sum w (F_o^2 + F_c^2)^2 / (n - p) \}^{1/2}$; donde n = número de reflexiones y p = número de parámetros refinados). El Δ/σ máximo en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0,000 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0,312 y -0,389 e/Å³. El parámetro de estructura absoluta Flack se refinó a -0,06(6) corroborando de ese modo la estereoquímica del compuesto del título.

40 La Tabla 1 enumera la información de celda, los parámetros de recogida de datos, y los datos de refinamiento. Los parámetros térmicos isotrópicos finales posicionales y equivalentes se dan en la Tabla 2. Los parámetros térmicos anisotrópicos están en la Tabla 3. ("ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Cristal Estructura Illustrations". C.K. Johnson (1976) ORNL-5138.) Representación de la molécula con elipsoides térmicos de probabilidad del 30 % presentados.

Tabla 9. Resumen de la determinación de la estructura del compuesto Sp-4-CH₂Cl₂

Fórmula:	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ PO ₉ FCl ₂
Eso fórmula:	614,38
Clase cristalina:	monoclinico
Grupo espacial:	$P2_1$, (#4)

Z	2
Constantes de celda:	
a	12,8822(14) Å
b	6,1690(7) Å
c	17,733(2) Å
β	92,045(3)°
V	1408,4(3) Å ³
μ	3,48 cm ⁻¹
Tamaño del cristal, mm	0,42 x 0,12 x 0,10
D _{calc}	1,449 g/cm ³
F(000)	640
Radiación:	Mo-K α ($\lambda = 0,71073$ Å)
Intervalo 2 θ	5,48 - 50,04°
hkl recogidos:	-14 \leq h \leq 15; -7 \leq k \leq 6; -19 \leq l \leq 21
Nº de reflexiones medidas:	7707
Nº de reflexiones únicas:	4253 ($R_{int} = 0,0180$)
Nº de reflexiones observadas	4046 ($F > 4\sigma$)
Nº de reflexiones usadas en refinamiento	4253
Nº de parámetros	358
Índices R ($F > 4\sigma$)	$R_1 = 0,0328$ $wR_2 = 0,0817$
Índices R (todos los datos)	$R_1 = 0,0348$ $wR_2 = 0,0838$
GOF:	1,056
Picos de diferencia final, e/ Å ³	+0,312, -0,389

Referencia

Ejemplo 22-4. Cristalografía de rayos X de cristal individual de S_{P-4} (Forma 3)

5 La Figura 13 muestra una estructura cristalina de rayos X para la Forma 3 de S_{P-4} . Allí, la figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 1 a partir de la estructura cristalina mostrando el esquema de numeración empleado. Los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópico para los átomos que no son hidrógeno se muestran con un nivel de probabilidad del 50 %. Los átomos de hidrógeno se presentan con un radio arbitrariamente pequeño.

10 La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinamiento por mínimos cuadrados de matriz completa sobre F^2 con ponderación de $w^1 = \sigma^2(F_o^2) + (0,0512P)^2 + (0,6810P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementado en el algoritmo de escalado SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,0796$ para todos los datos, R_1 convencional = 0,0294 en los valores de F de 2486 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,068$ para todos los datos y 377 parámetros. $\Delta/\sigma(\max)$ final 0,001, $\Delta/\sigma(\text{media})$, 0,000. Mapa de diferencia final entre +0,211 y -0,334 e Å⁻³.

Tabla 10. Parámetros del cristal individual de la Forma 3

Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₀ Cl ₃ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Peso molecular	648,82				
Sistema cristalino	Monoclínico				
Grupo espacial	P2 ₁	a	12,9257(4) Å,	α	90°,
		b	6,18080(10) Å,	β	96,399(2)°,
		c	18,0134(4) Å,	γ	90°
V	1430,15(6) Å ³				
Z	2				
D _c	1,507 g.cm ⁻¹				
μ	3,977 mm ⁻¹				
Fuente, λ	Kα Cu, 1,54178 Å				
F(000)	672				
T	100(1) K				
Cristal	Aguja incolora, 0,22 x 0,03 x 0,02 mm				
Datos truncados a	0,80 Å				
θ _{max}	74,41°				
Integridad	69,1 %				
Reflexiones	3062				
Reflexiones únicas	2607				
R _{int}	0,0198				

Referencia

5 Ejemplo 23. Estabilidad a temperaturas y humedad relativa elevadas

Una muestra de R_p-4 se almacenó en una cámara de humedad a 40 °C y 75 % de humedad relativa durante una semana, y la muestra se volvió a analizar por XRPD. El patrón de polvo obtenido para R_p-4 no mostró ningún cambio sustancial durante el curso del experimento, lo que significa que no se observó ningún cambio en la forma sólida. Esto estaría en contraste con una muestra de 4, que mostró delicuescencia en aproximadamente 16 horas tras almacenamiento a 40 °C y 75 % de humedad relativa. De hecho, una ilustración de la naturaleza delicuescente de 4 se ilustra mediante los siguientes. Una muestra de 4 se hizo pasar a través de un tamiz de 250 μm y a continuación las muestras se almacenaron a 40 °C / 75 % de HR y 25 °C / 53 % de humedad relativa y se tomaron observaciones visuales a intervalos regulares. Los resultados se dan en la Tabla 4.

15

Tabla 11. Estabilidad de 4 para evaluar la humedad relativa

Condiciones	t = 1,5 h	t = 4,5 h	t = 6,5 h	t = 8,5 h	t = 73 h
40 °C/ 75 % HR	Delicuescencia	-	-	-	-
25 °C/ 53 % HR	No delicuescencia	Sólido pegajoso	Delicuescencia parcial	Delicuescencia casi completa	Delicuescencia

20

Tras almacenamiento a 40 °C y 75 % de humedad relativa una muestra de S_p-4 mostró delicuescencia en el transcurso de 16 horas. Por ejemplo, se molió una muestra de S_p-4 con un mortero, y a continuación se hizo pasar sucesivamente a través de tamices de 500 y 250 μm para producir la muestra en forma de un polvo fino. Las muestras de este material se almacenaron a 40 °C y 75 % de humedad relativa y 25 °C y 53 % de HR y se tomaron observaciones visuales a intervalos regulares. Los resultados se dan en la **Tabla 5**.

Tabla 12. Estabilidad de Sp-4 para evaluar la humedad relativa

Condiciones	t = 1,5 h	t = 4,5 h	t = 104 h
40 °C/ 75 % RH	No deliquesencia	Deliquesencia	-
25 °C/ 53 % RH	No deliquesencia	No deliquesencia	No deliquesencia

El análisis de XRPD de la muestra después de almacenamiento a 25 °C y 53 % de HR durante 104 horas no mostró ningún cambio significativo en los difractogramas producidos lo que indica que no se produjo ningún cambio de forma.

5

Referencia

Ejemplo 24. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los datos se recogieron en un equipo Perkin-Elmer Spectrum One equipado con un accesorio muestreador universal de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Los datos se recogieron y se realizaron usando el software Spectrum v5.0.1.

El espectro IR obtenido para **4**, **R_P-4**, y **S_P-4** se muestra en las Figuras 5-7, respectivamente. Los picos seleccionados, en números de onda (cm⁻¹) se enumeran a continuación:

15

4: ~1680, ~1454, ~1376, ~1205, ~1092, ~1023 (Figura 14);

R_P-4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (Figura 15);

y

S_P-4 (Forma 1): ~1743, ~1713, ~1688, ~1454, ~1378, ~1208, ~1082 (Figura 16).

20

Ejemplo 25. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) análisis termogravimétrico (TGA)

Los datos de DSC se recogieron en un equipo TA Instruments Q2000 equipado con un automuestreador de 50 posiciones. La calibración para la capacidad térmica se llevó a cabo usando zafiro y la calibración para energía y temperatura se llevó a cabo usando indio certificado.

25

La DSC de temperatura modulada se llevó a cabo por lo general con 0,8-1,2 mg de cada muestra, en un portamuestras de aluminio perforado, usando una velocidad de calentamiento subyacente de 2 °C.min⁻¹ y parámetros de modulación de temperatura de ± 0,2 °C.min⁻¹ y 40 segundos. Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 50 ml.min⁻¹ sobre la muestra.

30

El software de control del instrumento fue Advantage para Q Series v2.8.0.392 y Thermal Advantage v4.8.3 y los datos se analizaron usando Universal Analysis v4.3A.

Los datos de DSC se recogieron en un equipo Mettler DSC 823e equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para energía y temperatura usando indio certificado. Por lo general, 0,8-1,2 mg de cada muestra, en un portamuestras de aluminio perforado, se calentaron a 10 °C.min⁻¹ desde 25 °C a 250 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml.min⁻¹ sobre la muestra. El software de control de instrumento y de análisis de datos fue STARe v9.20.

35

Los datos de DSC para **S_P-4 (Forma 6)** se recogieron usando un instrumento de DSC (TA Q2000), usando una velocidad de calentamiento de 10 °C/ min en condiciones de flujo continuo de gas nitrógeno seco (100 ml/min). Se pesaron exactamente aproximadamente 2,2 mg de muestra y se calentaron en un portamuestras no sellado herméticamente 'Tzero' con una tapa de ajuste holgado. El instrumento se calibró (entalpía y temperatura) con un patrón de indio y (capacidad calorífica) con un patrón de zafiro. Se estimó que las incertidumbres eran ± 0,1 °C para las temperaturas y ± 5 % para las entalpías medidas. Se empleó el software TA Universal Analysis para medir las temperaturas de inicio.

40

Los datos de TGA se recogieron en un equipo Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento tenía la temperatura calibrada usando indio certificado. Por lo general, se cargaron 8-12 mg de cada muestra en un crisol de aluminio pesado previamente y se calentaron a 10 °C.min⁻¹ desde la temperatura ambiente a 350 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml.min⁻¹ sobre la muestra. El software de control del instrumento y de análisis de datos fue STARe v9.20.

45

El análisis de DSC de **4** mostró una endoterma amplia individual con un comienzo en 58,7 °C (ΔH 14 J.g⁻¹) que se confirmó que era debida a la relajación molecular durante la transición vítrea mediante análisis adicional de DSC modulada (Figura 17). El análisis de TGA de **4** no mostró ninguna pérdida de peso antes de la descomposición a aproximadamente 240 °C, confirmando que el material no estaba solvatado. Dado que el análisis de XRPD de **4** confirmó que el material era amorfo, el análisis de DSC modulada se llevó a cabo en un intento de calcular la temperatura de transición vítrea, que se descubrió que era 57 °C.

50

El análisis de DSC mostró una endoterma definida individual con un comienzo en 136,2 °C (ΔH 76 J.g⁻¹) que confirmó que era una fusión mediante microscopía de etapa caliente. Véase la Figura 18. El análisis de TGA de *R_P-4* no mostró ninguna pérdida de peso antes de la descomposición a aproximadamente 240 °C, confirmando que el material no estaba solvatado.

El análisis de DSC de *S_P-4* mostró una endoterma amplia individual con un comienzo en 93,9 °C (ΔH 43 J.g⁻¹) que confirmó que era una fusión mediante microscopía de etapa caliente. Véase la Figura 19. El análisis de TGA de *S_P-4* no mostró ninguna pérdida de peso antes de la descomposición aproximadamente 240 °C, confirmando que el material no estaba solvatado.

El análisis de DSC de *S_P-4* (Forma 6) mostró una endoterma amplia con un comienzo en 120,7 °C (ΔH 79 J.g⁻¹).

Referencia

Ejemplo 26. Adsorción gravimétrica de vapor (GVS)

SMS GVS Intrinsic

Las isotermas de adsorción se obtuvieron usando un analizador de adsorción de humedad SMS DVS Intrinsic, controlado por el software SMS Analysis Suite. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25 °C mediante los controles del instrumento. La humedad controló mediante mezcla de corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un caudal total de 200 ml.min⁻¹. La humedad relativa se midió mediante una sonda calibrada Rotronic (intervalo dinámico de 1,0-100 % de HR), localizada cerca de la muestra. Se monitorizó de forma constante el cambio de peso (relajación de masa) de la muestra en función del % de HR mediante una microbalanza (precisión \pm 0,005 mg).

Por lo general, se colocaron 5-20 mg de muestra en una cesta de acero inoxidable de malla tarada en condiciones ambientales. La muestra se cargó y se descargó con un 40 % de HR y 25 °C (condiciones ambientales habituales). Se llevó a cabo una isoterma de adsorción de humedad como se indica posteriormente (2 barridos que dan 1 ciclo completo). La isoterma estándar se llevó a cabo a 25 °C con intervalos de 10 % de HR en un intervalo de 0,5-90 % de HR.

Tabla 13. Parámetros de método para experimentos de SMS DVS Intrinsic

Parámetros	Valores
Adsorción - barrido 1	40 - 90
Desorción / adsorción - barrido 2	90 - 0, 0 - 40
Intervalos (% HR)	10
Número de barridos	2
Caudal (ml.min ⁻¹)	200
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C.min ⁻¹)	0,2
Tiempo de adsorción (horas)	Tiempo de espera de 6 horas

La muestra se recuperó después de finalizar la isoterma y se volvió a analizar por XRPD.

El análisis de GVS mostró que *R_P-4* no era higroscópico exhibiendo una captación reversible de aproximadamente un 0,2 % en peso de agua de 0 a un 90 % de humedad relativa. El nuevo análisis de la muestra por XRPD después del experimento de GVS no mostró ningún cambio en la forma.

Una muestra de *S_P-4* se molió con un mortero, y a continuación se hizo pasar sucesivamente a través de tamices de 500 y 250 μ m para producir la muestra en forma de un polvo fino que se analizó a continuación usando un método del ciclo individual modificado. La muestra se tomó desde un 40 % de HR (aproximadamente ambiente) hasta un 60 % de HR, en lugar del 90 % para el método convencional, y a continuación se realizó el ciclo hasta un 0 % y de nuevo hasta un 40 % de HR. Este análisis mostró que *S_P-4* no era higroscópico hasta un 60 % de HR, con una captación reversible de \sim 0,2 % en peso de agua de 0 a un 60 % de HR.

Referencia

Ejemplo 27. Solubilidad acuosa termodinámica

La solubilidad acuosa se determinó por suspensión de una cantidad suficiente de compuesto en agua para dar una concentración final máxima $\geq 10 \text{ mg.ml}^{-1}$ de la forma libre precursora de compuesto. La suspensión se equilibró a 25 °C durante 24 horas y a continuación se midió el pH. A continuación, la suspensión se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio C en una placa de 96 pocillos. El filtrado se diluyó a continuación en un factor de 101. La cuantificación fue mediante HPLC por referencia a una solución patrón de aproximadamente $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ en DMSO. Se inyectaron diferentes volúmenes del patrón, y de las soluciones de muestra diluidas y sin diluir. La solubilidad se calculó usando las áreas de pico determinadas por integración del pico encontrado en el mismo tiempo de retención que el pico principal en la inyección de patrón.

