

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 821**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C07F 9/22 (2006.01)

C07F 9/6558 (2006.01)

C07F 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010 E 10721225 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2432792**

54 Título: **Proceso para la preparación de éster de N-[(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-metil-p-fenil-5'-uridilil]-L-alanina 1-metiletilo**

30 Prioridad:

31.03.2010 US 319513 P
20.05.2009 US 179923 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2016

73 Titular/es:

GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)
c/o 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

ES 2 586 821 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

Proceso para la preparación de éster de N-[(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-metil-p-fenil-5'-uridilil]-L-alanina 1-metiletilo

5 **Campo de la invención**

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

Antecedentes

La infección por virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud importante que desarrolla enfermedad hepática crónica, tal como cirrosis y carcinoma hepatocelular, en un número considerable de individuos infectados, se estima que afecta al 2-15 % de la población mundial. Se calcula que hay 4,5 millones de personas infectadas solo en Estados Unidos, según el Centro de Control de Enfermedades de EE. UU. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en todo el mundo hay más de 200 millones de personas infectadas, infectándose cada año al menos 3 a 4 millones de personas. Una vez infectadas, aproximadamente el 20 % de las personas eliminan el virus, pero el resto puede alojar el VHC durante toda su vida. El diez a veinte por ciento de los individuos infectados crónicamente desarrollará con el tiempo cirrosis que destruye el hígado o cáncer. La enfermedad viral se transmite por vía parenteral a través de la sangre y productos sanguíneos contaminados, agujas contaminadas, o por vía sexual, y puede pasar de una madre infectada o madre portadora a su hijo. Los tratamientos actuales para la infección por VHC, que se restringen a inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo nucleósido, ribavirina, presentan un beneficio clínico limitado. Además, no existe vacuna alguna establecida para el VHC. En consecuencia, existe una necesidad urgente de agentes terapéuticos mejorados que combatan eficazmente la infección crónica por VHC.

El virión del VHC es un virus de ARN de cadena positiva con envoltura con una única secuencia genómica oligorribonucleotídica de aproximadamente 9.600 bases que codifica una poliproteína de aproximadamente 3.010 aminoácidos. Los productos proteicos del gen del HCV consisten en las proteínas estructurales C, E1, y E2, y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Se cree que las proteínas no estructurales (NE), proporcionan la maquinaria catalítica para la replicación viral. La proteasa NS3 libera NS5B, la ARN polimerasa dependiente de ARN para la cadena de poliproteína. Se requiere la polimerasa NS5B del VHC 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 polimerasa NS5B 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 polimerasa NS5B 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 el VHC.

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

Virus Flaviviridae

La familia de virus *Flaviviridae* comprende al menos tres géneros distintos: *pestitivirus*, 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 la similitud 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, Filadelfia, PA, 1996, capítulo 31, 931-959). Los *flavivirus* de preocupación mundial que se asocian con enfermedades humanas incluyen los virus de la fiebre hemorrágica del dengue (FHD), virus de la fiebre amarilla, síndrome de choque y 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 *pestitivirus* incluye el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), el virus de la peste porcina clásica (VPPC, también denominado virus del cólera porcino) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) ovina (Moennig, V. *et al. Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Las infecciones por *pestitivirus* del ganado doméstico (vacas, cerdos y ovejas) causan considerables pérdidas económicas en todo el mundo. VDVB causa la enfermedad de las mucosas en el ganado y tiene gran importancia económica en la industria ganadera (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 *pestitivirus* humanos no se han caracterizado tan exhaustivamente como los *pestitivirus* animales. No obstante, los estudios serológicos indican una exposición considerable a *pestitivirus* en seres humanos.

Los *pestitivirus* y *hepacivirus* son grupos de virus relacionados estrechamente con la familia *Flaviviridae*. Otros virus estrechamente relacionados con esta familia incluyen el virus GB A, agentes similares al virus GB A, virus GB B y

virus GB C (también denominado virus de la hepatitis G, VHG). 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 del 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 manera eficiente en un cultivo celular, se utiliza a menudo el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) como sustituto para estudiar el virus VHC.

La organización genética de *pestivirus* y *hepacivirus* es muy similar. Estos virus de ARN de cadena positiva poseen un único marco de lectura abierto (MLA) grande codificante de todas las proteínas virales necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína procesada co- y post-traduccionalmente mediante las 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 encuentran aproximadamente en el carboxi-terminal. Dos tercios del MLA se denominan proteínas no estructurales (NE). La organización genética y el procesamiento de la poliproteína de la porción de proteínas no estructurales del MLA para *pestivirus* y *hepacivirus* son muy similares. Tanto para los *pestivirus* como los *hepacivirus*, las proteínas no estructurales (NE) maduras, en orden secuencial del extremo amino-terminal de la región codificante de la proteína no estructural al carboxi-terminal del MLA, consisten en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

Las proteínas NE de *pestivirus* y *hepacivirus* comparten dominios de secuencia que son característicos de funciones específicas de las proteínas. Por ejemplo, las proteínas NS3 de los virus de ambos grupos poseen motivos de secuencias aminoácidas 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). Del mismo modo, las proteínas NS5B de *pestivirus* y *hepacivirus* poseen los motivos característicos de ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, E.V. y Dolja, V. V., *Cric. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Los papeles y funciones reales de las proteínas NE de *pestivirus* y *hepacivirus* en el ciclo de vida de los virus son directamente 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 MLA (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. EE. UU.* 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). Por último, las proteínas NS5B de *pestivirus* y *hepacivirus* presentan la actividad prevista 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 por el virus de la hepatitis C. La opción terapéutica aprobada actual es el uso de la inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido, ribavirina. Esta terapia se limita en su eficacia clínica y solo el 50 % de los pacientes tratados responden a la terapia. Por lo tanto, son sumamente necesarias terapias más eficaces e innovadoras para hacer frente a la necesidad médica insatisfecha planteada por la infección por VHC.

Se ha identificado actualmente diversas dianas moleculares potenciales para el desarrollo de fármacos antivirales de acción directa como agentes terapéuticos anti-VHC, incluyendo, entre otros, autoproteasa NS2-NS3, proteasa N3, helicasa N3, y polimerasa NS5B. La ARN polimerasa dependiente de ARN es absolutamente esencial para la replicación del genoma de ARN monocatenario en sentido positivo, y esta enzima ha suscitado gran interés entre los químicos medicinales.

Se han revisado inhibidores de NS5B del VHC como terapias potenciales para la infección por VHC: Tan, S.-L., *et al.*, *Nature Rev. Drug Discov.*, 2002, 1, 867-881; Walker, 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 emergencia de cepas resistentes del VHC y la necesidad de identificar los agentes con una amplia cobertura de genotipo apoyan la necesidad de continuar los esfuerzos para identificar nucleósidos más eficaces e innovadores 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 la terminación de cadena o como un inhibidor competitivo que compite con la unión del nucleótido a la polimerasa. Para funcionar como una terminación de cadena, la célula debe captar el análogo de nucleósido y convertirlo *in vivo* a un trifosfato para competir por el sitio de unión del nucleótido en la polimerasa. Esta conversión al trifosfato se media habitualmente por quinasas celulares que imparten requisitos estructurales adicionales a un inhibidor potencial de la 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 la fosforilación *in situ*.

5 En algunos casos, la actividad biológica de un nucleósido se ve obstaculizada por sus características de pobre sustrato para una o más de las quinasas necesarias para convertirlo a la forma trifosfato activo. La formación del monofosfato por el nucleósido quinasa se aprecia generalmente como la etapa limitante de la velocidad de los tres acontecimientos de fosforilación. Para evitar la necesidad de la etapa de fosforilación inicial en el metabolismo de un nucleósido en el análogo de trifosfato activo, se ha descrito la preparación de profármacos de fosfato estables. Se han mostrado que los profármacos de fosforamidato de nucleósido son precursores del trifosfato de nucleósido

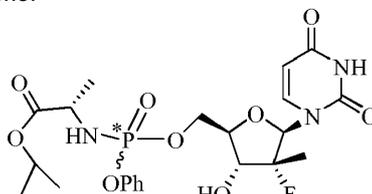
10 activo e inhiben la replicación viral cuando se administran a células enteras infectadas virales (McGuigan, C., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., *et al.*, *Pro. National Acad Sci EE. UU.*, 1996, 93, 7295-7299; 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 US 2006/0241064; y WO 2007/095269.

15 Asimismo la limitación de la utilidad de los nucleósidos como agentes terapéuticos viables se debe a veces por sus pobres propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. Estas propiedades pobres pueden limitar la absorción intestinal de un agente y limitar la captación en el tejido o célula diana. Para mejorar sus propiedades se han empleado profármacos de nucleósidos. 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" se enmascara con grupos lipófilos neutros para obtener un coeficiente de división adecuado para optimizar la captación y el transporte en la célula mejorando drásticamente la concentración intracelular del análogo de monofosfato de nucleósido en relación con la administración de solo el nucleósido original. La hidrólisis mediada por la enzima del resto de éster de fosfato produce un monofosfato de nucleósido en el que la limitación de velocidad de fosforilación

20 inicial es innecesaria. Con este fin, la solicitud de la patente de Estados Unidos 12/053.015, que corresponde a los documentos WO 2008/121634 y US 2010/0016251, divulga una serie de profármacos de fosforamidato de nucleósido, muchos de los cuales muestran actividad en un ensayo de VHC. Varios compuestos divulgados en el documento US 2010/0016251 se ensayaron como potencial candidato clínico para su aprobación por la AAM.

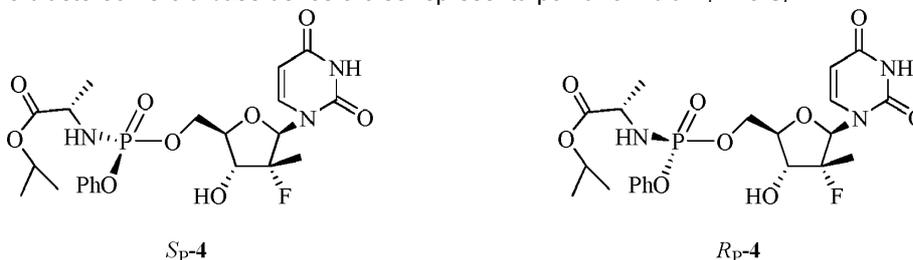
30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto representado por la fórmula 4, o un diastereómero a base de fósforo del mismo:



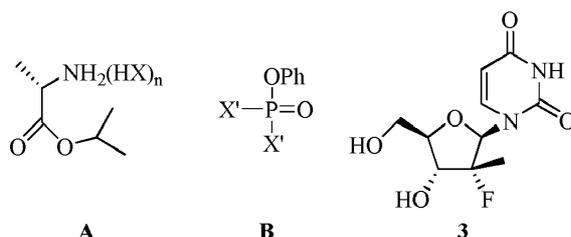
4

35 en la que P* representa un átomo de fósforo quiral, y en la que dicho diastereómero a base de fósforo se representa por la fórmula R_P-4 o S_P-4:



que comprende:

40 a) hacer reaccionar un alanato de isopropilo, **A**, un di-X'-fenilfosfato, **B**, 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende 4, o el diastereómero a base de fósforo del mismo;



en la que X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y X' es un halógeno

b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto protector para obtener una segunda mezcla que comprende 4, o el diastereómero a base de fósforo del mismo, en la que el compuesto protector se selecciona de entre un compuesto protector t-butildimetilsililo y un compuesto protector dimetoxitriifenilmetilo; y

c) someter opcionalmente la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción con el fin de obtener 4, o el diastereómero a base de fósforo del mismo.