10

Tabla 14. Parámetros el método de HPLC para medidas de solubilidad

Tipo de método:	Fase inversa con gradiente de elución		
Columna:	fenomenex Luna, C18 (2) 5 μm 50 x 4,6 mm		
Temperatura de columna (°C):	25		
Inyecciones de patrón (μl):	1, 2, 3, 5, 7, 10		
Inyecciones de ensayo (μl):	1, 2, 3, 10, 20, 50		
Detección: longitud de onda, ancho de banda (nm) :	260,80		
Caudal (ml.min^{-1}):	2		
Fase A:	0,1 % de TFA en agua		
Fase B:	0,085 % de TFA en acetonitrilo		
Programa:	Tiempo (min)	% de fase A	% de fase B
	0,0	95	5
	1,0	80	20
	2,3	5	95
	3,3	5	95
	3,5	95	5
	4,4	95	5

El análisis se llevó a cabo en las condiciones indicadas anteriormente en un sistema de la serie Agilent HP1100 equipado con un detector de conjunto de diodos y usando software ChemStation vB.02.01-SR1.

15

Tabla 15. Resultado de solubilidad acuosa para R_{P-4} , 4, y S_{P-4} .

ID de muestra	pH de la mezcla sin filtrar	Solubilidad/ mg.ml^{-1}	Comentarios
R_{P-4}	7,12	1,58	Suspensión
4	7,03	6,11	Sólido residual
S_{P-4}	6,88	5,65	Sólido residual

Referencia

20

Ejemplo 28. Determinación de la pureza química por HPLC

Se pueden usar diversas condiciones de HPLC para determinar la pureza química de los compuestos que se desvelan en el presente documento. Uno de tales ejemplos se ha desvelado anteriormente con respecto a los estudios de solubilidad acuosa termodinámica. Otro ejemplo se desvela a continuación.

25

Condiciones de HPLC:

LC: Módulo de separación Waters Alliance 2695, detector Waters 2996 PDA detector y software Empower 2 (versión 6.00)

Columna: fenomenex Luna C18(2); 4,6 x 50 mm; 3 μm

Caudal: 1,2 ml/min

Volumen de inyección:	10 µl	
Fase móvil:	Disolvente A: 95 % de agua con un 5 % metanol y 10 mM Acetato de amonio;	
	pH~5,3	
	Disolvente B: MeOH con acetato de amonio 10 mM	
Gradiente:	Mantener en un 0 % de B	3 min
	0-47 % de B	3-4 min
	Mantener en un 47 % de B	4-10 min
	47 %-74 % de B	10-11 min
	Mantener en un 74 % de B	11-13,5 min
	Volver a un 0 % de B	13,5-13,6 min
	Mantener en un 0 % de B	13,6-15,5 min

En estas condiciones, se determinó que la pureza de **4**, *R_P-4*, y *S_P-4* era de ~99,6, ~99 %, y ~99,5 %, respectivamente. Se ha de observar que se pueden conseguir purezas mayores por optimización de los métodos desvelados anteriormente.

5 La inspección de los difractogramas de XRPD muestra que los dos diastereómeros individuales cristalinos proporcionaron patrones que XRPD claramente diferentes. Además, hubo una clara diferencia en el punto de fusión de los dos diastereómeros cristalinos, teniendo *R_P-4* un comienzo considerablemente mayor que *S_P-4* (136 °C frente a 94 °C).

10 **Referencia**

Ejemplo 29. Métodos de separación adicionales

15 La siguiente separación por SFC (condiciones enumeradas a continuación) produjo una separación adecuada de una mezcla de diastereómeros, *R_P-4* y *S_P-4*.

Método preparativo:	Método analítico:
Chiralpak AS-H (2 x 25 cm) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25 x 0,46 cm)
20 % de metanol/CO ₂ (100 bar)	20 % de metanol/CO ₂ (100 bar)
50 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
Conc.: 260 mg/30 ml de metanol, vol. iny.: 1,5 ml	

20 La siguiente separación por SFC (condiciones enumeradas a continuación) produjo una separación adecuada de una mezcla de diastereómeros, *R_P-4* y *S_P-4*.

Método preparativo:	Método analítico:
Chiralpak IA (2 x 15 cm) 802091	Chiralpak IA (15 x 0,46 cm)
30 % de isopropanol (0,1 % de DEA)/CO ₂ , 100 bar	40 % de metanol (DEA)/CO ₂ , 100 bar
60 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
vol. iny.: 2 ml, 20 mg/ml de metanol	

Tabla 16. Resumen de resultados para la caracterización de lotes de *R_P-4*, *4*, y *S_P-4*

Análisis	<i>R_P-4</i>	<i>4</i>	<i>S_P-4</i>
RMN de protón	Diastereómero individual	Mezcla de diastereómeros 1:1	Diastereómero individual
XRPD	Cristalino - diferente de <i>S_P-4</i>	Amorfo	Cristalino - diferente de <i>R_P-4</i>
DSC	Endoterma; fusión - 136 °C	Endoterma; 59 °C	Endoterma; fusión - 94 °C
TGA	Sin pérdida de peso, descomposición >240 °C	Sin pérdida de peso, descomposición >240 °C	Sin pérdida de peso, descomposición >240 °C
IR	Véase anteriormente	Véase anteriormente	Véase anteriormente
Solubilidad ac. (mg.ml ⁻¹)	1,58	6,11	5,65
Pureza por HPLC	96,9 %	99,6 %	99,5 %
40 °C / 75 % HR	Sin cambio de forma	Delicuescencia en 1,5 h	Delicuescencia en 4,5 h
25 °C / 53 % HR	-	Delicuescencia	Sin cambio de forma
GVS	No higroscópico hasta un 90 % de HR	-	No higroscópico hasta un 60 % de HR

Referencia

5 Ejemplo 30. Cristalografía de rayos X de 8 (isómero *S_P*)

El Compuesto 8 (isómero *S_P*), C₁₈H₂₁N₂PO₇, cristaliza en el grupo espacial monoclinico *P*2₁ (ausencias sistemáticas 0k0: k = impar) con a = 5,3312(4) Å, b = 15,3388(8) Å, c = 23,7807(13) Å, β = 92,891(3)°, V = 1942,2(2) Å³, Z = 4, y $\rho_{\text{calc}} = 1,397 \text{ g/cm}^3$. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron en un detector de área Bruker APEXII CCD empleando radiación Mo-K α monocromada con grafito ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) a una temperatura de 100(1) K. Las Figuras 20A y 20B muestran las moléculas numeradas 1 y 2, respectivamente, de la unidad asimétrica.

El indexado preliminar se llevó a cabo a partir de una serie de treinta y seis marcos de rotación de 0,5° con exposiciones de 30 segundos. Se recogieron un total de 3608 marcos con una distancia del cristal con respecto al detector de 70,00 mm, anchuras de rotación de 0,5° y exposiciones de 20 segundos:

Tipo de barrido	2θ	ω	φ	λ	marcos
φ	-35,50	279,40	27,32	48,96	725
φ	24,50	22,31	35,56	69,08	692
ω	-13,00	321,68	247,79	69,08	95
φ	34,50	204,08	28,21	-92,80	293
φ	-30,50	310,60	214,10	54,21	361
φ	32,00	304,67	24,47	50,72	722
φ	-35,50	122,14	316,59	-78,84	720

Los marcos de rotación se integraron usando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin USA.) para producir un listado de valores sin promediar de F^2 y $\sigma(F^2)$ que se pasaron a continuación al paquete de programa SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) para procesamiento adicional y solución de la estructura en un ordenador Dell Pentium 4. Se midieron un total de 6909 reflexiones en los intervalos $1,58 \leq \theta \leq 25,09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$ para producir 6909 reflexiones únicas ($R_{\text{int}} = 0,0581$). Los datos de intensidad se corrigieron para efectos de Lorenz y polarización y para absorción usando SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. Universidad de Gottingen, Alemania) (transmisión máxima y mínima 0,6093, 0,7452).

La estructura se resolvió mediante métodos directos (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64.112-122). El refinamiento fue mediante de mínimos cuadrados de matriz completa basado en F^2 usando SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64 112-122). Se usaron todas las reflexiones durante el refinamiento. El esquema de ponderación usado fue $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0000P)^2 + 14,0738P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los átomos que no son hidrógeno se refinaron

5 anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de monta. El refinamiento convergió para $R_1 = 0,0847$ y $wR_2 = 0,1899$ para 6173 reflexiones observadas para las que $F > 4\sigma(F)$ y $R_1 = 0,0963$, $wR_2 = 0,1963$ y $GOF = 1,119$ para todas las 6909 reflexiones únicas distintas de cero y 512 variables ($R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR_2 = [\sum w (F_o^2 + F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w (F_o^2 + F_c^2) / (n - p)]^{1/2}$; donde n = número de reflexiones y p = número de parámetros refinados). El Δ/σ máximo en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0,000 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0,402 y -0,559 e/Å³. Las Figuras 20A y 20B son ORTEP (elipsoides térmicos de probabilidad del 30 %) de las moléculas 1 y 2 de la unidad asimétrica.

Tabla 17. Resumen de la determinación de la estructura del compuesto 8 (isómero Sp)

Fórmula empírica	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ PO ₇
Peso fórmula	408,34
Temperatura	100(1) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Constantes de celda:	
a	5,3312(4) Å
b	15,3388(8) Å
c	23,7807(13) Å
β	92,891(3)°
Volumen	1942,2(2) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1,397 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,185 mm ⁻¹
F(000)	856
Tamaño del cristal	0,40 x 0,10 x 0,08 mm ³
Intervalo de Theta para recogida de datos	1,58 a 25,09°
Intervalos de índices	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
Reflexiones recogidas	6909
Reflexiones independientes	6909 [R(int) = 0,0581]
Integridad para theta = 25,09°	99,6 %
Corrección de absorción	Semi-empírica a partir de equivalentes
Transmisión max. y min.	0,7452 y 0,6093
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa sobre F ²
Datos / restricciones / parámetros	6909 / 1 / 512
Bondad de ajuste sobre F ²	1,119
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0847, wR ₂ = 0,1899
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0,0963, wR ₂ = 0,1963
Parámetro de estructura absoluta	0,1(2)
Mayor diferencia de pico y depresión	0,402 y -0,559 e. Å ⁻³

Referencia

Ejemplo 32. Cristalografía de rayos X de (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo

5 El (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo, C₁₈H₁₇NPO₅F₅, cristaliza en el grupo espacial triclinico P1 con a = 5,2641(6) Å, b = 12,0548(13) Å, c = 16,4307(15) Å, α = 74,960(4)°, β = 83,959(4)°, γ = 80,275(4)°, V = 990,40(18) Å³, Z = 2, y d_{calc} = 1,520 g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron en un detector de área Bruker APEXII CCD empleando radiación Mo-Kα monocromada con grafito (λ = 0,71073 Å) a una temperatura de 143(1) K. El indexado preliminar se llevó a cabo a partir de una serie de treinta y seis marcos de rotación de 0,5° con exposiciones de 20 segundos. Se recogieron un total de 3593 marcos con una distancia del cristal con respecto al detector de 37,600 mm, anchuras de rotación de 0,5° y exposiciones de 20 segundos:

Tipo de barrido	2θ	ω	φ	λ	marcos
φ	-15,50	258,48	-351,72	19,46	739
φ	-20,50	-17,45	-37,67	-73,06	725
ω	-10,50	-53,05	-87,93	99,72	80
φ	19,50	-32,21	-88,94	36,30	219
ω	-10,50	-14,33	80,80	-60,33	122
ω	17,00	-38,90	-41,64	83,36	116
ω	17,00	-37,89	-175,56	82,07	114
φ	19,50	59,55	-11,29	-26,26	739
φ	-10,50	318,39	-335,56	52,47	739

15 Los marcos de rotación se integraron usando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin USA.) para producir un listado de valores sin promediar de F² y σ(F²) que se pasaron a continuación al paquete de programa SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) para procesamiento adicional y solución de la estructura en un ordenador Dell Pentium 4. Se midieron un total de 17880 reflexiones en los intervalos 11,77 ≤ θ ≤ 25,12°, -6 ≤ h ≤ 6, -14 ≤ k ≤ 14, -19 ≤ l ≤ 19 para producir 6897 reflexiones únicas (R_{int} = 0,0212).

20 Los datos de intensidad se corrigieron para efectos de Lorenz y polarización y para absorción usando SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. Universidad de Gottingen, Alemania) (transmisión máxima y mínima 0,6887, 0,7452).

25 La estructura se resolvió mediante métodos directos (SHELXS-97(Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64.112-122). El refinamiento fue mediante de mínimos cuadrados de matriz completa basado en F² usando SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64.112-122). Se usaron todas las reflexiones durante el refinamiento. El esquema de ponderación usado fue w = 1/[σ²(F_o²) + (0,0344P)² + 0,1102P] donde P = (F_o² + 2F_c²)/3. Los átomos que no son hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de monta. El refinamiento convergió para R₁ = 0,0259 y wR₂ = 0,0609 para 6527 reflexiones observadas para las que F > 4σ(F) y R₁ = 0,0284, wR₂ = 0,0621 y GOF = 1,040 para todas las 6897 reflexiones únicas distintas de cero y 548 variables (R₁ = ∑ ||F_o - |F_c|| / ∑ |F_o|; wR₂ = [∑ w (F_o² + F_c²)² / ∑ w (F_o²)²]^{1/2}; GOF = [∑ w (F_o² + F_c²) / (n - p)]^{1/2}; donde n = número de reflexiones y p = número de parámetros refinados). El Δ/σ máximo en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0,001 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0,254 y -0,236 e/Å³. Las Figuras 22A y 22B son ORTEP (elipsoides térmicos de probabilidad del 30 %) de las moléculas 1 y 2 de la unidad asimétrica.

35

Tabla 18. Resumen de la determinación de la estructura de (S)-2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo

Fórmula empírica	C ₁₈ H ₁₇ NPO ₅ F ₅
Peso fórmula	453,30
Temperatura	143(1) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	triclinico
Grupo espacial	P1
Constantes de celda:	
a	5,2641(6) Å

b	12,0548(13) Å
c	16,4307(15) Å
α	74,960(4) ^o
β	83,959(4) ^o
γ	80,275(4) ^o
Volumen	990,40(18) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	1,520 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,216 mm ⁻¹
F(000)	464
Tamaño del cristal	0,45 x 0,05 x 0,04 mm ³
Intervalo de theta para la recogida de datos	1,77 a 25,12 ^o
Intervalos de índices	-6 ≤ h ≤ 6, -14 ≤ k ≤ 14, -19 ≤ l ≤ 19
Reflexiones recogidas	17880
Reflexiones independientes	6897 [R(int) = 0,0212]
Integridad para theta = 25,12 ^o	99,5 %
Corrección de absorción	Semi-empírica a partir de equivalentes
Transmisión max. y min.	0,7452 y 0,6887
Método de refinamientos	Mínimos cuadrados de matriz completa sobre F ²
Datos / restricciones / parámetros	6897/3/548
Bondad del ajuste sobre F ²	1,040
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0259, wR2 = 0,0609
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0284, wR2 = 0,0621
Parámetro de estructura absoluta	-0,01(5)
Mayor diferencia de pico y depresión	0,254 y -0,236 e.Å ⁻³

Ejemplo 33. Actividad biológica

5 Se sembraron células que contenían replicón a 3.000 células/pocillo (50 µl) en placas de 96 pocillos de color blanco/opacas, o a 1.500 células/pocillo (25 µl) en placas de 384 pocillos de color blanco/opacas. Se añadieron 50 µl de compuesto 2x en las placas de 96 pocillos o se añadieron 25 µl de compuesto 2x en la placa de 384 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ humidificada al 5 % durante 4 días. Después de la incubación, se añadió reactivo Bright-Glo (50 µl para la placa de 96 pocillos, o 25 µl para la placa de 384 pocillos) para medir el indicador de luciferasa de luciérnaga para la replicación del VHC. Se calculó el porcentaje de inhibición frente al control sin fármaco.

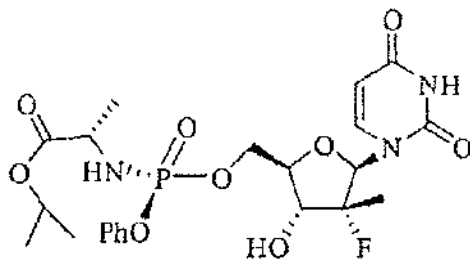
10

Compuesto	Actividad de replicón de VHC (µM)
4	0,58
<i>R_P-4</i>	2,87
<i>S_P-4</i>	0,13

R_P-4 y *S_P-4* han demostrado tener una amplia cobertura de genotipo. Por ejemplo, ambos han mostrado ser activos frente a los genotipos 1-4 del virus de la hepatitis C.

REIVINDICACIONES

1. (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino representado por la fórmula S_{P-4} :