Las características preferidas del proceso de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de los dibujos

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 de cristal de rayos X para S_P -4 (Forma 1)

Figura 11. Estructura de cristal de rayos X (Isotrópica) para S_P -4·CH₂Cl₂ (Forma 2)

Figura 12. Estructura de cristal de rayos X (Anisotrópica) para S_P -4·CH₂Cl₂ (Forma 2)

Figura 13. Estructura de cristal de rayos X para S_P -4·CHCl₃ (Forma 3)

Figura 14. Espectro FT-IR de 4.

Figura 15. Espectro FT-IR de R_P -4.

Figura 16. Espectro FT-IR de S_P -4

Figura 17. Análisis TGA y DSC de 4.

Figura 18. Análisis TGA y DSC de R_P -4.

Figura 19. Análisis TGA y DSC de S_P -4.

Figura 20A. Estructura de cristal de rayos X para 8 (isómero S_P) (molécula n.º 1 de la unidad asimétrica).

Figura 20B. Estructura de cristal de rayos X para 8 (isómero S_P) (molécula n.º 2 de la unidad asimétrica).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La expresión "una" entidad, como se usa en este 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, el término "una" (o "un"), "uno o más", y "al menos uno" pueden usarse de forma intercambiable en el presente documento.

Las expresiones "opcional" u "opcionalmente", como se usan en el presente documento, significan que un evento o circunstancia que se describe posteriormente puede no ocurrir necesariamente, y que la descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia se produce y casos en los que no. Por ejemplo, "enlace opcional" significa que el enlace puede o no estar presente, y que la descripción incluye enlaces sencillos, dobles o triples.

El término "P*" significa que el átomo de fósforo es quiral y que tiene una designación Cahn-Ingold-Prelog correspondiente de "R" o "S" que tienen sus significados habituales aceptados.

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 lo 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, donde "sustancialmente 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.

5 El término "metabolito", como se describe en el presente documento, se refiere a un compuesto producido *in vivo* después de la administración un sujeto que necesita el mismo.

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

10 La expresión "sustancialmente como se muestra en..." un patrón XRPD especificado significa que las posiciones pico mostradas en el patrón XRPD son sustancialmente las mismas, dentro la inspección visual o recurrir a listas pico seleccionadas ($\pm 0,2 \text{ }^{\circ}2\theta$). Un experto entiende que las intensidades pueden variar dependiendo de la muestra.

15 La expresión "sustancialmente anhidro" significa que una sustancia contiene como mucho el 10 % en peso de agua, preferiblemente como mucho el 1 % en peso de agua, más preferiblemente como mucho el 0,5 % en peso de agua, y mucho más preferiblemente como mucho el 0,1 % en peso de agua.

20 Un disolvente o anti-disolvente (como se usa en las reacciones, la cristalización, etc. o disolventes reticulares 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 clorocarbono C₁ a C₂, un nitrilo C₂ a C₇, un disolvente diverso, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂, y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂.

25 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 sin limitación, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, hexanol y ciclohexanol.

30 El éter C₂ a C₈ se refiere a un éter lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene dicho número de carbonos. El éter C₂ a C₈ incluye, pero sin limitación, éter dimetilico, éter dietílico, éter diisopropílico, 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 dicho número de carbonos. La cetona C₃ a C₇ incluye, pero sin limitación, acetona, metil etil cetona, propanona, butanona, metil isobutil cetona, metil butil cetona y ciclohexanona.

35 El éster C₃ a C₇ se refiere a un éster lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene dicho número de carbonos. El éster C₃ a C₇ incluye, pero sin limitación, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de n-butilo, etc.

40 El clorocarbono C₁ a C₂ se refiere a un clorocarbono que tiene dicho número de carbonos. El clorocarbono C₁ a C₂ incluye, pero sin limitación, 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 dicho número de carbonos. El nitrilo C₂ a C₇ incluye, pero sin limitación, acetonitrilo, propionitrilo, etc.

45 Un disolvente diverso se refiere a un disolvente empleado comúnmente en la química orgánica, que incluye, pero sin limitación, dietilenglicol, diglima (dietilenglicol dimetil éter), 1,2-dimetoxi-etano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, glicerina, hexametilfosforamida, hexametilfósforo triama, N-metil-2-pirrolidiona, nitrometano, piridina, trietil amina y ácido acético.

50 El término hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂ se refiere a un hidrocarburo lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico. El hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂ incluye, pero sin limitación, n-pentano, éter de petróleo (ligroína), n-hexano, n-heptano, ciclohexano y cicloheptano.

55 El término aromático C₆ a C₁₂ se refiere a hidrocarburos sustituidos y sin sustituir que tienen un grupo fenilo como su estructura principal. Los hidrocarburos preferidos incluyen benceno, xileno, tolueno, clorobenceno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, xilenos, siendo tolueno más preferido.

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

60 El término "grupo de bloqueo" se refiere a un grupo químico que muestra las siguientes características. El "grupo" se obtiene a partir de un "compuesto protector". Los grupos que son selectivos para hidroxilos primarios sobre hidroxilos secundarios que pueden ponerse en condiciones compatibles con la estabilidad del fosforamido (pH 2-8) e imparten sobre el producto resultante propiedades físicas sustancialmente diferentes que permiten una separación más fácil del producto del grupo nuevo de 3'-fosforamido-5' del compuesto deseado sin reaccionar. El grupo debe reaccionar selectivamente con un buen rendimiento para dar un sustrato protegido que sea estable para las reacciones proyectadas (véase Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a ed. T. W. Greene y P. G. M. Wuts, John

65

Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1999). Los ejemplos de grupos incluyen, pero sin limitación: benzoílo, acetilo, benzoílo fenil-sustituido, tetrahidropirano, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-ilo), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-ilo) o 9-(p-metoxifenil)xantina-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.

5 Los acetales, tales como MOM o THP y similares se consideran grupos posibles. Los compuestos fluorados también se contemplan en la medida en que pueden unirse al compuesto y pueden eliminarse selectivamente pasando a través de un medio de extracción en fase sólida de flúor (FluoroFlash®). Un ejemplo específico incluye un análogo de tritilo fluorado, un análogo tritilo 1-[4-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodecil)fenil]-1,1-difenilmetanol. También se contemplan otros análogos fluorados de tritilo, BOC, FMOC, CBz, etc. Los cloruros de sulfonilo como cloruro de p-toluenosulfonilo pueden reaccionar selectivamente en la posición 5'. Los ésteres pueden formarse selectivamente, tales como acetatos y benzoatos. Pueden usarse anhídridos dicarboxílicos, tal como anhídrido succínico y sus derivados para generar un enlace éster con un ácido carboxílico libre, dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, adipilo, pimelilo, superilo, azelailo, sebacilo, ftalilo, isoftalilo, tereftalilo, etc. El ácido carboxílico libre aumenta la polaridad dramáticamente y también puede usarse como una palanca para extraer el producto de reacción en fases acuosas moderadamente básicas tales como soluciones de bicarbonato sódico. El grupo fosforamido es relativamente estable en medios ácidos, por lo que también pueden usarse grupos que requieren condiciones de reacción ácidas, tales como, tetrahidropirano.

20 El término "grupo protector" que se obtiene a partir de un "compuesto protector", tiene su significado simple y habitual, es decir, al menos un grupo protector o de bloqueo está unido a al menos un grupo funcional (por ejemplo, -OH, -NH₂, etc.) que permite la modificación química de al menos un grupo funcional diferente. Los ejemplos de grupos protectores, incluyen, pero sin limitación, benzoílo, acetilo, benzoílo fenil-sustituido, tetrahidropirano, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-ilo), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-ilo) o 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, C(O)O(alquilo inferior), C(O)O(alquilen 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, tales como *terc*-butildimetilsililo, *terc*-butildifenilsililo, Si(alquil inferior)₂OSi(alquil inferior)₂OH (tal como -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH).

30 La expresión "compuesto protector", como se usa en el presente documento, y a menos que se indique 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 son capaces de protegerse.

35 La expresión "grupo saliente", como se usa en este documento, tiene el mismo significado para el experto (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure-Cuarta Edición de Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992 paginas 351-357) y representa un grupo que forma parte de y está unido a una molécula de sustrato; en una reacción donde la molécula de sustrato experimenta una reacción de desplazamiento (por ejemplo, con un nucleófilo), el grupo saliente se desplaza entonces. Los ejemplos de grupos salientes incluyen, pero sin limitación: halógeno (F, Cl, Br e I), preferiblemente Cl, Br o I; tosilato, mesilato, triflato, acetato, canforsulfonato, arilóxido, y arilóxido sustituido con al menos un grupo aceptor de electrones (por ejemplo, p-nitrofenóxido, 2-clorofenóxido, 4-clorofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, pentafluorofenóxido, etc.), etc. La expresión "grupo aceptor de electrones" tiene su significado habitual aquí. Los ejemplos de grupos aceptores de electrones incluyen, pero sin limitación, un halógeno, -NO₂, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)(arilo), -C(O)O(alquilo inferior), -C(O)O(arilo), etc.

45 La expresión "reactivo básico", como se usa en este documento, significa un compuesto que es capaz de desprotonar un grupo hidroxilo. Los ejemplos de reactivos básicos incluyen, pero sin limitación, un (alk inferior)óxido ((alquil inferior)OM) junto con un disolvente alcohólico, donde los (alk inferior)óxidos incluyen, pero sin limitación, 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 (alquil inferior)OH, tales como, por ejemplo, MeOH, EtOH, ⁿPrOH, ⁱPrOH, ^tBuOH, ⁱAmOH, etc. También pueden usarse bases no alcoxi tales como hidruro sódico, hexametildisilazano sódico, hexametildisilazano de litio, diisopropilamida de litio, hidruro cálcico, carbonato sódico, carbonato potásico, carbonato de cesio, DBU, DBN, reactivos de Grignard, tales como (alquil inferior)Mg(halógeno), que incluyen, pero sin limitación, MeMgCl, MeMgBr, ^tBuMgCl, ^tBuMgBr, etc.

55 El término "base" incluye el término "reactivo básico" y pretende ser un compuesto que es capaz de desprotonar un compuesto que contiene protón, es decir, una base Bronsted. Además de los ejemplos que se han mencionado anteriormente, los ejemplos adicionales de una base incluyen, pero sin limitación piridina, colidina, 2,6-(alquil inferior)-piridina, dimetilalanilina, imidazol, N-metilimidazol, pirazol, N-metilpirazol, trietilamina, di-isopropiletilamina, etc.