 S_{P-4}

que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8, y 23,3.

2. (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino de la reivindicación 1 que tiene reflexiones 2θ ($^\circ$) de XRPD a aproximadamente: 6,08, 8,2, 10,38, 10,85, 12,17, 12,7, 13,73, 14,1, 15,91, 16,83, 17,17, 17,66, 17,95, 18,79, 19,1, 19,41, 19,8, 20,11, 20,82, 21,81, 22,03, 23,03, 23,26, 23,64, 23,89 y 24,73 con intensidades (%) de 66,7, 62,1, 29,8, 10,4, 12,0, 66,4, 14,9, 13,8, 3,1, 8,7, 19,7, 56,2, 37,7, 59,0, 14,3, 37,2, 46,0, 68,8, 100,0, 36,8, 7,4, 14,2, 21,6, 6,3, 7,0 y 3,3, respectivamente.

3. Una composición farmacéutica que comprende (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino de las reivindicaciones 1 o 2 y un medio farmacéuticamente aceptable.

4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además otro agente antiviral.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

7. (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso como medicamento.

8. (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C.

9. (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en combinación con otro agente antiviral.

10. (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC.

11. (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

12. Un medicamento que comprende (S)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino de las reivindicaciones 1 o 2.

13. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además otro agente antiviral.

14. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC.

5 15. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

16. Uso de un (S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino de las reivindicaciones 1 o 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C.

10 17. Uso de un (S)-2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo cristalino de las reivindicaciones 1 o 2 y otro agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C.

15 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el otro agente antiviral es un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC.

20 19. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el otro agente antiviral es un inhibidor de NS5A del VHC.

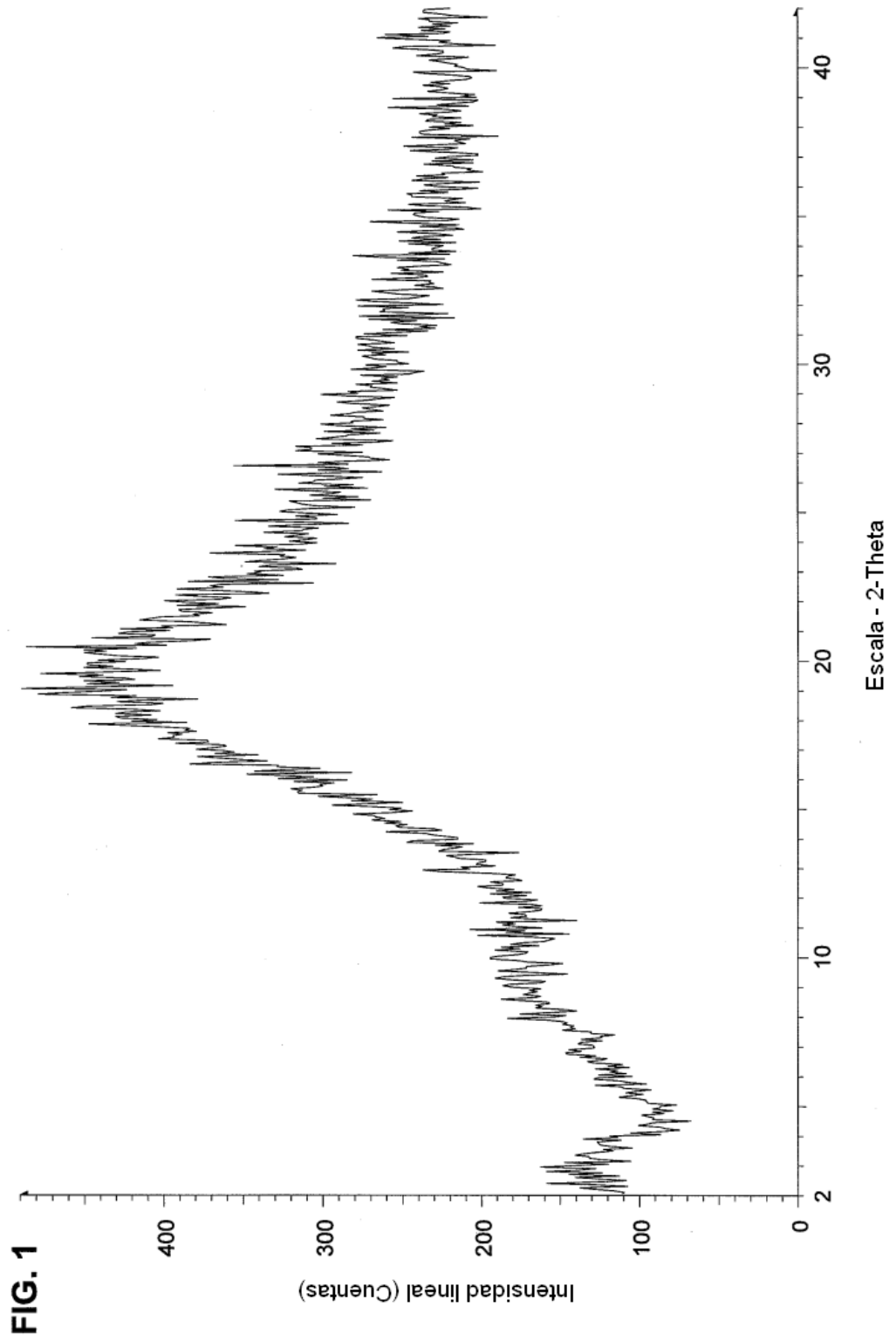
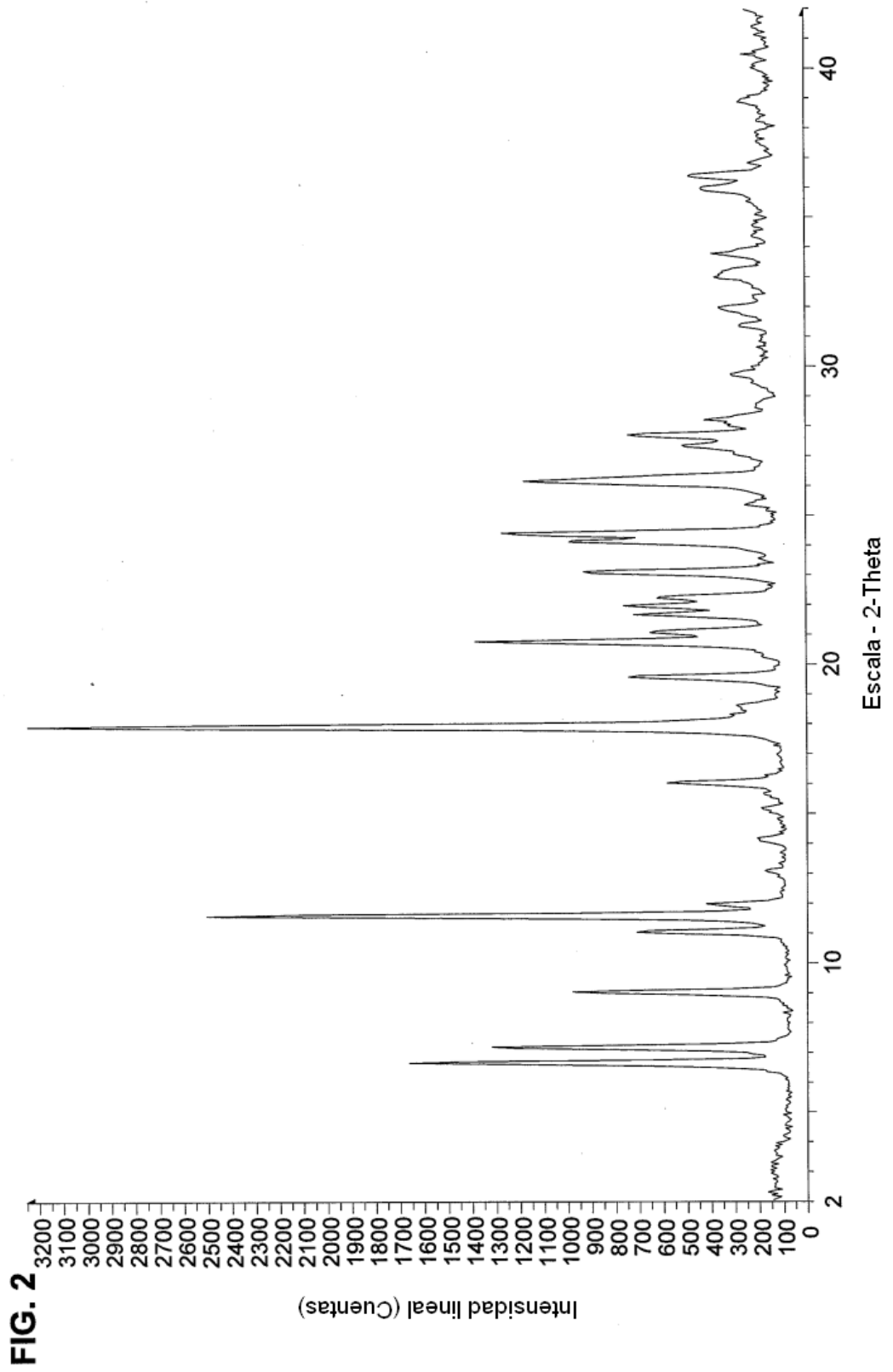
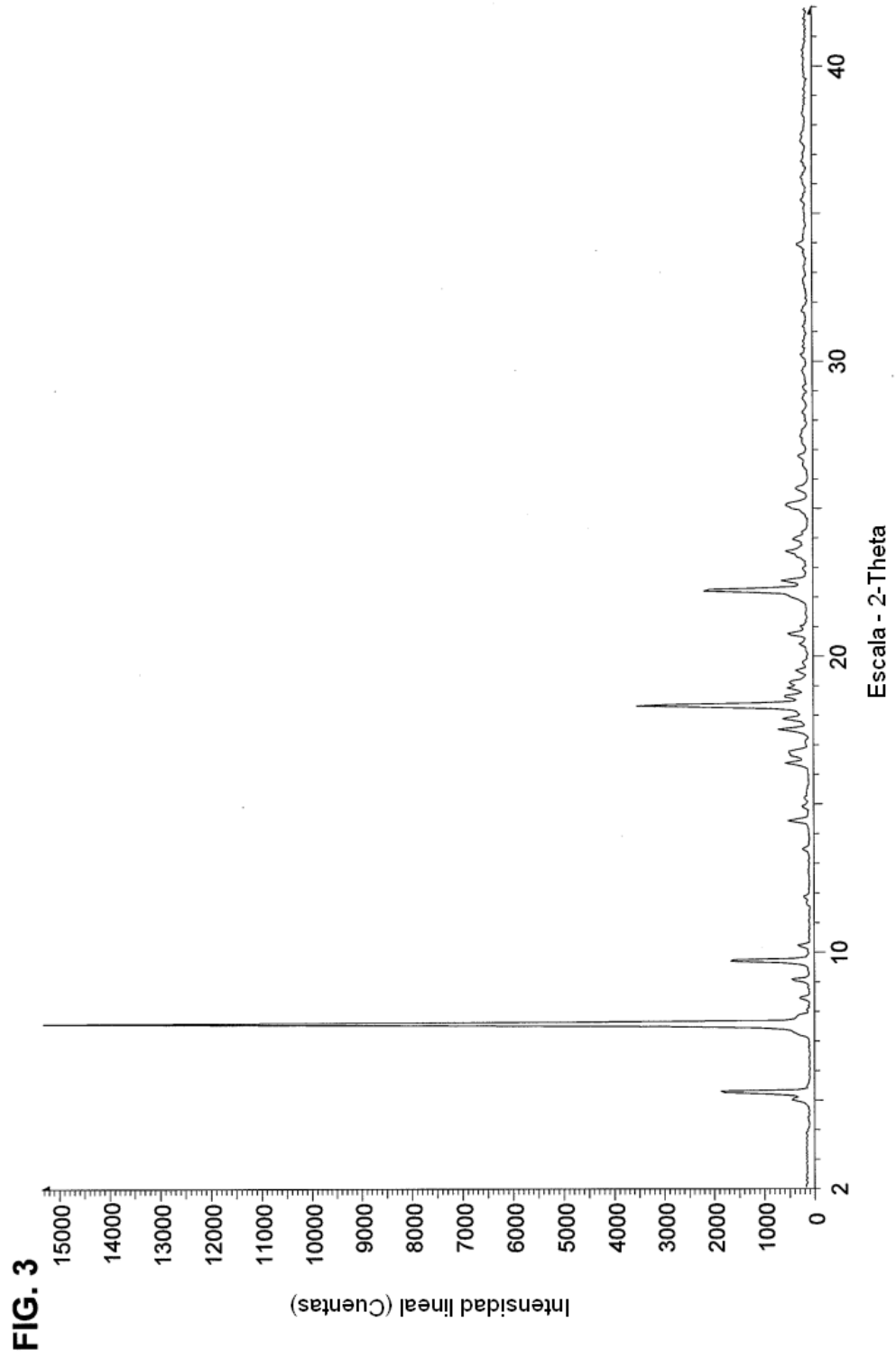
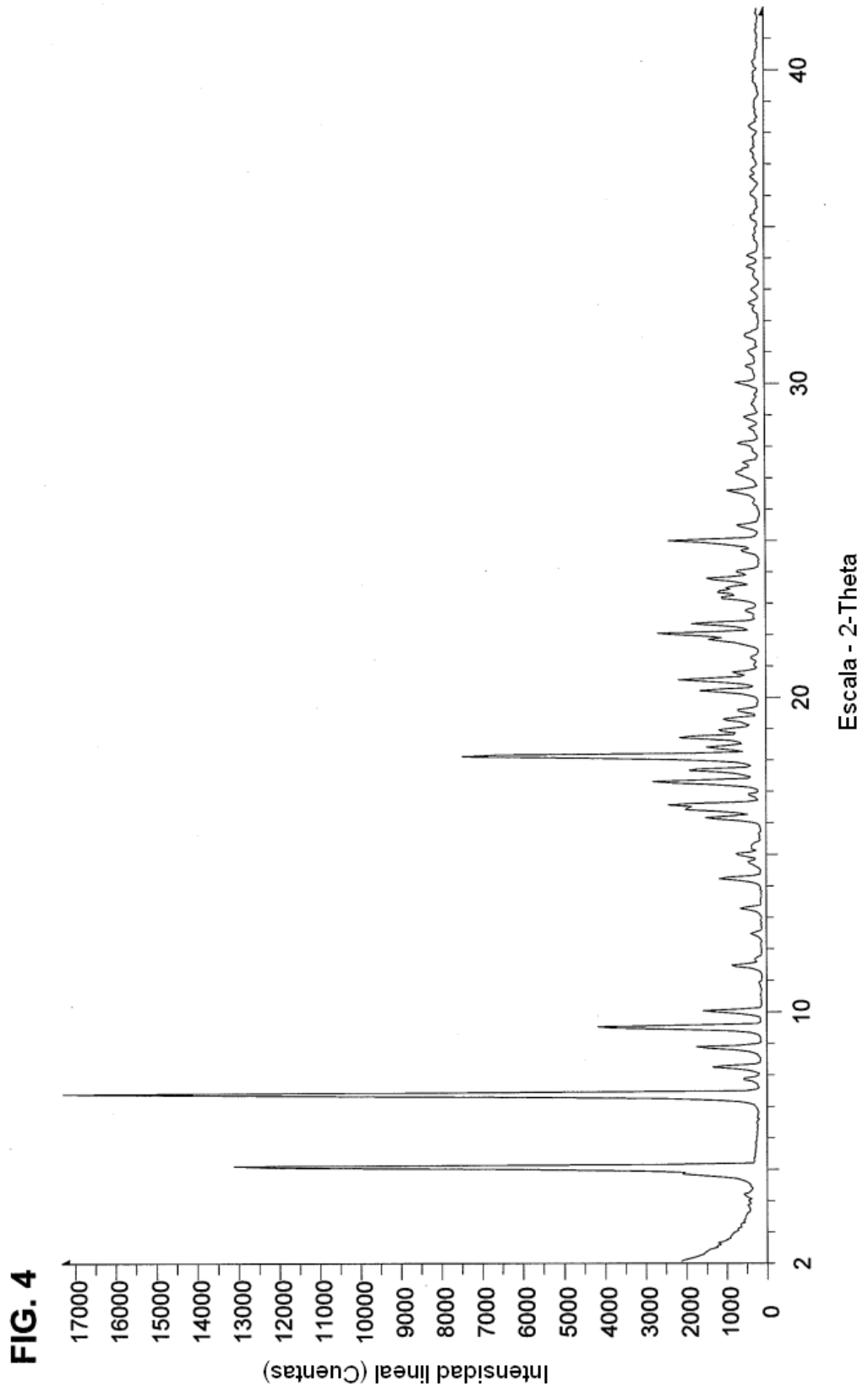
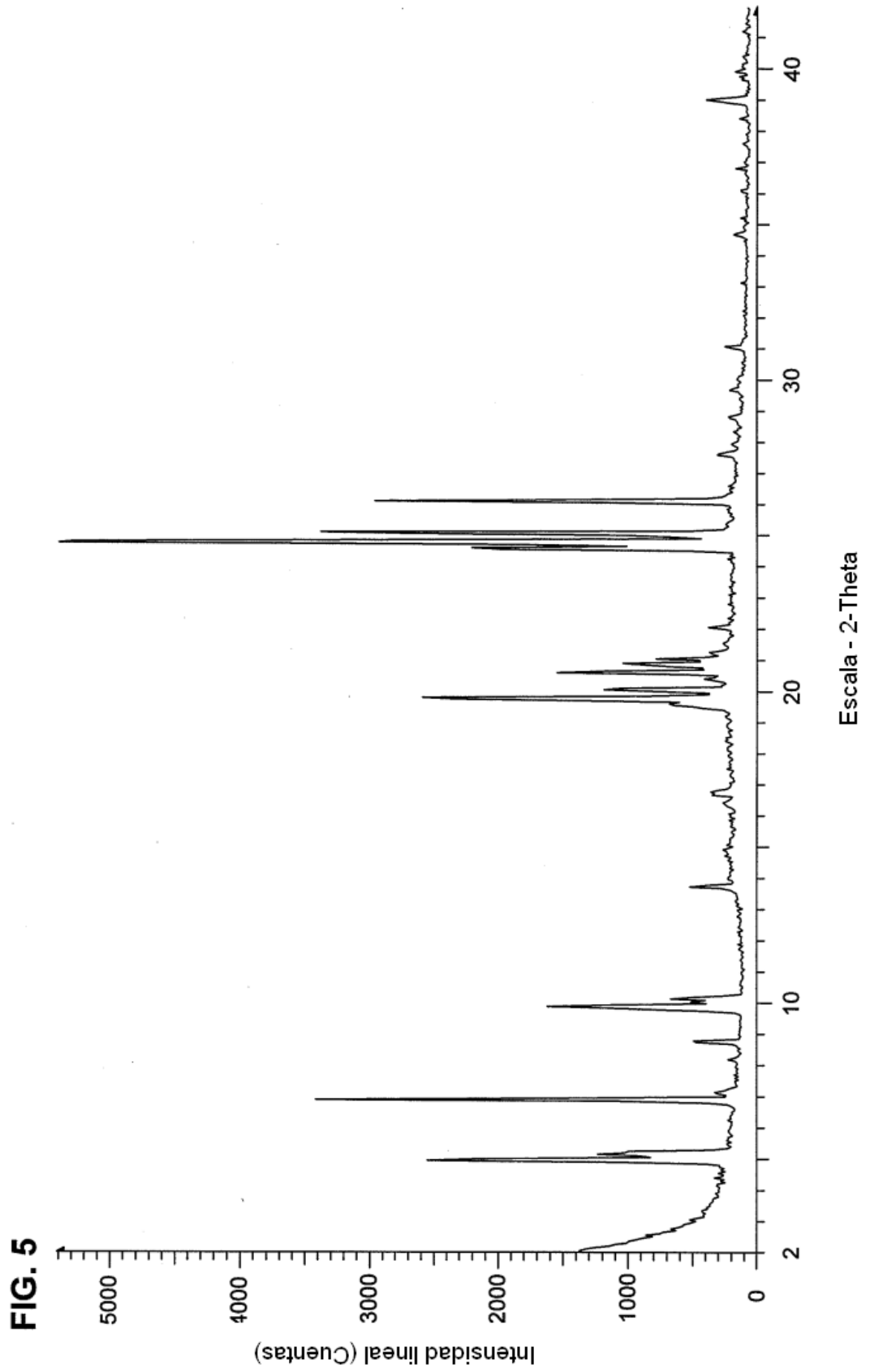


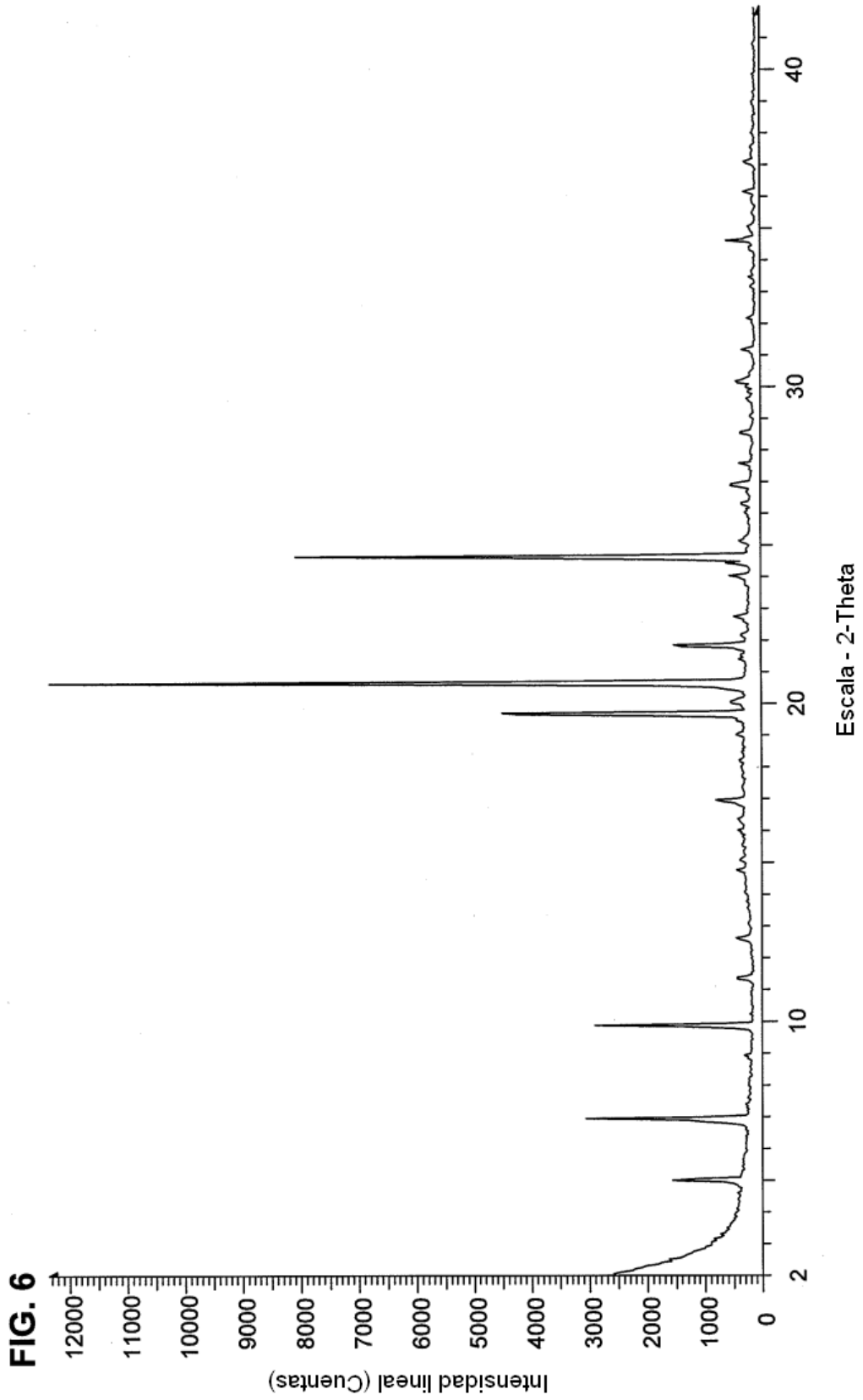
FIG. 1

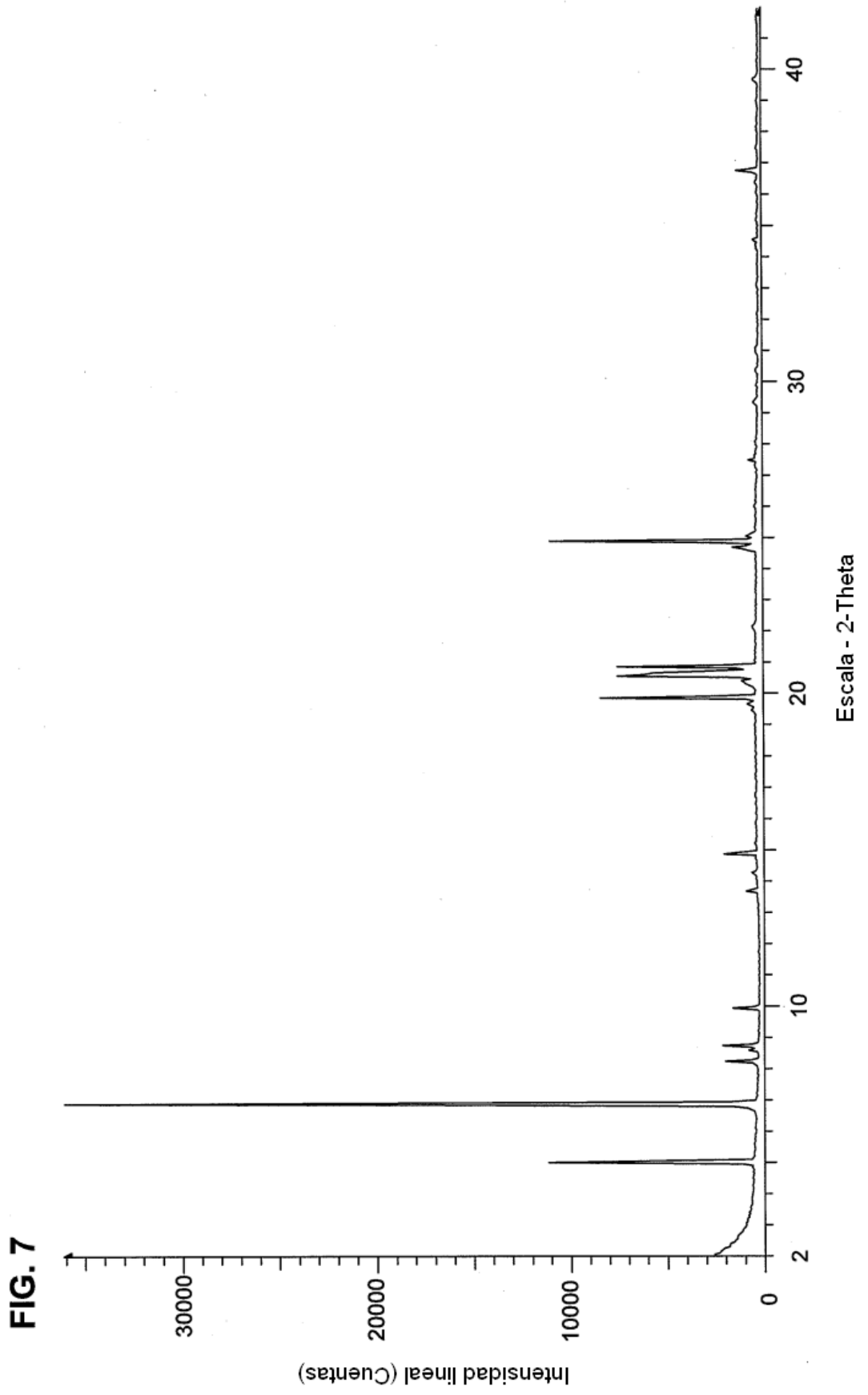












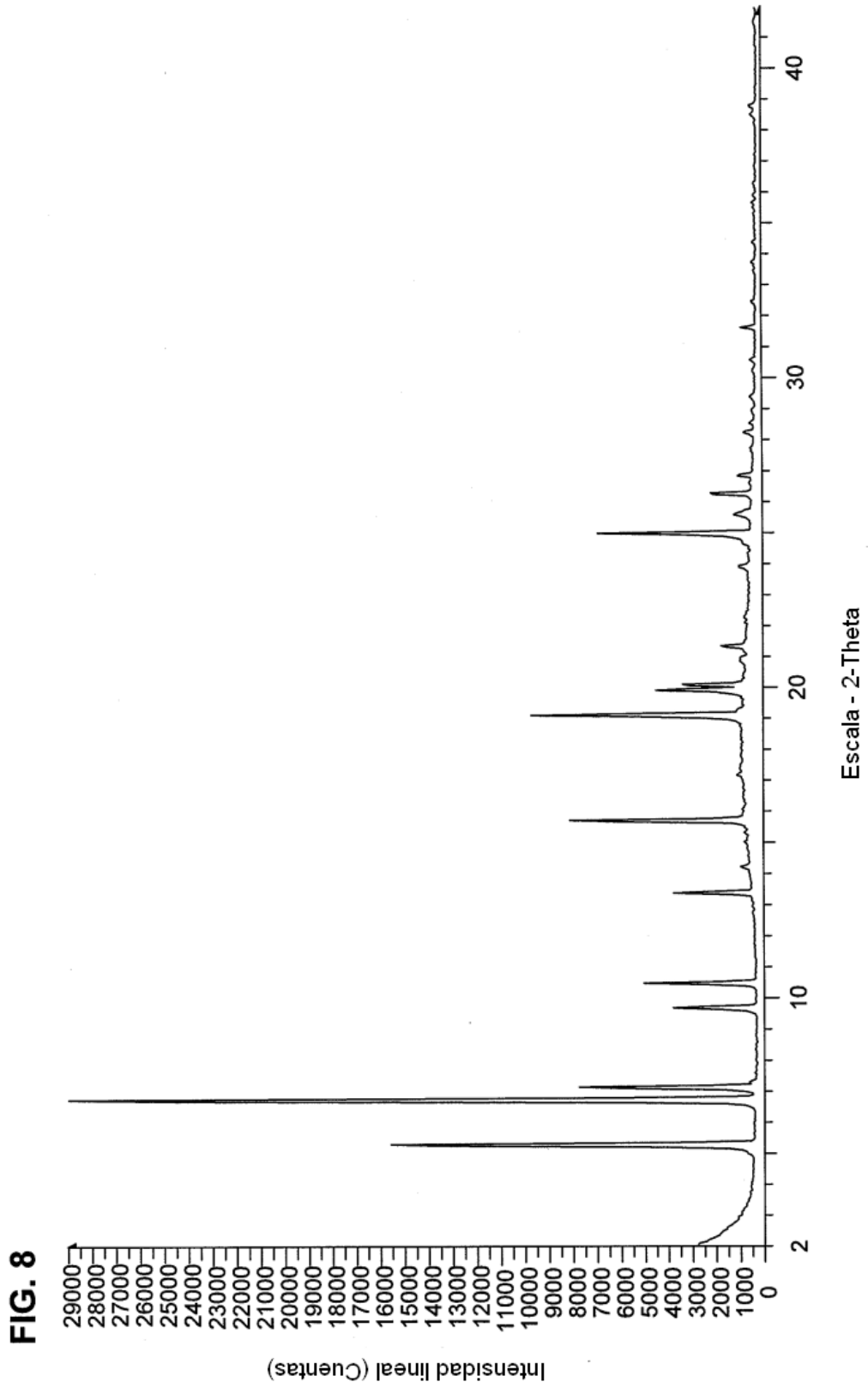
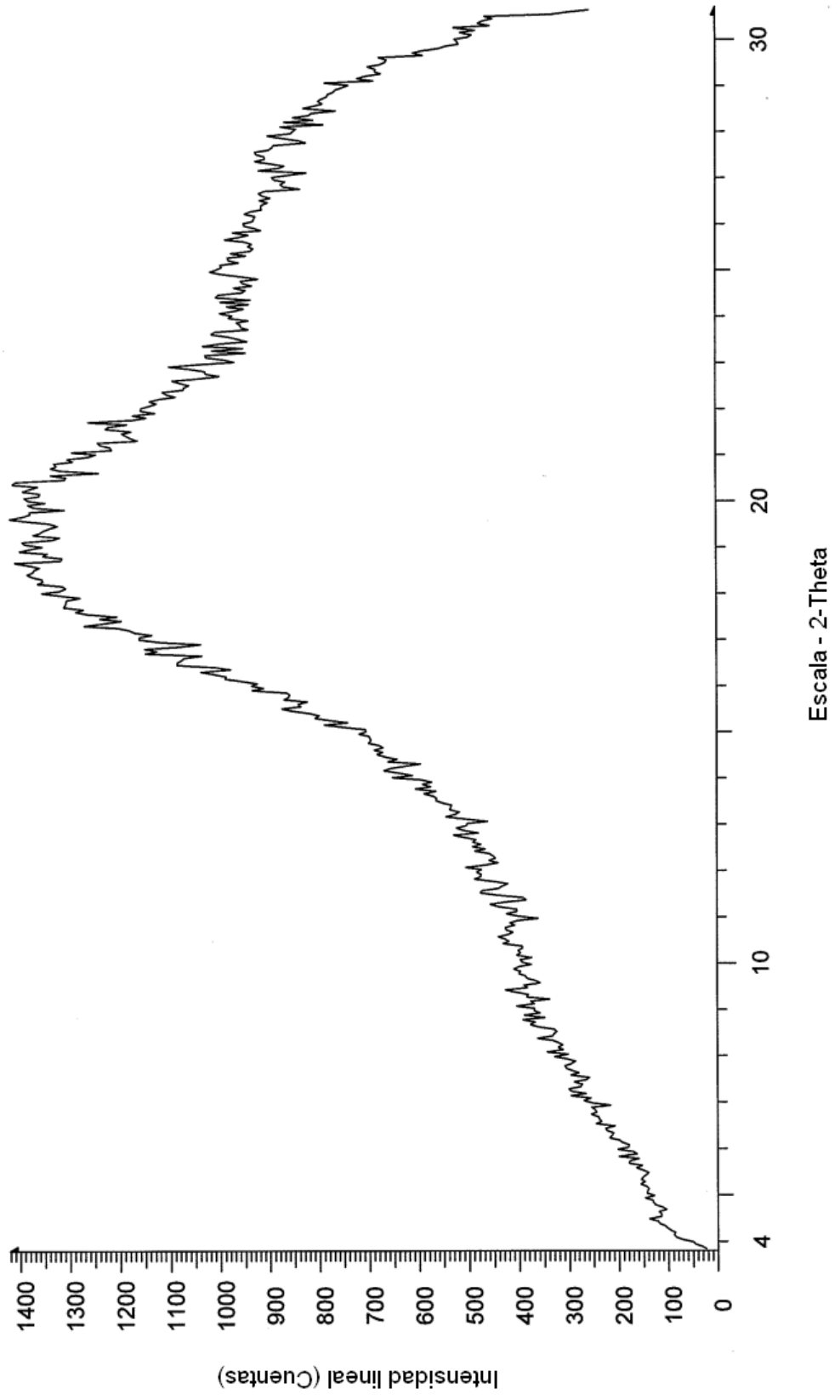


FIG. 9



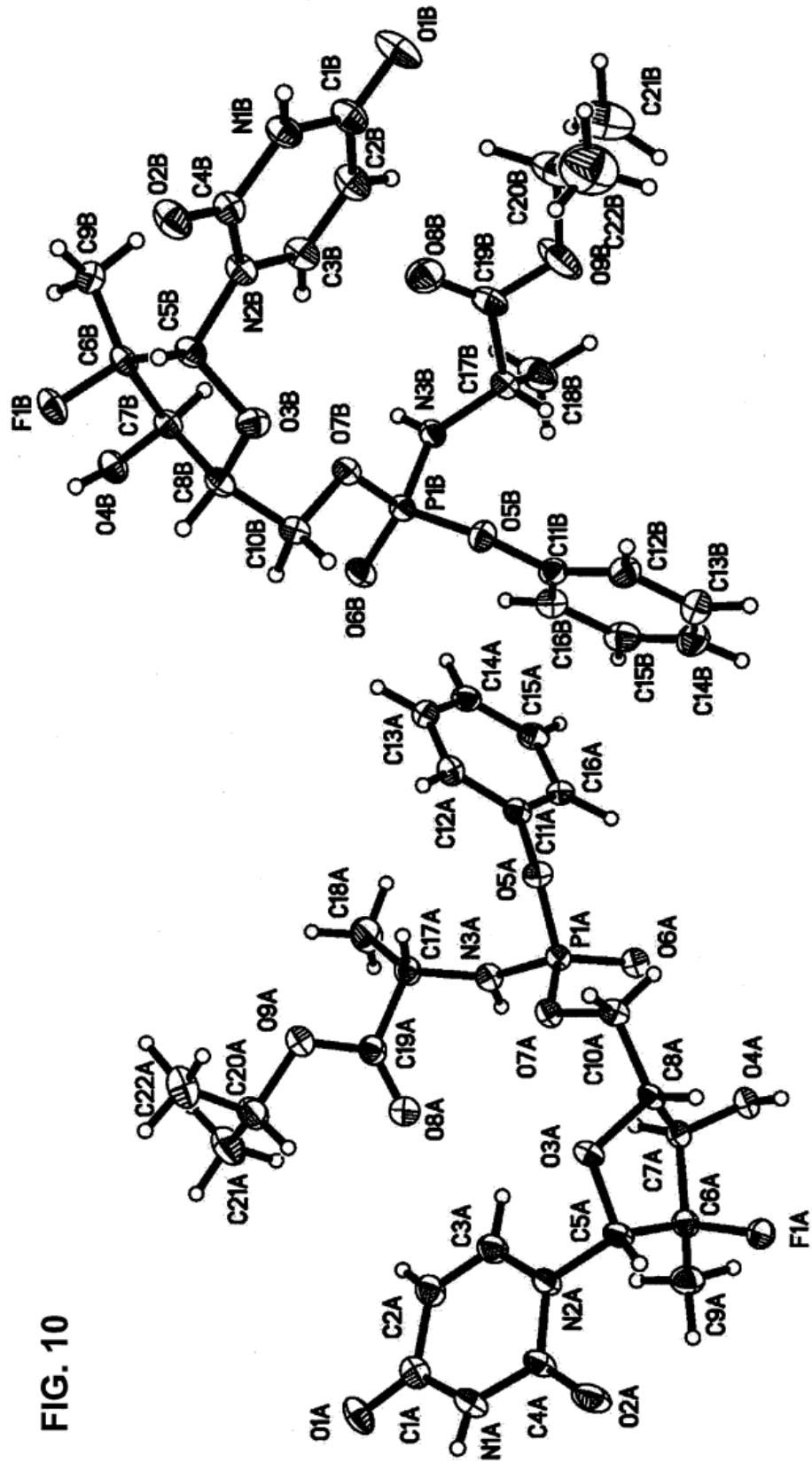
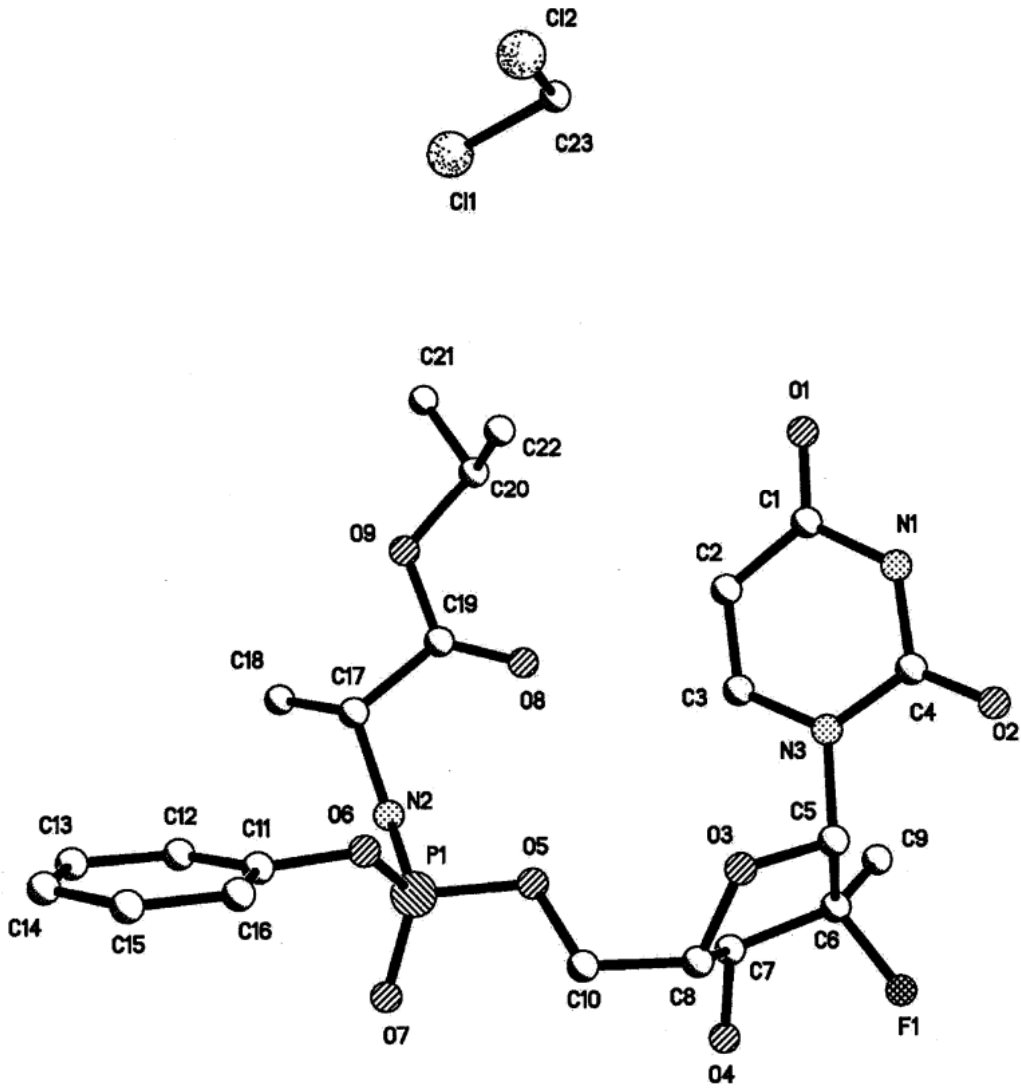