60 La expresión "grupo aceptor de electrones" es acorde con su significado habitual. Los ejemplos de grupos aceptores de electrones incluyen, pero sin limitación, 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.

65 El término "co-cristalatos" incluyen co-cristalatos de 4, R_P-4, o S_P-4 junto con sales, que incluye sales farmacéuticamente aceptables.

El término "sales", como se describe en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende un catión y un anión, que puede producirse por la protonación de un resto aceptor de protones y/o la desprotonación de un resto donador de protones. Ha de apreciarse que la protonación del resto aceptor de protones da como resultado la formación de una especie catiónica en la que la carga se equilibra por 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 por la presencia de un catión fisiológico.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación: (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas 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 cinnámico, 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 de bases formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos inorgánicos que se han enumerado anteriormente, donde las bases conjugadas comprenden un componente catiónico seleccionado de entre Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , $\text{NH}_3\text{R}^{4-g+}$, en la que R^m es un alquilo C_{1-3} y g es un número seleccionado de entre 0, 1, 2, 3 o 4. Ha de entenderse que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolventes (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos) como se define en el presente documento, de la misma sal de adición de ácidos.

El término "alquilo" se refiere a un residuo hidrocarburo de cadena no ramificada o ramificada, saturado y monovalente que contiene de 1 a 30 átomos de carbono. El término "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 C_{1-4} " se refiere a un alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. El término "alquilo inferior" representa un residuo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono. "Alquilo C_{1-20} ", como se usa en este documento, se refiere a un alquilo que comprende de 1 a 20 átomos de carbono. "Alquilo C_{1-10} ", como se usa en este documento, se refiere a un alquilo que comprende de 1 a 10 carbonos. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, 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 indican que el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con un grupo arilo o un grupo heteroarilo respectivamente.

El término "alqueno" se refiere a un radical de cadena hidrocarburo sin sustituir que tiene de 2 a 10 átomos de carbono que tienen uno o dos dobles enlaces olefínicos, preferiblemente un doble enlace olefínico. El término "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. El término "alqueno C_{2-10} " se refiere a un alqueno que comprende de 2 a 10 átomos de carbono. El término "alqueno C_{2-4} " se refiere a un alqueno que comprende de 2 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, vinilo, 1-propeno, 2-propeno (alilo) o 2-butenilo (crotilo).

El término "arilo", como se usa en el presente documento, y a menos que se indique otra cosa, se refiere a fenilo sustituido o sin sustituir (Ph), bifenilo, o naftilo, preferiblemente el término arilo se refiere a fenilo sustituido o sin sustituir. 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 protegidos según sea necesario, como se conoce por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se indica en T.W. Greene y P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

El término "arilóxido", como se usa en el presente documento, y a menos que se indique otra cosa, se refiere a fenóxido sustituido o sin sustituir (PhO-), *p*-fenil-fenóxido (*p*-Ph-PhO-), o naftóxido, preferiblemente el término arilóxido se refiere a fenóxido sustituido o sin sustituir. El grupo arilóxido puede estar sustituido con uno o más restos seleccionados de 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 protegidos según sea necesario, como se conoce por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se indica en T.W. Greene y P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

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

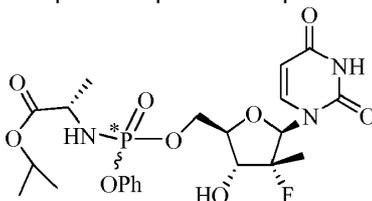
El término "excipiente", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto que se usa para preparar una composición farmacéutica, y es generalmente seguro, no tóxico y ni biológica ni de otra manera indeseable, e incluye excipientes que son aceptables para su uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano.

El término "cristalino" se refiere a una situación en la que una muestra sólida de S_P-4 o R_P-4 tiene características

crystalinas cuando se determina por difracción de polvo de rayos X o una técnica de rayos X monocristalina.

- El término "tipo cristal" se refiere a una situación en la que una muestra sólida de S_P-4 o R_P-4 tiene características cristalinas cuando se determina por un medio, visualmente o por microscopía óptica o polarizante, pero no tiene características cristalinas cuando se determina por otros medios, por ejemplo, difracción de polvo de rayos X. Los métodos de determinación visual de la cristalinidad de una muestra sólida por visión o por microscopía óptica o de polarización se desvelan en USP <695> y <776>. Una muestra sólida de S_P-4 o R_P-4 que es de "tipo cristal" puede ser cristalina en ciertas condiciones, pero puede volverse no cristalina cuando se somete a otras condiciones.
- El término "amorfo" se refiere a una situación en la que una muestra sólida de S_P-4 o R_P-4 no es cristalina ni de tipo cristal.

Se desvela en el presente documento un compuesto representado por la fórmula 4:

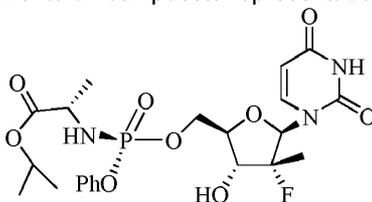


4

- 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 designados como 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 designa como $4 \cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $4 \cdot mH_2O$, donde S es un disolvente reticular, n varía en una cantidad de número entero o no entero de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 y m varía en una cantidad de número entero o no entero de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula 4 puede no existir como un solvato o hidrato, pero tiene una cierta cantidad ventajosa de disolvente adsorbido (S) o agua. En cuyo caso, la cantidad de S o agua puede variar de aproximadamente el 0 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso, basado en el peso del compuesto representado por la fórmula 4. El compuesto representado por la fórmula 4 y sus solvatos e hidratos del mismo es cristalino, de tipo cristal o amorfo.

25

También se desvela en el presente documento un compuesto representado por la fórmula R_P-4 :



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 designa como $R_P-4 \cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $S_P-4 \cdot mH_2O$, donde S es un disolvente reticular, n varía en una cantidad de número entero o no entero de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 y m varía en una cantidad de número entero o no entero de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula R_P-4 puede no existir como un solvato, hidrato, o solvato/hidrato mixto, pero tener una cierta cantidad ventajosa de disolvente adsorbido (S), agua, o tanto S como agua. En cuyo caso, la cantidad de S o agua puede variar de aproximadamente el 0 % en peso a aproximadamente 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 sus solvatos e hidratos del mismo es cristalino, de tipo cristal o amorfo.

40

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 XRPD 2θ ($^\circ$) a aproximadamente: 6,6, 7,1, 9,0, 11,6, 17,9, 20,7, 24,1, 24,4 y 26,2.

45

También se desvela en el presente documento un R_P-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^\circ$) 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 XRPD sustancialmente como el que se muestra en la figura 2.

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

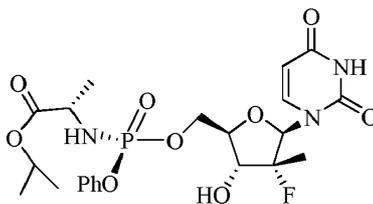
- 5 También se desvela en el presente documento R_{P-4} que tiene un espectro FT-IR sustancialmente como el que se muestra en la figura 15.

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

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

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

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



S_{P-4}

15

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 designa como $S_{P-4} \cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $S_{P-4} \cdot mH_2O$, donde S es un disolvente reticular, n varía en una cantidad de número entero o no entero de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 y m varía en una cantidad de número entero o no entero de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula S_{P-4} puede no existir como un solvato o hidrato, pero tener una cierta cantidad ventajosa de disolvente adsorbido (S) o agua. En cuyo caso, la cantidad de S o agua puede variar de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 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 sus solvatos e hidratos del mismo es cristalino, de tipo cristal o amorfo.

20

25

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

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

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

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

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

40

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

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

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

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

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

55

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

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

5 También se desvela en el presente documento S_p-4 que tiene los siguientes picos FT-IR (cm⁻¹) a aproximadamente: 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208 y 1082.

10 También se desvela en el presente documento S_p-4 que tiene un espectro FT-IR sustancialmente como el mostrado en la figura 7.

También se desvela en el presente documento S_p-4 sustancialmente puro.

15 También se desvela en el presente documento S_p-4 cristalino sustancialmente puro.

También se desvela en el presente documento S_p-4 amorfo sustancialmente puro.

Dosificación, administración, y uso

20 Una composición para el tratamiento y/o profilaxis de cualquiera de los agentes virales puede prepararse utilizando cualquiera de los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4. Agentes virales posibles incluyen, entre otros: 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, virus de la polio, diarrea viral bovina, virus de la encefalitis japonesa, o aquellos virus que pertenecen a los grupos *pestivirus*, *hepacivirus* o *flavivirus*.

25 Una composición para el tratamiento de cualquiera de los agentes virales divulgados en el presente documento se describe en el presente documento, dicha composición que comprende un medio farmacéuticamente aceptable se selecciona entre un excipiente, transportador, diluyente, medio equivalente y cualquiera de los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4, teniendo por objeto incluir sus hidratos, solvatos, y cualquier forma cristalina de cualquiera de los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4 o sus hidratos y solvatos de los mismos.

30 Los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4 pueden formularse de forma independiente en diversas formas de dosificación y transportadores de administración oral. La administración oral puede encontrarse en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas duras y blandas de gelatina, soluciones, emulsiones, jarabes, o suspensiones. 35 Los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4 son eficaces cuando se administran por medio de la administración con supositorios, entre otras vías de administración. El modo más conveniente de administración es generalmente oral utilizando un régimen de dosificación diario conveniente que puede ajustarse de acuerdo con la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente a la medicación antiviral.

40 Los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4 junto con uno o más excipientes, transportadores o diluyentes convencionales, pueden ubicarse en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitaria pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos activos adicionales y las formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo acorde con el intervalo diario de dosificación que se pretende emplear. 45 Las composiciones farmacéuticas pueden emplearse como 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 forma de supositorios para administración rectal o vaginal. Una preparación típica contendrá aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 % de compuesto o compuestos activos (p/p).

50 Los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4 pueden administrarse solos pero generalmente se administrarán mezclados con uno o más excipientes, diluyentes o transportadores farmacéuticos adecuados seleccionados con respecto a la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica convencional.

55 Las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, y gránulos dispersables. Un transportador 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 polvos, el transportador es generalmente un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En comprimidos, el componente activo generalmente se mezcla con el transportador que tiene la capacidad de unión necesaria en 60 proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Transportadores adecuados incluyen, entre otros, 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, aromatizantes, estabilizadores, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes 65 solubilizantes, y similares. Los ejemplos de formulaciones sólidas se ejemplifican en los documentos 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.

5 Las formulaciones líquidas que también son adecuadas para la administración oral incluyen formulaciones líquidas que incluyen asimismo emulsiones, jarabes, elixires y suspensiones acuosas. Estas incluyen preparaciones en forma sólida destinadas a convertirse en preparaciones en forma líquida poco antes de su uso. Ejemplos de formulaciones líquidas se ejemplifican en las patentes de Estados Unidos n.º 3.994.974; 5.695.784; y 6.977.257. Las emulsiones pueden prepararse en soluciones, por ejemplo, en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden
10 contener agentes emulsionantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitán, o acacia. Las suspensiones acuosas pueden prepararse dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y otros agentes de suspensión adecuadamente conocidos.