FIG. 10

FIG. 11



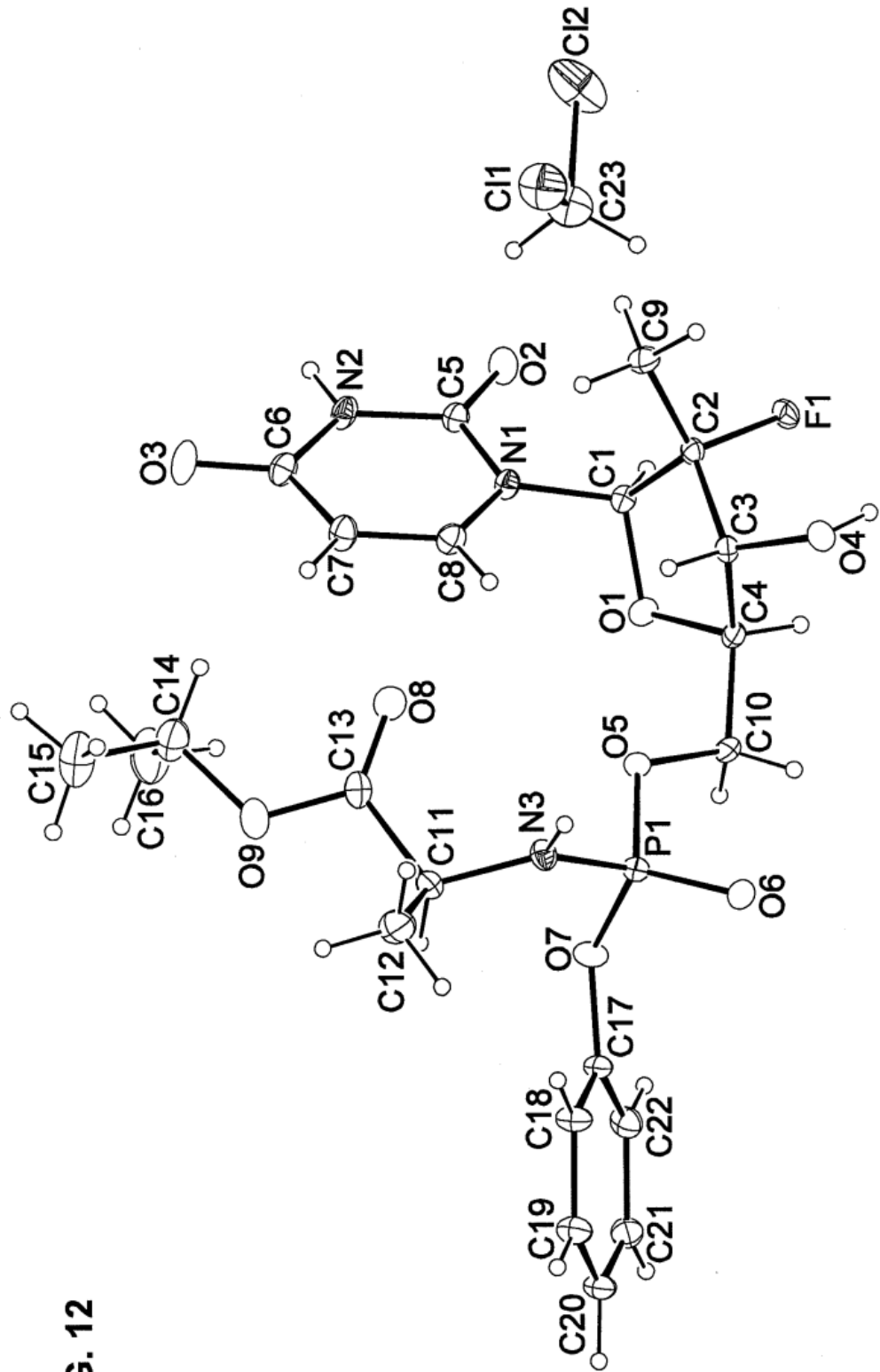


FIG. 12

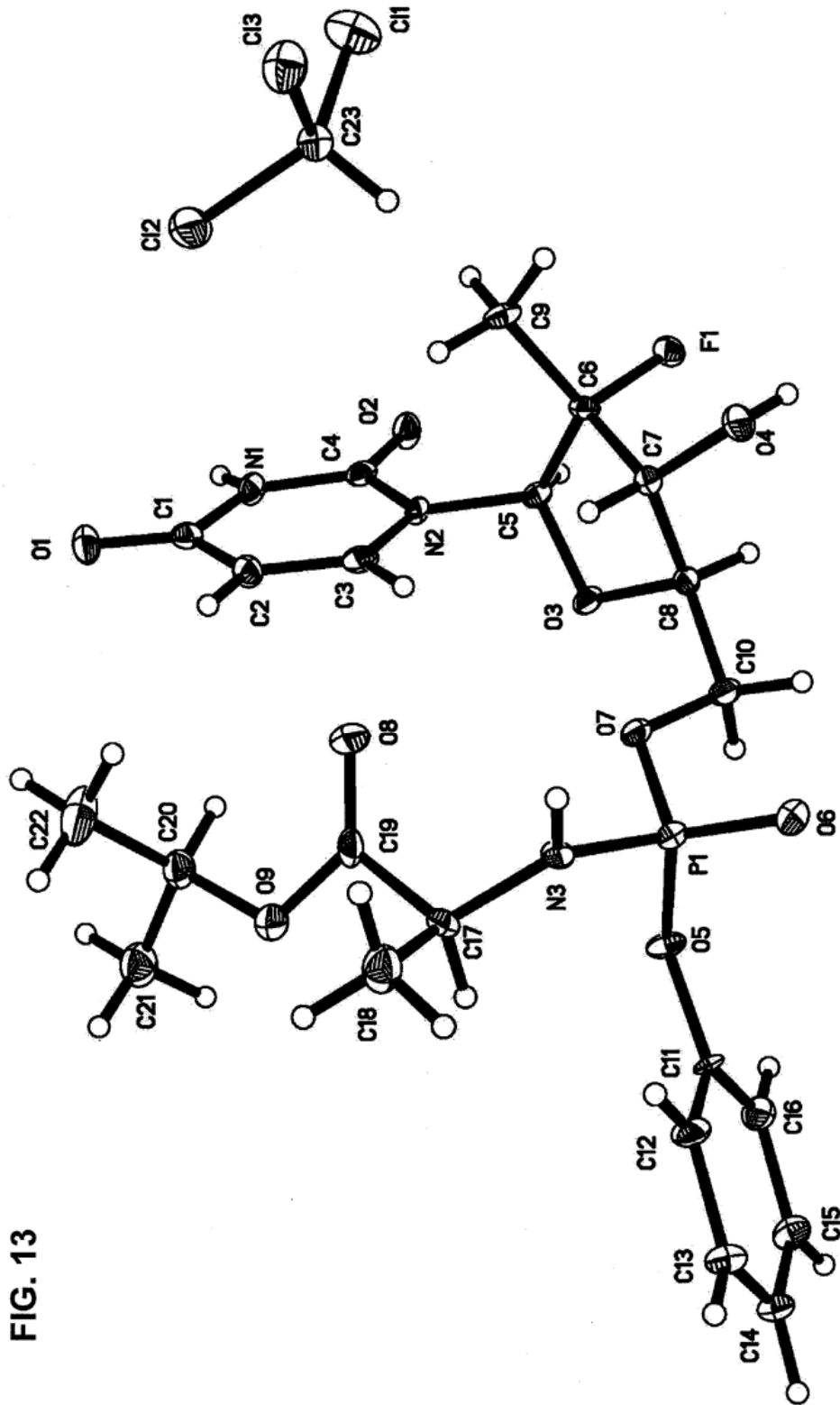
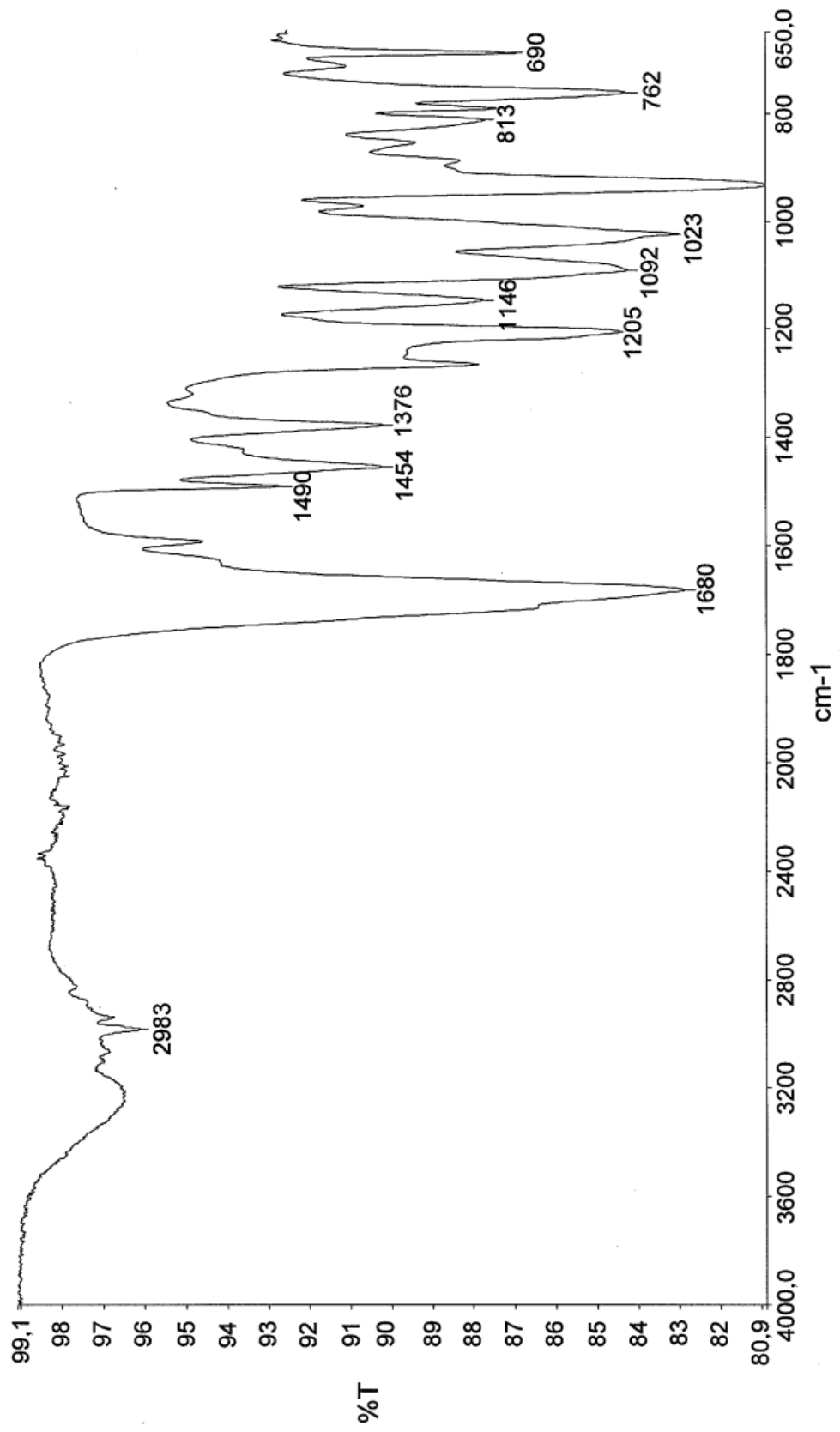
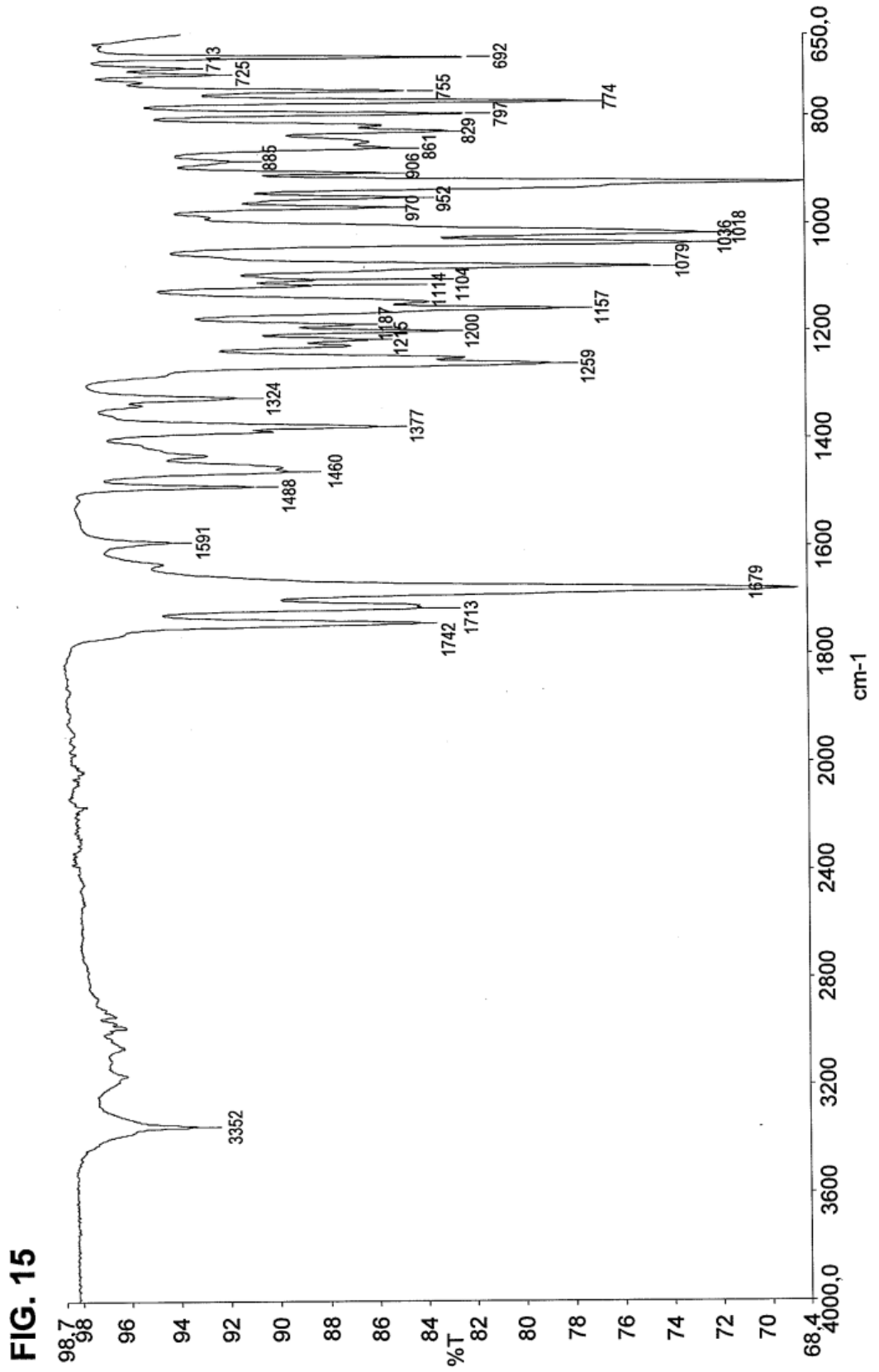