15 Los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 pueden formularse de forma independiente para la administración como supositorios. En primer lugar, se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao y el componente activo se dispersa homogéneamente, por ejemplo, por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y solidificar.

20 Los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 pueden formularse de forma independiente para la administración vaginal. Pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen además el ingrediente activo, tal como transportadores se conocen en la materia por ser apropiados. Algunas de estas formulaciones pueden utilizarse igualmente junto con un condón con o sin un agente espermicida.

25 Formulaciones adecuadas junto con transportadores, 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, Pensilvania. Un científico experto en formulación puede modificar las formulaciones en las enseñanzas de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una vía particular de
30 administración sin hacer que las composiciones que contienen los compuestos contemplados en el presente documento sean inestables o comprometan su actividad terapéutica.

Adicionalmente, los compuestos purificados 4, R_p-4 , o S_p-4 pueden formularse de forma independiente junto con liposomas o micelas. En cuanto a los liposomas, se contempla que los compuestos purificados pueden formularse
35 de manera como se divulga en las patentes de Estados Unidos n.º 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. Con respecto a las micelas, se contempla que los compuestos purificados pueden formularse de manera como se divulga en las patentes de Estados Unidos
40 5.145.684 y 5.091.188.

Cualquiera de los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 puede utilizarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier afección del resultado de una infección por uno cualquiera de los siguientes agentes virales:
45 virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina y virus de la encefalitis japonesa.

El término "medicamento" significa una sustancia utilizada en un método de tratamiento y/o profilaxis de un sujeto en necesidad del mismo, en el que la sustancia incluye, entre otros, una composición, una formulación, una forma de dosificación, y similares, que comprende cualquiera de los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 . Se contempla el uso de
50 cualquiera de los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de cualquiera de las afecciones antivirales divulgadas en el presente documento, solo o en combinación con otro compuesto divulgado en el presente documento. Un medicamento incluye, entre otros, una cualquiera de las composiciones contempladas por la cuarta realización divulgada en el presente documento.

55 Asimismo se divulga un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto en necesidad del mismo, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 al sujeto.

Se tiene por objeto que un sujeto que lo necesita es uno con cualquier afección resultado de una infección por
60 cualquiera de los agentes virales divulgados en el presente documento, que incluye, entre otros, virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina o virus de la encefalitis japonesa, virus *Flaviviridae* o *pestivirus* o *hepacivirus* o un agente viral que provoca síntomas equivalentes o comparables a cualquiera de los virus mencionados previamente.

65 El término "sujeto" se refiere a un mamífero, que incluye, entre otros, ganado, cerdos, ovejas, pollos, pavos, búfalos,

llamas, avestruces, perros, gatos y seres humanos, preferentemente el sujeto es un ser humano. Se contempla que en el método de tratamiento de un mismo sujeto de la novena realización puede ser cualquiera de los compuestos contemplados en el presente documento, ya sea solo o en combinación con otro compuesto divulgado en el presente documento.

5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se utiliza en el presente documento, significa una cantidad requerida para reducir los síntomas de una enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requisitos individuales en cada caso particular. Esa dosificación puede variar en los amplios límites en función de numerosos
10 factores, tales como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y el estado de salud general del paciente, otros medicamentos con los que se está tratando al paciente, la vía y forma de administración y las preferencias y experiencia del practicante médico involucrado. Para la administración oral, una dosificación diaria comprendida 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 ha de ser apropiada en monoterapia y/o en terapia de
15 combinación. Una dosificación diaria en particular oscila 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 0,01 y aproximadamente 0,6 g por día, y más preferentemente 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
20 tratamiento se inicia con una "dosis de carga" inicial elevada para reducir o eliminar rápidamente el virus seguido de una disminución de la dosis a un nivel suficiente para evitar la reaparición de la infección. Un experto en el tratamiento de las enfermedades descritas en el presente documento será capaz de establecer, sin experimentación excesiva y en función de su conocimiento, experiencia y las divulgaciones de la presente solicitud, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto divulgado en el presente documento para una enfermedad y un paciente
25 dados.

La eficacia terapéutica puede determinarse a partir de ensayos de la función hepática, incluyendo, entre otros, niveles proteicos, tales como proteínas séricas (p. ej., albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (p. ej., alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, γ -glutamiltansaminasa, etc.), síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol y síntesis de ácidos biliares; una función
30 metabólica hepática, incluyendo, entre otros, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y de amoníaco. Alternativamente, la eficacia terapéutica puede controlarse por medición de ARN de VHC. Los resultados de estos ensayos permitirán que se optimice la dosis.

35 Se divulga un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto en necesidad del mismo, en el que dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por cualquiera de los compuestos 4, R_p -4, o S_p -4 y una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente antiviral; en el que la administración es simultánea o alternativa. Queda entendido que el tiempo entre la administración alternativa puede oscilar entre 1-24 horas, que incluye cualquier subintervalo intermedio que incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
40 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, y 23 horas.

Ejemplos de "otro agente antiviral" incluyen, entre otros: inhibidores de la proteasa NS3 del VHC (véase los documentos 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 NS5B del VHC (véase los documentos US 2004229840, US 2005154056, US 2005-98125, US 20060194749, US 20060241064, US 20060293306, US 2006040890, US 2006040927, US 2006166964, US 2007275947, US 6784166, US20072759300, 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 WO2007095269); inhibidores NS4 del VHC (véase los documentos WO 2005067900 y WO 2007070556); inhibidores NS5a del VHC (véase los documentos US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251 y WO 2006120252); agonistas del receptor tipo
55 Toll (véase el documento WO 2007093901); y otros inhibidores (véase los documentos WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852 y WO 2004035571); y compuestos divulgados en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 12/053.015, presentada el 21 de marzo de 2008 (documento US 2010/0016251), interferón- α , interferón- β , interferón- α pegilado, ribavirina, levovirina, viramidina, otro inhibidor nucleósido de la polimerasa de VHC, inhibidor no nucleósido de la polimerasa de VHC, inhibidor de la proteasa de
60 VHC, inhibidor de la helicasa de VHC o inhibidor de fusión de VHC.

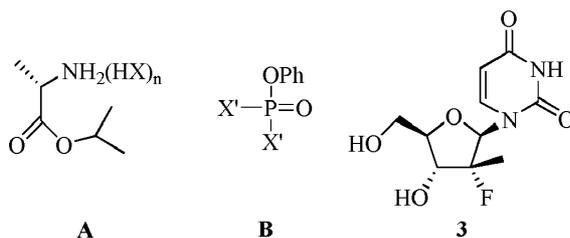
Cuando cualquiera de los compuestos 4, R_p -4, o S_p -4 se administra en combinación con otro agente antiviral, la actividad puede aumentar con respecto al compuesto original. Cuando el tratamiento es una terapia de combinación, dicha administración puede ser simultánea o secuencial con respecto a la de los derivados de nucleósido.
65 "Administración simultánea" como se utiliza en el presente documento incluye por consecuencia la administración de los agentes al mismo tiempo o en momentos diferentes. La administración de dos o más agentes al mismo tiempo

puede conseguirse mediante una formulación única que contiene dos o más principios activos o mediante la administración básicamente simultánea de dos o más formas de dosificación con un único agente activo.

- 5 Se entenderá que las referencias en el presente documento con respecto al tratamiento se extienden a la profilaxis así como al tratamiento de las afecciones existentes. Es más, el término "tratamiento" de una infección por VHC, como se utiliza en el presente documento, también incluye el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o una afección asociada o mediada por la infección por VHC, o los síntomas clínicos de la misma.

10 *Preparación*

La presente invención proporciona un proceso para preparar **4**, o un diastereómero a base de fósforo del mismo (R_P -**4** o S_P -**4**), que comprende: a) hacer reaccionar un alanato de isopropilo, **A**, un di- X' -fenilfosfato, **B**, 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende **4**, o el diastereómero a base de fósforo del mismo;



- 15 en la que X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y X' es un halógeno; b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto protector para obtener una segunda mezcla que comprende **4**, o el diastereómero a base de fósforo del mismo, en la que el compuesto protector se selecciona de entre un compuesto protector t-butildimetilsililo y un compuesto protector dimetoxitrietilmetilo; y c) someter opcionalmente la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción con el fin de obtener **4**, o el diastereómero a base de fósforo del mismo.
- 20

De acuerdo con una realización, el alanato de isopropilo está presente como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente anhidra.

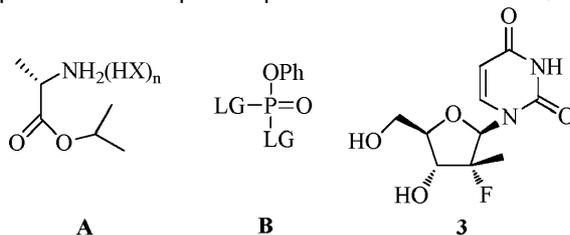
- 25 De acuerdo con una realización, la base es N-metilimidazol.

De acuerdo con una realización, la relación molar de A con respecto a B con respecto a 3 es 1,6 con respecto a 1,3 con respecto a 1.

- 30 De acuerdo con una realización, el compuesto protector es cloruro de t-butildimetilsililo.

También se desvela en el presente documento un proceso para preparar S_P -**4** o R_P -**4**, que comprende:

- 35 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) someter opcionalmente la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción con el fin de obtener S_P -**4** o R_P -**4** purificados.
- 40

Un proceso para preparar R_P -**4** puede incluir adicionalmente purificar además puede la segunda mezcla o el R_P -**4** purificado disolviendo o suspendiendo la segunda mezcla o la mezcla de R_P -**4** purificado en un disolvente; opcionalmente seguido de siembra con R_P -**4** cristalino; y añadir suficiente anti-disolvente para obtener R_P -**4** cristalino.

45

Un proceso para preparar S_P -**4** puede incluir adicionalmente purificar además la segunda mezcla o el S_P -**4** purificado d) disolviendo o suspendiendo 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; recoger un primer sólido cuya mayor parte comprende S_P -**4**; disolver el primer sólido en un disolvente a su temperatura de reflujo; y enfriar o añadir un anti-disolvente para obtener un segundo sólido.