FIG. 13

FIG. 14





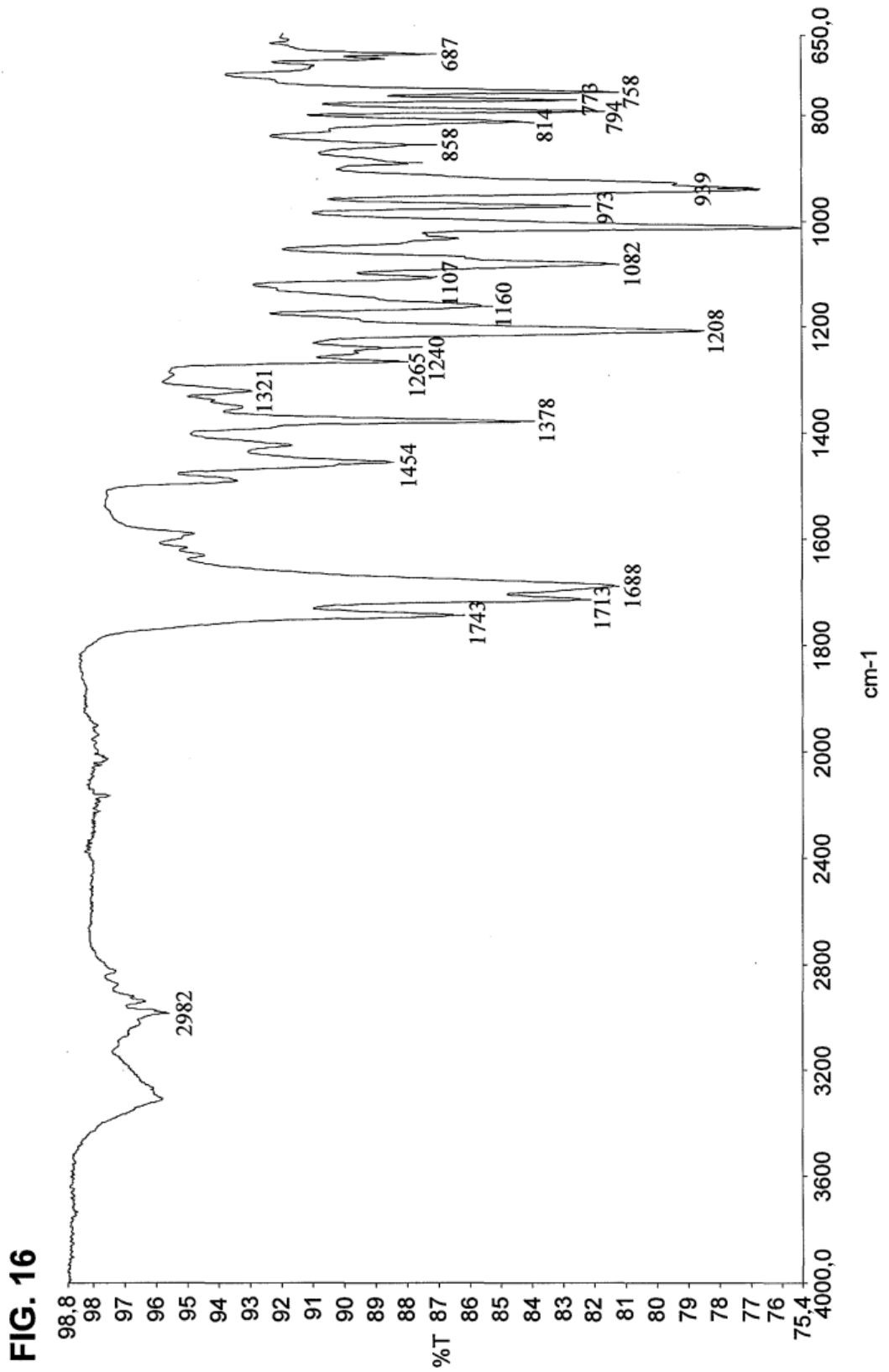
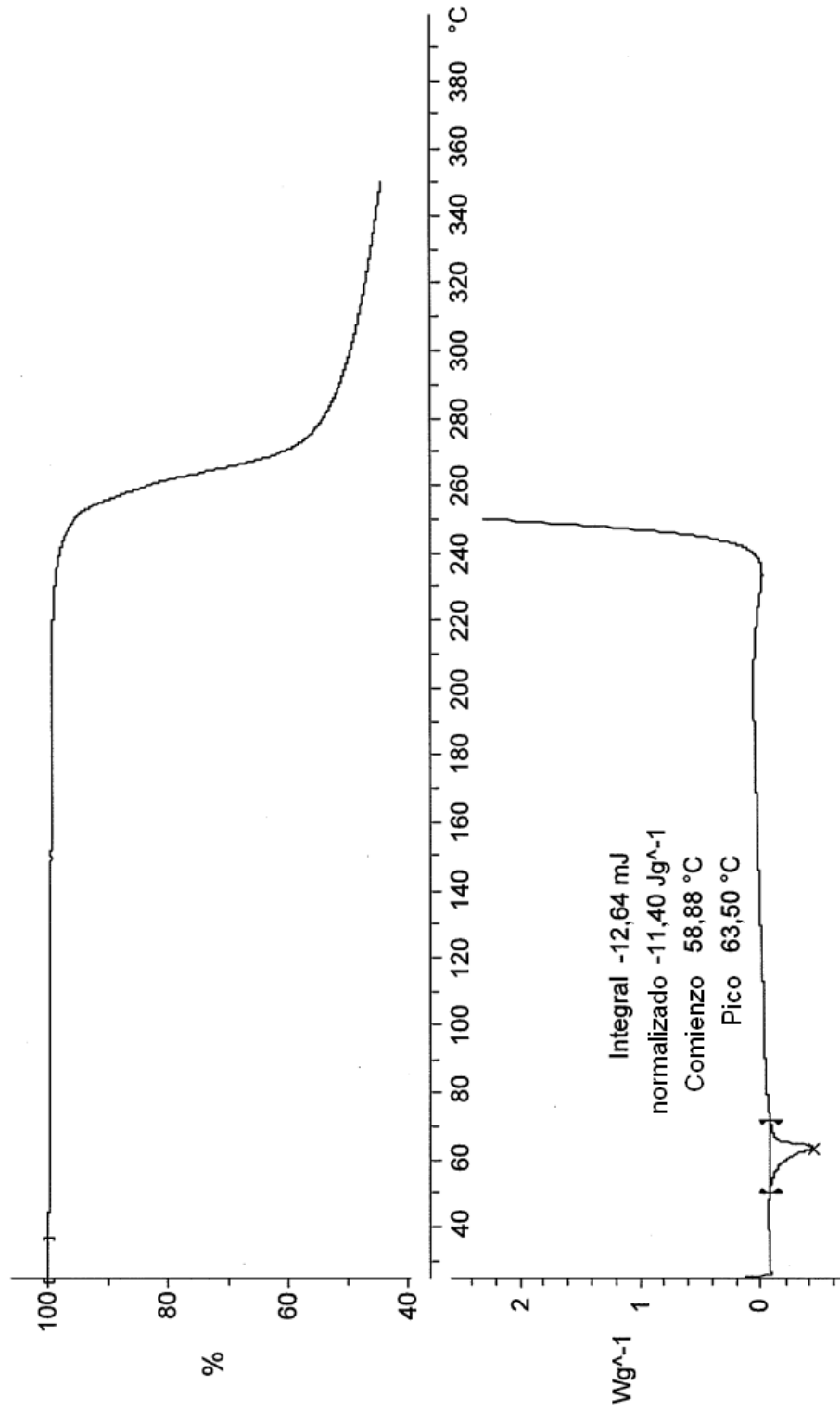
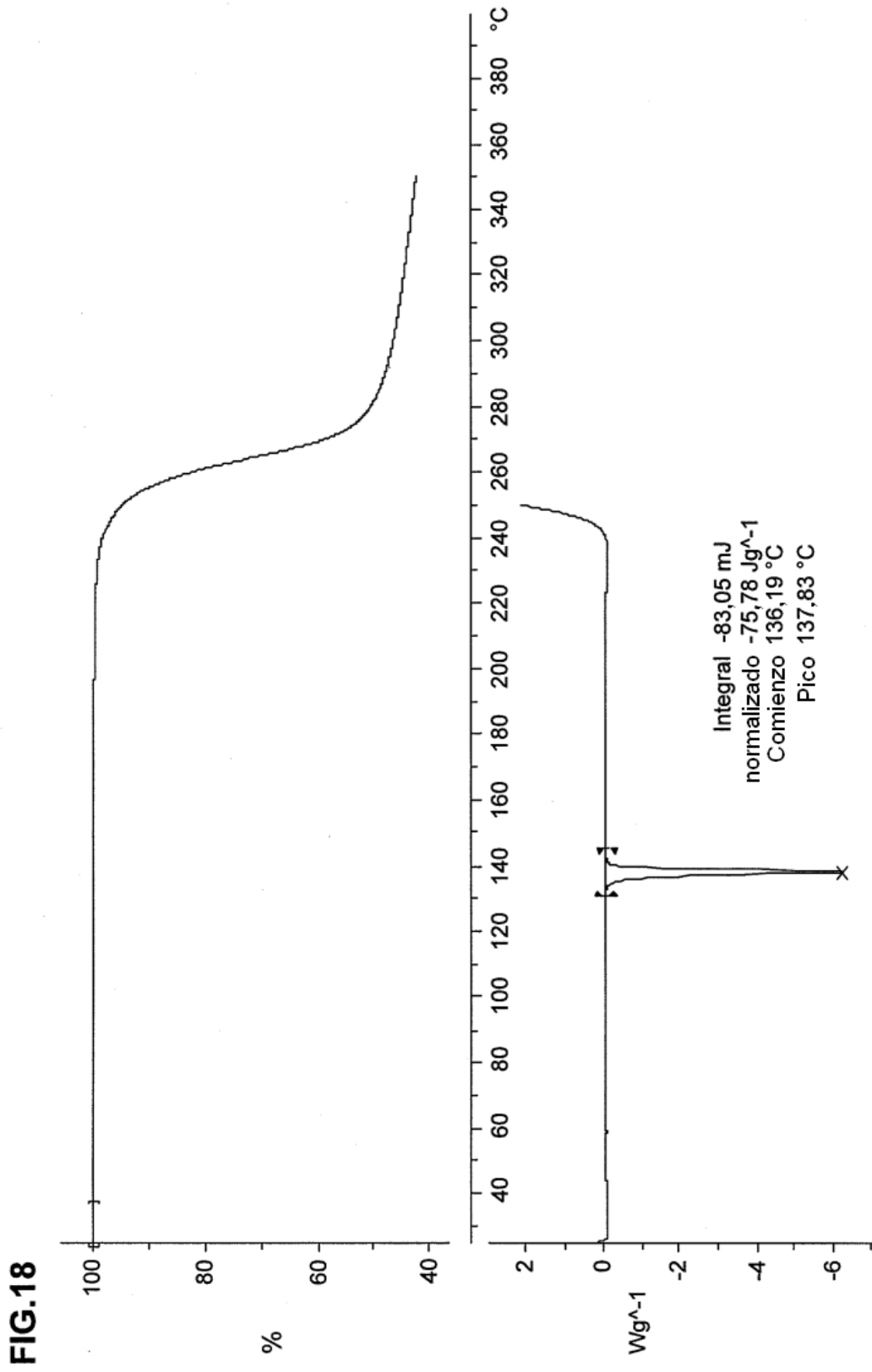