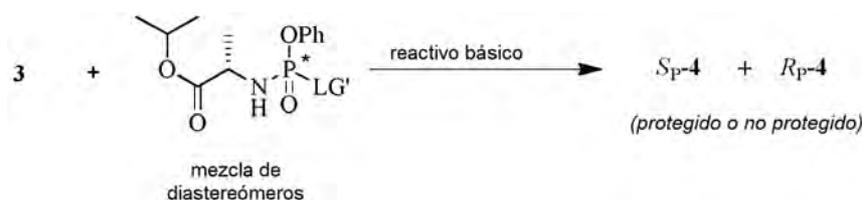
50

Un proceso para la preparación de S_{P-4} puede incluir adicionalmente purificar además S_{P-4} d) disolviendo o suspendiendo la segunda mezcla o la mezcla de S_{P-4} purificado en un primer disolvente seguido de añadir un anti-disolvente para obtener una primera composición en la que el disolvente/anti-disolvente residual se elimina por decantación para obtener un residuo; tratar el residuo con una solución que contiene el primer disolvente y anti-disolvente para producir una segunda composición por lo que tras reducir la presión produce un primer sólido; disolver o suspender el primer sólido usando un segundo disolvente para obtener una tercera composición; añadir cristales de siembra de S_{P-4} a la tercera composición; recoger un segundo sólido; disolver o suspender el segundo sólido en un tercer disolvente, opcionalmente calentado a la temperatura de reflujo del tercer disolvente para obtener una cuarta composición, y, si es necesario, enfriar la cuarta composición para obtener un tercer sólido que comprende S_{P-4} que se recoge por filtración.

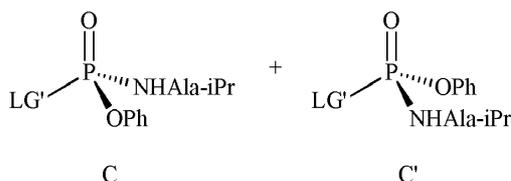
En un proceso para la preparación de S_{P-4} , S_{P-4} puede purificarse adicionalmente a partir de la segunda mezcla o el S_{P-4} purificado d) añadiendo gel de sílice a la segunda mezcla o el S_{P-4} purificado seguido de evaporación del disolvente para proporcionar una suspensión seca; agitar la suspensión seca en una primera combinación de disolvente/anti-disolvente para obtener una primera suspensión húmeda; decantar la primera combinación de disolvente/anti-disolvente de la primera suspensión húmeda para obtener una segunda suspensión húmeda y una primera composición; añadir a la segunda suspensión húmeda una segunda combinación de disolvente/anti-disolvente seguido de agitación; decantar la segunda combinación de disolvente/anti-disolvente de la segunda suspensión húmeda para obtener una tercera suspensión húmeda y una segunda composición; repetir opcionalmente las etapas g)-h) en la tercera suspensión húmeda o suspensiones húmedas adicionales; evaporar el disolvente de la segunda composición, y opcionalmente cualquier composición adicional obtenida de la etapa opcional i) para obtener un primer sólido; disolver o suspender el primer sólido en una solución que contiene un tercer disolvente y opcionalmente un cuarto disolvente para obtener una tercera composición; añadir opcionalmente cristales de siembra de S_{P-4} a la tercera composición; obtener de la tercera composición un segundo sólido que comprende S_{P-4} ; y recrystalizar opcionalmente el segundo sólido usando un tercer disolvente para obtener un tercer sólido que comprende S_{P-4} .

Un experto apreciará que los compuestos pueden separarse por extracción tradicional, cristalización tradicional, o técnicas cromatográficas tradicionales. Las técnicas cromatográficas tradicionales incluyen, pero sin limitación, cromatografía sobre gel de sílice (usando, por ejemplo, metanol al 3-5 % en DCM o isopropanol al 4-6 % en DCM) para producir niveles mejorados de un isómero (50-100 %) y después cristalizarlo. Como alternativa, se puede usar cromatografía de fase inversa (usando, por ejemplo, fase móvil acuosa de acetonitrilo al 1-30 %). Además, los compuestos pueden aislarse por cromatografía de fluidos supercríticos SFC sobre dióxido de carbono como el disolvente principal y alcoholes tal como metanol como un modificador, usando preferiblemente el medio quiral apropiado, tal como Daicel Chiralpack IA. Como alternativa, puede emplearse cromatografía SMB usando el medio quiral apropiado, tal como, Daicel ChiralPack IA, usando una mezcla de disolventes tal como hexanos/isopropanol o disolventes individuales, tal como acetato de etilo.

También se desvela en el presente documento un proceso para preparar S_{P-4} , que comprende: a) hacer reaccionar un alanil-fosforamidato de isopropilo con un 3 3'-O-protégido o no protegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende S_{P-4} protegido o no protegido



en la que el alanil-fosforamidato de isopropilo está compuesto por una mezcla de diastereómeros representada por las siguientes estructuras:



en las que la relación de C:C' es de aproximadamente 1:1.

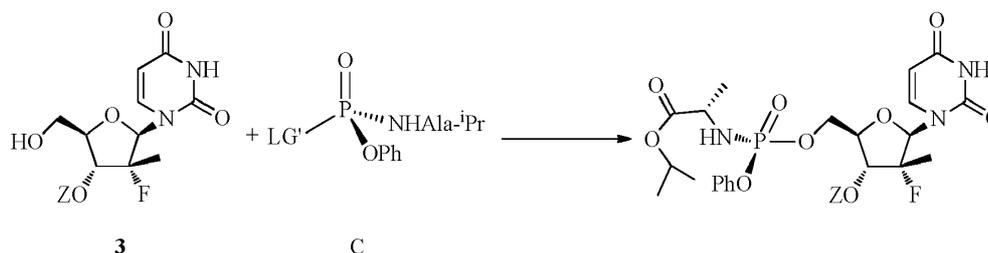
El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la relación de C:C' puede ser mayor de o igual a aproximadamente 1:1.

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

5 El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la relación 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.

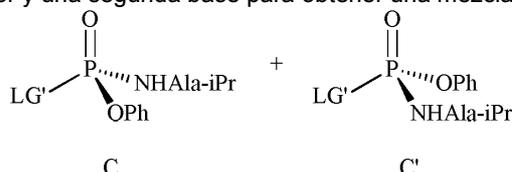
10 LG' puede ser p-nitrofenóxido, el reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio, y la relación de **C:C'** puede ser al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente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

15 Se desvela un proceso adicional para preparar **S_P-4**, y comprende: a) hacer reaccionar un alanil-fosforamidato de isopropilo (**C**) con un **3** 3'-O-protégido o no protegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende **S_P-4** protegido o no protegido



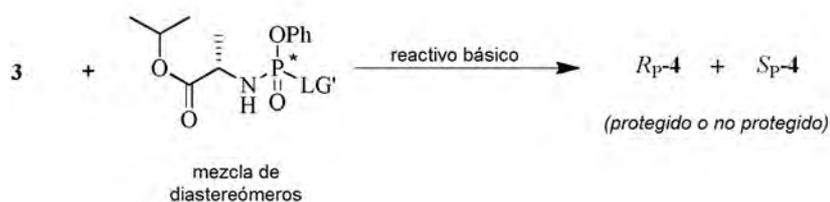
20 en la que Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo saliente; y b) someter opcionalmente el **S_P-4** protegido o no protegido obtenido a cromatografía, extracción o cristalización para obtener **S_P-4** purificado protegido o no protegido. LG' puede ser tosilato, canforsulfonato, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo aceptor de electrones; más preferiblemente, LG' puede seleccionarse de entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido y pentafluorofenóxido. Cuando **S_P-4** está protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso puede incluir adicionalmente desproteger el **S_P-4** protegido. La reacción puede realizarse en un disolvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano u otro disolvente etéreo ya sea en solitario o en combinación entre sí o con un nitrilo **C₂** a **C₇**, tal como acetonitrilo.

30 El proceso puede comprender adicionalmente 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)(Ala-iPr) seguido de hacer reaccionar (LG')P(O)(LG)(Ala-iPr) 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 una base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**; o
35 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)(Ala-iPr) seguido de hacer reaccionar (PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr) con un grupo saliente precursor y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,



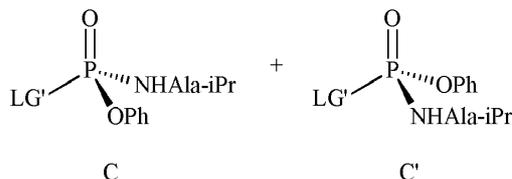
40 y someter la mezcla a cromatografía o cristalización de la mezcla para obtener **C**. El alanato de isopropilo puede estar presente como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente sustancialmente anhidra.

Se desvela un proceso adicional para preparar **R_P-4**, que comprende: a) hacer reaccionar un alanil-fosforamidato de isopropilo con un **3** 3'-O-protégido o no protegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende **R_P-4** protegido o no protegido



45

en la que el alanil-fosforamidato de isopropilo está compuesto por una mezcla de diastereómeros representada por las siguientes estructuras:



en las que la relación de **C'**:**C** es de aproximadamente 1:1.

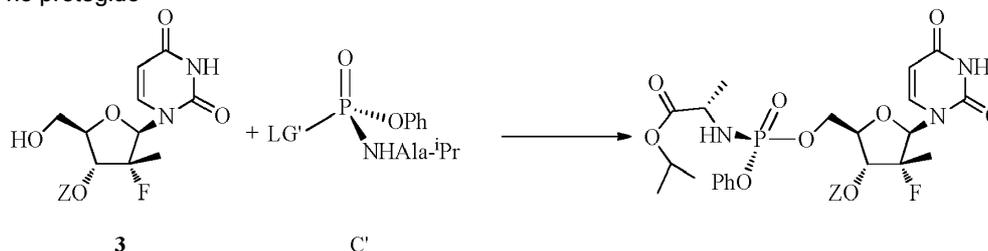
5 El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C'**:**C** puede ser mayor de o igual a aproximadamente 1:1.

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

El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la relación 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.

15 LG' puede ser p-nitrofenóxido, el reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio, y la relación 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.

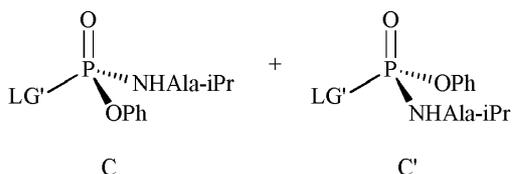
20 Un método adicional para preparar *R_P-4* comprende: a) hacer reaccionar un alanil-fosforamidato de isopropilo (**C'**) con un **3** 3'-O-protegido o no protegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende *R_P-4* protegido o no protegido



25 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 no protegido obtenido a cromatografía, extracción o cristalización para obtener *R_P-4* purificado protegido o no protegido, LG' puede ser tosilato, canforsulfonato, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo aceptor de electrones; más preferiblemente, LG' puede seleccionarse de entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido y pentafluorofenóxido. Cuando *R_P-4* está protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso puede incluir adicionalmente desproteger el *R_P-4* protegido. La reacción puede realizarse en un disolvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano u otro disolvente etéreo ya sea en solitario o en combinación entre sí o con un nitrilo C_2 a C_7 , tal como acetonitrilo.

35 El proceso puede comprender adicionalmente 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 $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido de hacer reaccionar $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ 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 una base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**; o

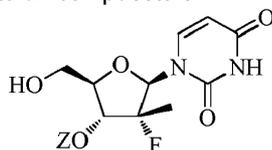
40 2) hacer reaccionar $(PhO)P(O)(LG)_2$, en la que LG', independiente de LG, es un grupo saliente, con (i) alanato de isopropilo y una primera base para obtener $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido de hacer reaccionar $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ con un grupo saliente precursor y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,



45 y someter la mezcla a cromatografía o cristalizar la mezcla para obtener **C'**. El alanato de isopropilo puede estar presente como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente sustancialmente anhidra.

También se desvela en el presente documento una composición obtenida por los procesos que se han mencionado anteriormente. También se desvela en el presente documento una composición obtenida por una cualquiera de las realizaciones ilustradas analizadas a continuación. La composición obtenida de este modo puede ser cristalina, de tipo cristal, amorfa, o una combinación de los mismos.

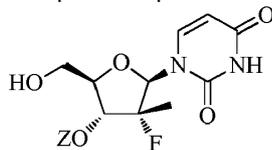
- 5 También se desvela en el presente documento un compuesto **3**



3

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

- 10 El compuesto **3** puede seleccionarse de entre compuestos que tienen las siguientes estructuras



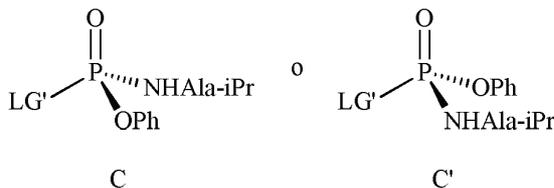
3a: Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃

3b: Z = -C(O)OCH₂Ph

3c: Z = -Si(Me)₂^tBu

- 15 **3d:** Z = -Si(^tPr)₂OSi(^tPr)₂OH

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



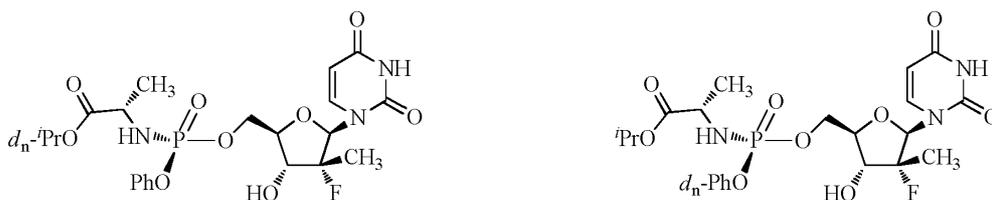
- 20

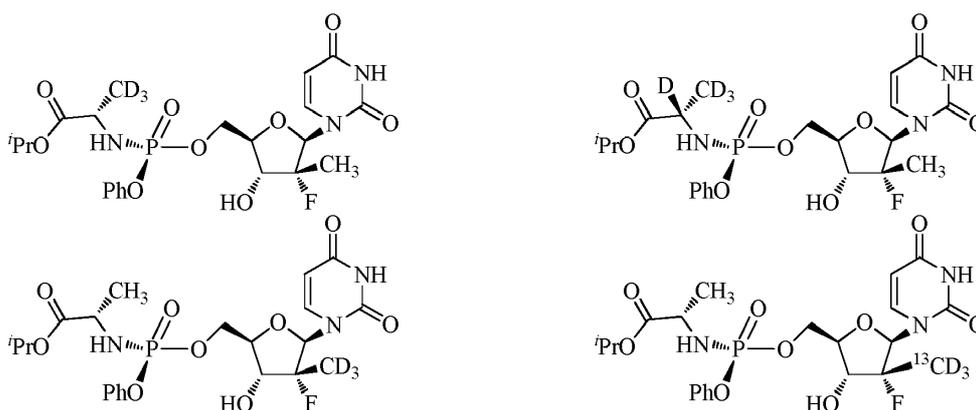
donde LG' es un grupo saliente, que es útil para la preparación de *R_P-4* o *S_P-4*.

- 25 LG' puede ser tosilato, canforsulfonato, un arilóxido, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo aceptor de electrones.

LG' puede seleccionarse de entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido y pentafluorofenóxido.

- 30 También se desvela en el presente documento un análogo marcado con isótopos de *R_P-4* o *S_P-4*. La expresión análogo "marcado con isótopos" se refiere a un análogo de *R_P-4* o *S_P-4* que es un "análogo deuterado", un "análogo marcado con ¹³C", o un "análogo deuterado/marcado con ¹³C". La expresión "análogo deuterado" significa un compuesto descrito en el presente documento, por lo que un isótopo ¹H, es decir, hidrógeno (H), está sustituido con un isótopo ²H, es decir, deuterio (D). La sustitución de deuterio puede ser parcial o completa. La sustitución de 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*, un experto puede contemplar al menos los siguientes análogos deuterados parciales (donde "d_n" representa n número de átomos de deuterio, tal como, para un grupo n = 1-7, mientras que para un grupo fenilo, n = 1-5), así como los representados a continuación.





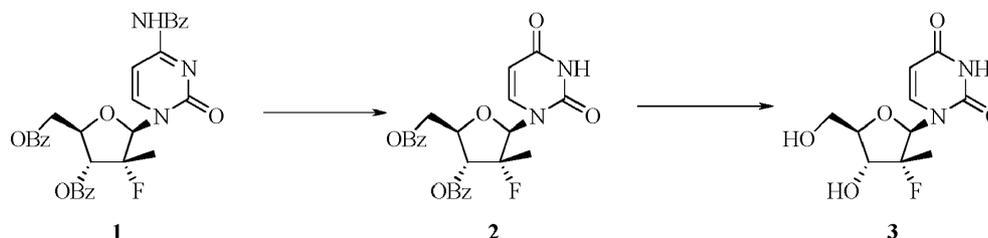
Aunque los grupos metilo que se han representado anteriormente se muestran como completamente deuterados, se reconocerá que también son posibles variaciones deuteradas parciales, tales como $-CDH_2$ y $-CD_2H$. También se contemplan etiquetas isotópicas en la furanosa y la base. De forma análoga, las expresiones "análogo marcado con ^{13}C " y "análogo deuterado/marcado con ^{13}C " se refiere a un compuesto descrito en el presente documento, por lo que el átomo de carbono se enriquece con un isótopo ^{13}C lo que significa que la extensión de enriquecimiento excede la abundancia natural habitual de aproximadamente el 1,1 %.

Ejemplos

Sin limitarse a modo de ejemplo, los siguientes ejemplos sirven para facilitar un mejor entendimiento de la divulgación.

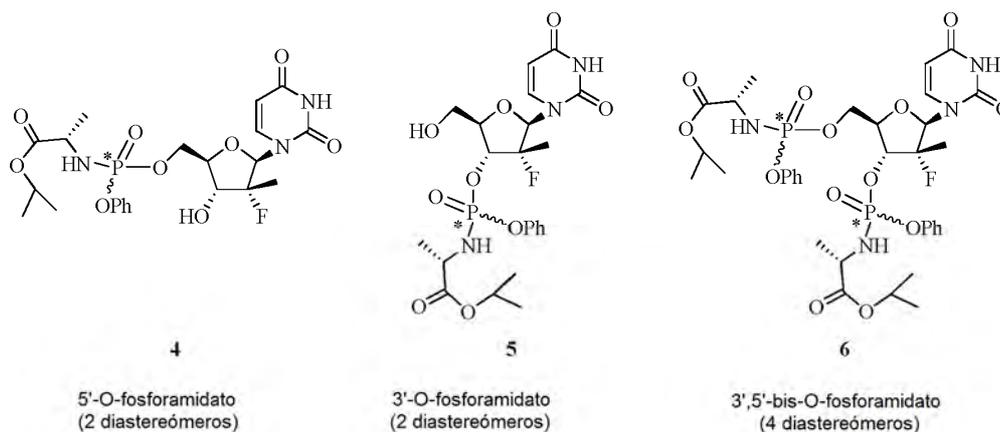
Aspectos de la síntesis

Para preparar el nucleósido de uridina, se puede aprovechar un intermedio de citidina tribenzoilada avanzado en la síntesis de ciertos análogos 3',5'-diacilados de 3 (véase a continuación) ya producidos eficientemente a una escala de planta piloto (véase el documento WO 2006/031725 o el documento US 2006/0122146). Se descubrió que el siguiente método era escalable y rentable.



Se obtiene 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina (1) mediante un método desvelado en los documentos WO 2006/031725 y WO 2008/045419. 1 se trata con ácido acético acuoso al 70 % para formar 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (2). Los benzoil ésteres pueden hidrolizarse en varios métodos también, por ejemplo, alcóxidos en disolvente alcohólico, tal como metóxido sódico en metanol, carbonato potásico en metanol, o análogos de etanol, alquilaminas tal como metilamina en metanol, butilamina, etc. Se escoge amoniaco metanólico para el trabajo a mayor escala. El producto uridina (3) puede purificarse por cristalización para proporcionar un rendimiento del 70 % en la citidina tribenzoilada (1).

Numerosos procedimientos bibliográficos detallan diferentes rutas y condiciones para preparar fosoramidatos usando equivalentes en varias veces de reactivos. Véanse, por ejemplo, McGuigan y col. J. Med. Chem. 2005, 48, 3504-3515 y McGuigan y col. J. Med. Chem. 2006, 49, 7215. Para un trabajo a escala de proceso, existe únicamente un ejemplo conocido en la actualidad, que se desvela en Lehsten y col., Org. Process Res. Dev. 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). En esta referencia, los autores introducen el concepto de un "procedimiento de una etapa" en el que una sal clorhidrato de aminoácido y diclorofosfato de fenilo se hacen reaccionar junto con N-metilimidazol en diclorometano. Más tarde, el nucleósido se añade para formar el producto de 5'-O-fosoramidato deseado, que en el presente caso proporcionará un compuesto representado por la fórmula 4. Desafortunadamente, el procedimiento de Lehsten tenía algunos inconvenientes. Por ejemplo, el procedimiento de Lehsten utilizó un exceso mucho mayor de reactivos del que fue necesario, lo que se añadió al coste y la dificultad de la purificación cromatográfica. Además, Lehsten sugirió que se puede controlar la selectividad de la reacción en el 5'-hidroxilo sobre el 3'-hidroxilo en comparación con una referencia bibliográfica a través del uso de temperaturas inferiores y una adición lenta del nucleósido.



Usando el procedimiento de Lehsten para los compuestos desvelados en el presente documento proporcionó aproximadamente el 1-5 % de diastereómeros de 3'-O-fosforamidato mono-sustituido (**5**) y aproximadamente el 10-30 % del producto bis-sustituido (**6**). Dado que la polaridad de los 3'-diastereómeros fue muy similar a los 5'-diastereómeros deseados (**4**), la separación cromatográfica fue un gran desafío. La expansión del proceso fue casi imposible sin descartar una porción sustancial de los 5'-diastereómeros menos polares (**4**) o aceptar un mayor nivel de contaminación de los 3'-diastereómeros (**5**). En un aumento de 50 g inicial, el producto resultante contenía una contaminación del 3'-diastereómero (**5**) de aproximadamente un 3 %, que co-eluyó con el menos polar del 5'-diastereómero (**4**).