FIG. 17





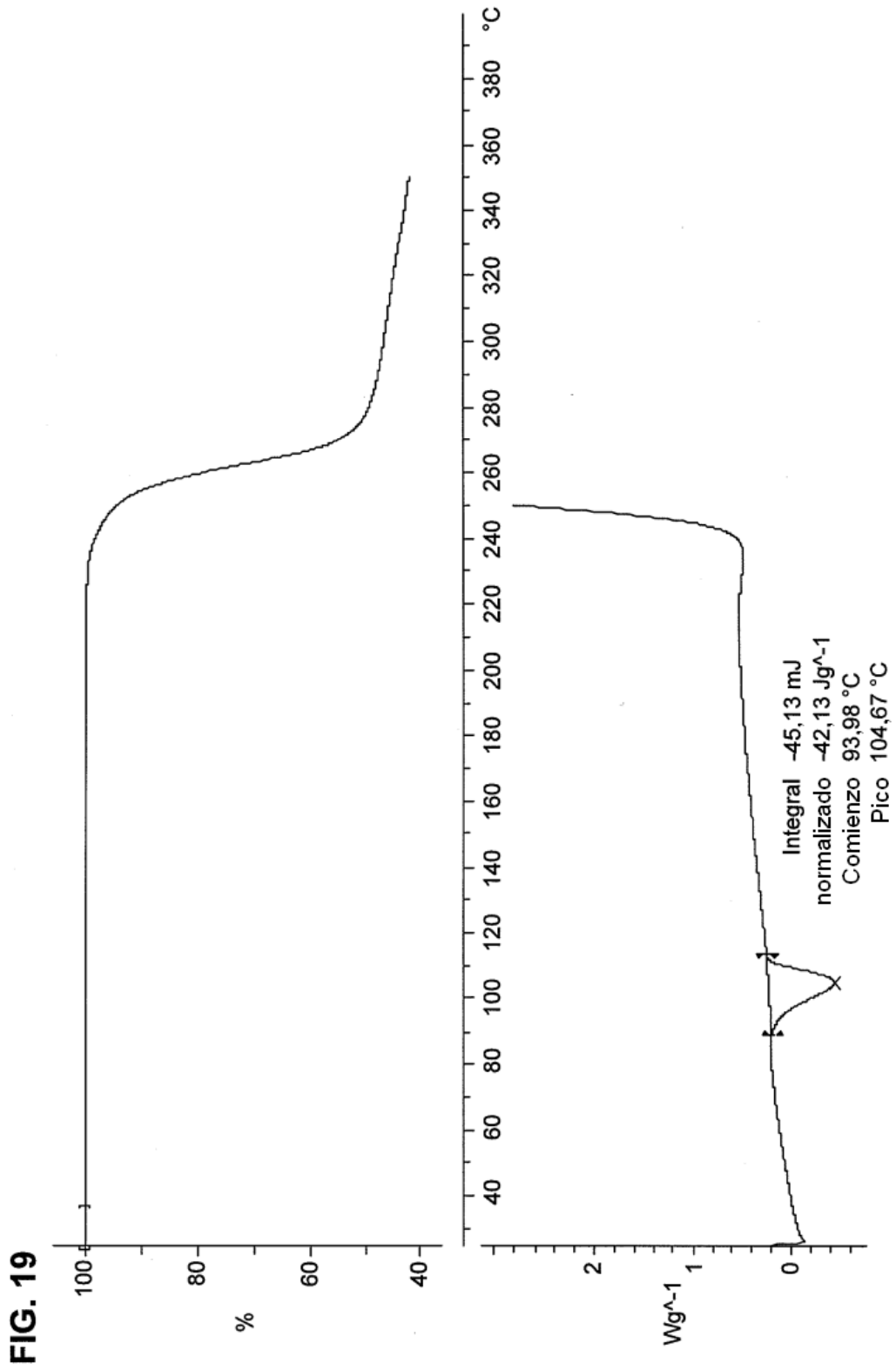


FIG. 20A

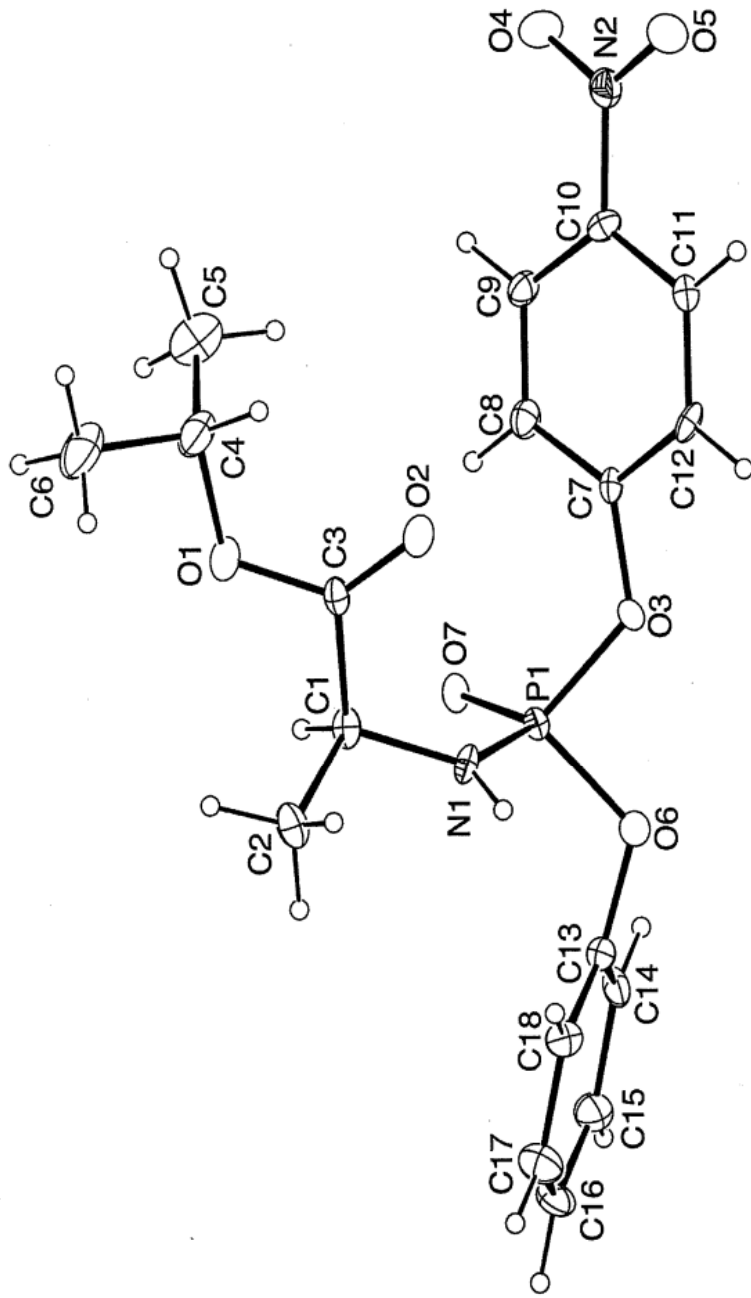
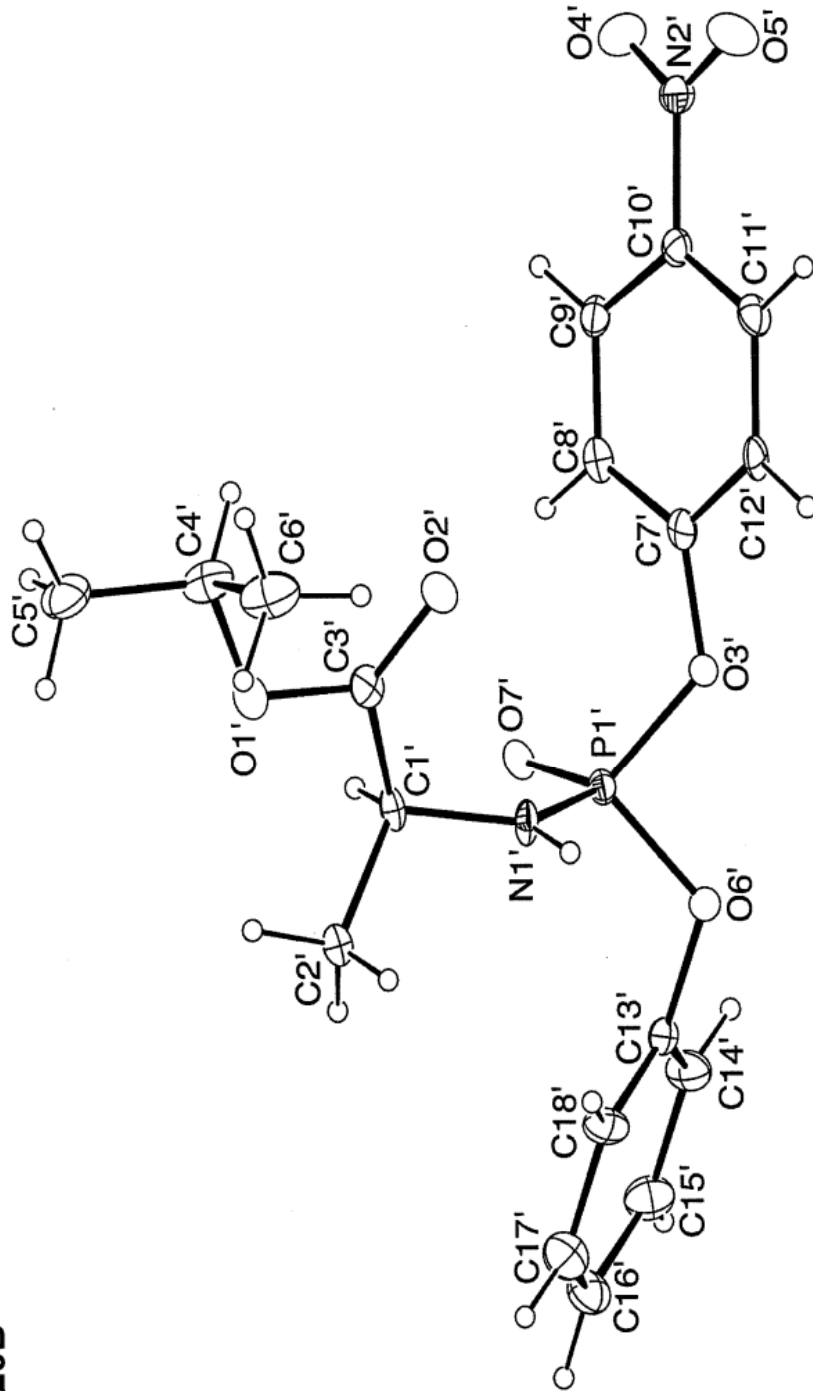


FIG. 20B



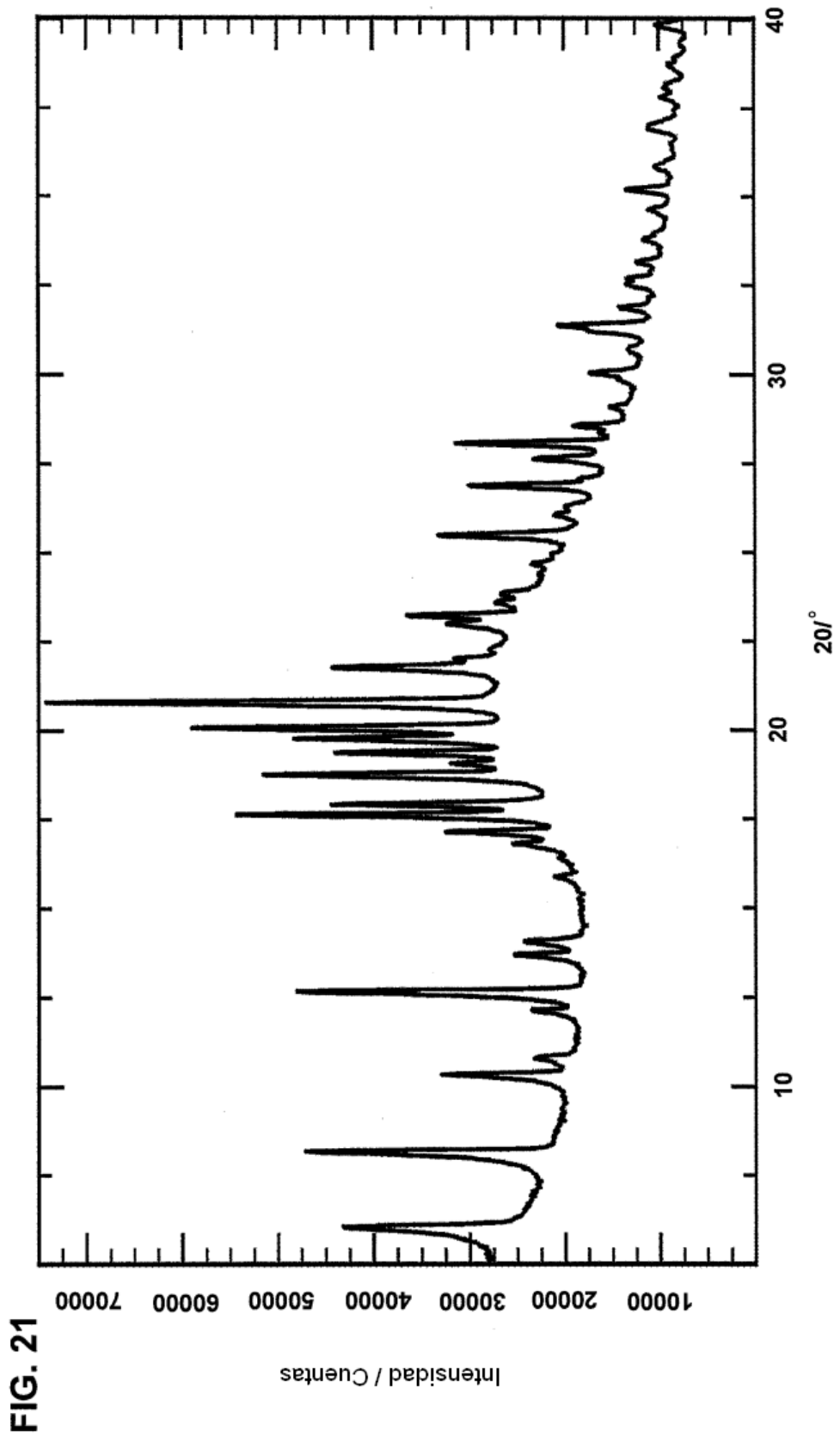


FIG. 21

FIG. 22A

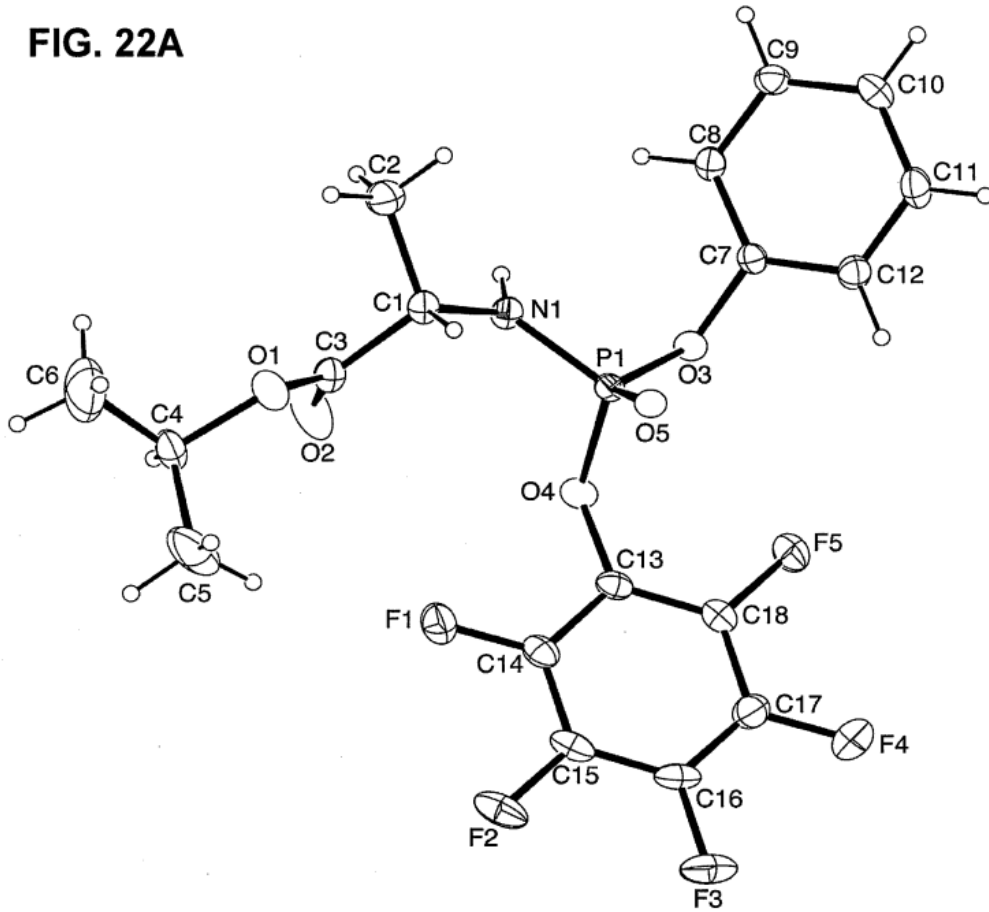


FIG. 22B