Se desvelan en el presente documento condiciones de reacción que usan menos cantidades de reactivos y un método para eliminar selectivamente la impureza de los diastereómeros 3'-O-fosforamidato (**5**) con una separación cromatográfica más fácil, proporcionando de este modo los diastereómeros 5'-O-fosforamidato deseados con una pureza mucho mayor (**4**).

Para la estequiometría del reactivo, se hizo un estudio en el que la estequiometría de los reactivos se cambió sistemáticamente y los resultados se controlaron por RMN de fósforo de la reacción en bruto según Lehsten había indicado. En las realizaciones más exitosas, el rendimiento aislado y la pureza del producto deseado se compararon. Se observó que el 5'-hidroxilo primario reacciona a una velocidad más rápida que el 3'-hidroxilo secundario. Esto crea una situación competente entre el progreso de reacción del consumo de todo el nucleósido de partida y la conversión de los productos 5'- y 3'-monosustituidos (**4** y **5**) en los productos 5',3'-bis sustituidos (**6**). El producto 3'-monosustituido se convierte en el producto bis a una velocidad más rápida que el producto 5'-monosustituido, por lo que es posible reducir el nivel de contaminación del 3'-diastereómero empujando la reacción más a los productos bis-sustituidos. Sin embargo, con un modo eficaz para retirar los 3'-diastereómeros, la reacción puede optimizarse para producir más del 5'-diastereómero deseado sin tener que sacrificar gran parte del 5'-diastereómero que se convierte en el (**6**) bis-sustituido. También se observó que el clorhidrato de aminoácido es muy higroscópico. Dado que cualquier agua presente consumirá una cantidad equivalente del reactivo de diclorofosfato de fenilo, ha de tenerse cuidado para mantener el aminoácido sustancialmente anhidro o debería hacerse sustancialmente anhidro antes de su uso. En resumen, Lehsten ha indicado que la relación óptima de aminoácido con respecto a diclorofosfato de fenilo con respecto a nucleósido fue de 3,5:2,5:1, respectivamente. Se descubrió que la relación óptima de aminoácido con respecto a diclorofosfato de fenilo con respecto a nucleósido de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1 es óptima en condiciones en las que el 3'-diastereómero puede eliminarse eficientemente y cuando el clorhidrato de aminoácido es sustancialmente anhidro. Usando una cantidad menor de los reactivos, se consiguen ahorros en el coste junto con una simplificación de la separación cromatográfica del producto deseado de los subproductos de reactivo y del nivel reducido de bis diastereómeros.

En un procedimiento alternativo, un derivado 3'-hidroxi-bloqueado de **3** se preparó usando un grupo de bloqueo de t-butildimetilsililo en dos etapas. Después, éste se convirtió en su derivado 5'-fosforamidato. El deseo es que el grupo sililo puede entonces eliminarse y no habría ningún 3' isómero (**5**) o 3',5'-bis fosforamidato (**6**). Se demostró un procedimiento similar por Borch y Fries (patente de Estados Unidos 5.233.031) con un rendimiento general bajo en un fosforamidato de alquilo.

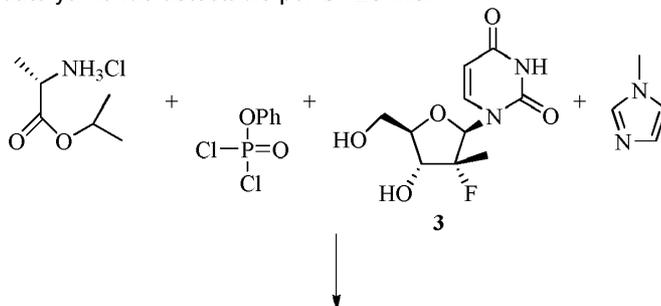
Otro procedimiento alternativo fue usar la síntesis directa y después usar la química para facilitar la diferenciación de las impurezas de 3'-diastereómero **5** de los 5'-diastereómeros deseados **4** para facilitar la separación. Se deseó que un grupo reaccionara selectivamente con el hidroxilo primario libre de la impureza de 3'-O-fosforamidato **5** sobre el hidroxilo secundario libre del 5'-O-fosforamidato deseado **4**. También se deseó que el grupo de bloqueo cambiase significativamente la polaridad del producto 3'-O-fosforamidato 5'-O-bloqueado resultante del 5'-O-fosforamidato deseado **4**. No sería necesaria ninguna etapa adicional para eliminar el grupo de bloqueo ya que los 5'-diastereómeros deseados **4** no se cambiarían. Los 3'-diastereómeros químicamente alterados permitirán entonces una separación cromatográfica más fácil o una separación por soportes de barrido especiales o mediante

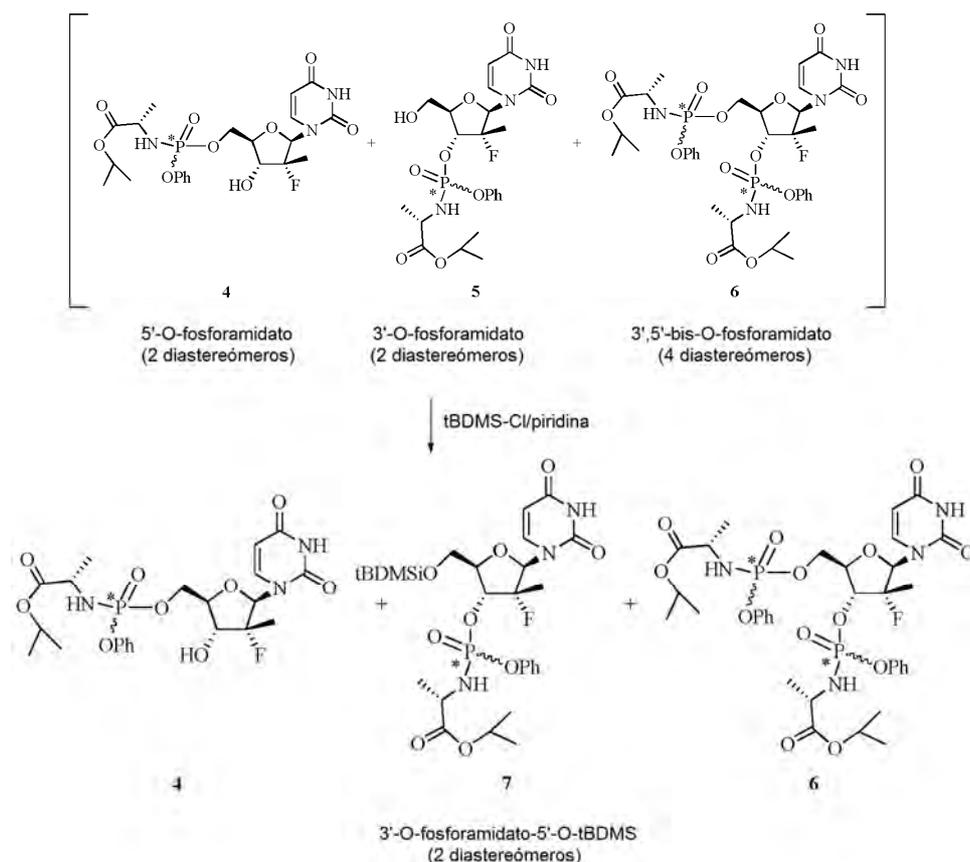
extracciones.

Específicamente, el grupo de bloqueo terc-butildimetilsililo (tBDMS) cumplió estos criterios y fue el primero en demostrarse y usarse posteriormente a una 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 sobre la posición del hidroxilo secundario 3'. La reacción de fosforamidato usa N-metilimidazol (NMI) como base. En presencia de NMI, la sililación es menos selectiva. Preferiblemente, la cantidad de NMI debería reducirse. Esto puede realizarse fácilmente después de la reacción de fosforamidato lavando la solución de reacción con ácido clorhídrico 1 N. El NMI y el nucleósido de partida restante se eliminan, dejando una mezcla en bruto de productos mono y bis sustituidos y subproductos de reactivo. Después, esto se disuelve en piridina y se trata con cloruro de terc-butildimetilsililo. El producto 3'-monosustituido **5** se convierte en algunas horas o en el 5'-O-tBDMS-3'-O-fosforamidato **7**. El avance de la reacción puede controlarse por HPLC. La polaridad de este producto sililado **7** es menor que el bis-fosforamidato **6** y se elimina fácilmente por cromatografía. Usando este método, fue posible reducir el nivel de 3'-monofosforamidato **5** a menos del 0,1 % del producto 5' **4** en comparación con el 1-3 % sin el tratamiento sililo. De forma análoga, el tratamiento con cloruro de dimetoxitriphenilmetilo (DMT-Cl) en las mismas condiciones funcionó igual de bien. También fue más fácil identificar el producto de reacción DMT por TLC como DMT que contiene tinción de moléculas de color naranja brillante en calentamiento o exposición a ácido.

Tanto las condiciones de reacción como el arrastre de la impureza 3' son métodos generales y pueden aplicarse a la mayor parte de fosforamidatos de nucleósido con un hidroxilo 3' libre. El resto fosforamidato puede ser cualquier combinación de éster de aminoácido y alcohol aromático. El resto nucleósido puede ser cualquier nucleósido en el que un 5' fosforamidato conducirá a un 5'-monofosfato y puede metabolizarse adicionalmente en la forma 5'-trifosfato.

El siguiente esquema es el esquema de reacción principal ilustrado haciendo isopropil L-alanato fenil fosforamidato de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina con el producto principal como el 5'-O-fosforamidato deseado (**4**, dos diastereómeros) y el producto secundario como el 3'-O-fosforamidato (**5**, dos diastereómeros) y el 3',5'-bis-O-fosforamidato (**6**, cuatro diastereómeros). Los reactivos se añaden en las relaciones estequiométricas como se describe en el método de la sección de preparación. La reacción se deja avanzar hasta que queda aproximadamente un 5 % del material de partida según se determina por visualización UV sobre cromatografía de capa fina (TLC). Además, UPLC/MS mostró que se ha formado aproximadamente el 10 % del 3',5' bis-fosforamidato **6** en comparación en el producto 5' deseado. Después de la inactivación y el tratamiento acuoso ácido, el residuo en bruto de la capa orgánica se preparó para la sililación. En las condiciones de reacción descritas, el grupo sililo reaccionó preferiblemente con el 5'-hidroxilo libre del 3'-O-fosforamidato para formar **7**. La reacción se continuó hasta que el 3'-O-fosforamidato ya no fue detectable por UPLC/MS.





Después del tratamiento 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'-monofosforamidata deseado **4** se eluye en último lugar.

Método de preparación

Ejemplo de referencia 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 acuoso al 70 % (7,5 l). La solución se calentó a reflujo (110 °C) durante 20 h. El análisis por TLC indicó una reacción completa (Fr 0,6 en metanol al 5 % en diclorometano (DCM)). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (2 l). Después de agitar 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 intermedio de dibenzoiluridina se usó directamente en la siguiente etapa añadiéndolo a amoniaco metanólico recién preparado (5,4 l, aprox. 25 %) a 0 °C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 h y después se dejó calentar a 15 °C durante 24 h. El análisis por TLC indicó una reacción completa (Fr 0,4 en metanol al 10 % 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 en 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 el 98,7 % de pureza HPLC. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 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-MS M-1 259.

Ejemplo 2. Preparación de éster isopropílico 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-tetrahydro-furan-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**4**)

Sinónimo: Mezcla diastereomérica de 5'-O-(Isopropil-L-alanato, fenil fosforamidil)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina.

Un matraz de 3 bocas de 5 l se equipó con un agitador mecánico y baño de hielo de salmuera, un termómetro interno y una atmósfera de nitrógeno. El matraz se cargó con clorhidrato de L-alanina isopropil éster (82,0 g, 0,490 mol) y diclorometano anhidro (0,80 l). Mientras que esto se agitaba, se añadió en un lote diclorofosfato de

fenilo (85,0 g, 0,40 mol) y se agitó. Mientras que se mantenía la temperatura interna entre -5 a 5 °C, se añadió una solución de N-metilimidazol (NMI, 250 g, 3,07 mol) en diclorometano (250 ml) durante un periodo de media hora. La solución se dejó en agitación durante 1 h en este intervalo de temperatura. Se añadió en una porción 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (3, 80,0 g, 0,307 mol) a 0 °C y después el matraz de reacción se dejó calentar lentamente en el baño de salmuera. En 1 h, la temperatura interna fue de hasta -2 °C. El análisis por TLC (Metanol al 5 % en DCM) en 1 h mostró que se había consumido más del 50 % del nucleósido. El baño se retiró y el matraz de reacción alcanzó la temperatura ambiente durante 1 h más. El análisis por TLC después de 3 h y en 5 h en total mostró que el 95 % del nucleósido de partida se había consumido. La mezcla de reacción se inactivó añadiendo metanol (100 ml) y agitando la reacción durante 5 minutos.

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

Al producto en bruto se le añadió piridina anhidra (1700 ml). El disolvente se evaporó a presión reducida y después a alto vacío para reducir el contenido de agua de la mezcla en bruto a través de co-evaporación. El aceite resultante se disolvió de nuevo en piridina anhidra (500 ml) y después se añadió exceso de cloruro de t-butildimetilsililo (9,0 g, 60 mM). La reacción se agitó a temperatura ambiente. El avance de la reacción se controló por UPLC/MS. Después de 3 horas, la impureza 3' 5' ya no se detectó y la reacción se interrumpió mediante la 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 una solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 500 ml). La capa 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 pálido.

El aceite en bruto se diluyó con el mismo volumen de diclorometano y se cargó sobre un cartucho de 2,5 kg de gel de sílice en un módulo de compresión radial a 100 psi (0,69 MPa) de presión de aire. Usando una bomba de gradiente a 60 psi (0,41 MPa) y un caudal de 400 ml/min, el cartucho se lavó con cloruro de metileno (4 l) seguido de un gradiente de metanol al 1-4 % en cloruro de metileno (48 l). La mayor parte 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 3 y el 4 % de metanol. Las fracciones que contenían el producto se clasificaron en dos lotes. El primero contenía pequeñas cantidades de impurezas superiores y el último era producto puro. El primer conjunto de fracciones contenía pequeñas cantidades de impurezas menos polares (impurezas superiores) tal como el 3',5'-bis fosforamidato y el fosfato de di-alanilfenilo y una sobre todo el diastereómero R_p y requirió una segunda purificación en columna. (La terminología relativa, superior frente a inferior se refiere a la elución sobre cromatografía en gel de sílice de fase normal, donde el "isómero superior" se refiere al primer isómero de elución). El segundo conjunto de fracciones no tenía una cantidad significativa de impurezas -solo el R_p restante y sobre todo los diastereómeros S_p. Se combinó más tarde con las fracciones en columnas de dos veces. El disolvente se evaporó a presión reducida y la espuma de color blanco resultante se secó adicionalmente (0,20 mmHg) durante 1 h para dar 42 g del lote impuro (isómero 4:1 superior frente a inferior basado en ³¹P-RMN) y 38 g del lote puro (isómero 1:3 superior frente a inferior). El lote impuro se volvió a someter a columna de una manera similar para dar 3,8 g de isómero superior puro al 97 % (fracción reservada) y 36 g de producto puro en una relación 4:1. Los dos lotes principales se disolvieron en DCM, se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se secaron (50 °C, 0,2 mmHg, 24 h) para obtener 74 g (45,7 %) de producto puro 4 con una relación diastereomérica de 48: 51, en forma de una espuma de color blanco, p.f. aproximadamente 75-85 °C.

Para producir un sólido amorfo de la mezcla diastereomérica, 74 g de la espuma de color blanco se agitaron con t-butil metil 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 mayor parte 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 mmHg, 24 h) para dar un polvo amorfo de color blanco (64 g) con un amplio intervalo de fusión de aprox. 70-80 °C. ¹H y ³¹P RMN se conformaron para estructurar y el análisis por HPLC mostró una pureza del 99,8 % con una relación diastereomérica de 46:54 (también confirmada por ³¹P RMN).

Método alternativo para preparar la mezcla sólida de 4. Después de la cromatografía, el residuo se co-evaporó 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 una pantalla de 250 micrómetros y se secó adicionalmente en las mismas condiciones hasta que el diclorometano residual cayó por debajo de 400 ppm según se midió por GC de espacio libre. 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): ¹H RMN (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, aromático), 7,23-7,14 (m, 6H, R_p/S_p, aromático), 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,

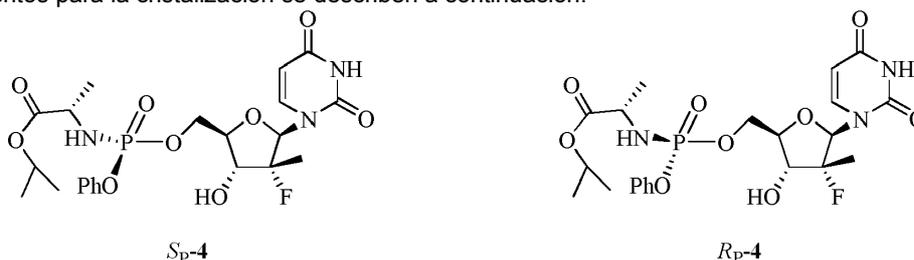
ala-NH, C3'-OH, R_P/S_P), 4,12 (m, 2 H, ala-CH-CH₃, R_P/S_P), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, R_P/S_P), 1,39-1,22 (m, 12H, todos CH₃, R_P/S_P).

- 5 ³¹P-RMN (CDCl₃) δ 3,60 (R_P), 3,20 S_P con respecto a trifenilfosfato a -17,80 ppm. ES-MS M+1 530,2. Análisis elemental: % calculado (incluyendo agua al 0,29 % como se descubrió por el análisis de Karl Fisher) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90, F, 3,58, P, 5,84. % observado: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Análisis sobre la separación de isómeros

- 10 El compuesto **4**, debido a la quiralidad en fósforo, está compuesto por dos diastereómeros, que se designan como S_P -**4** y R_P -**4**. La asignación estereoquímica se hizo basado en un análisis de rayos X monocristalino de S_P -**4**. Tanto R_P -**4** como S_P -**4** dieron un producto cristalino.

Los procedimientos para la cristalización se describen a continuación.



- Ejemplo 3.** Cristalización del isómero R_P -**4**. La fracción cromatografiada que contenía el primer isómero de elución menos polar R_P -**4** (3,8 g, puro al 97 %) se disolvió en isopropanol (36 g) y se diluyó con heptanos hasta turbidez (72 g). La solución se pipeteó 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) para dar 2,3 g de agujas de color blanco muy pequeñas p.f. 136,2-137,8 °C. Se descubrió que la pureza HPLC del material resultante era del 99,02 %.

- 20 R_P -**4**: ¹H RMN (CDCl₃) δ 9,10 (s a, 1H, NH), 7,36 (m, 2H, o-aromático), 7,26-7,16 (m, 4 H, C6-H, *m,p*-aromático), 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), 25 4,02-3,76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 1,37-1,20 (m, 12H, todos CH₃).

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

- Método 1: Precipitación directa de **4** en bruto: A una solución agitada de clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (10,5 g, 61,5 mmol, secado por destilación azeotrópica, dos veces, con 50 ml de tolueno cada vez) en diclorometano (100 ml) se le añadió fenildiclorofosfato (7,5 ml, 50 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -10 °C y después 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 la finalización de la adición, la mezcla se agitó entre -10 y -15 °C durante 1 h. A la mezcla anterior se le añadió en un lote 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**) (10 g, 38,4 mmol) y la mezcla se agitó por debajo de -10 °C durante 3 h y después se dejó calentar lentamente a 20 °C (6 h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante una noche (15 h) y después se inactivó con 10 ml de metanol. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió de nuevo en EtOAc (200 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua (100 ml), HCl 1 N (3 x 75 ml), una solución acuosa al 2 % de NaHCO₃ (50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se secó a 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 después se añadió 65 ml de IPE (éter isopropílico) para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de un lecho pequeño de Celite y el filtrado se agitó con semillas de S_P -**4** durante 72 h a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C -ha de apreciarse que enfriar la suspensión a 0 °C condujo a la lubricación 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 (-85:15 de mezcla de S_P -**4**: R_P -**4** respectivamente según se determinó por ³¹P RMN) de un polvo de color blanco. El sólido anterior se suspendió en 23 ml de DCM y después 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 a alto vacío a 45 °C para dar S_P -**4** puro, p.f. 93,9-104,7 °C, pureza HPLC al 99,74 % (3,11 g, 15,2 % del nucleósido de uridina).

- 50 S_P -**4** ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,63 (s a, 1H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, o-aromático), 7,26-7,18 (m, 3H, *m,p*-aromático), 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).

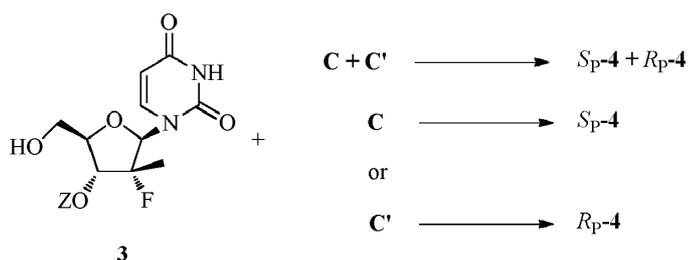
- 55 Método 2: Lubricación del **4** en bruto: A una solución agitada de clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (20,6 g, 123 mmol, secado por destilación azeotrópica, dos veces, con 75 ml de tolueno cada vez) en diclorometano (200 ml)

- se le añadió fenildiclorofosfato (14,9 ml, 100 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -10 °C y después se añadió una solución de NMI (61,3 ml, 769 mmol) en 60 ml de diclorometano durante un periodo de 30 min. Después de la finalización de la adición, la mezcla se agitó entre -10 °C y -15 °C durante 1 h. A la mezcla anterior se le añadió en un lote 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**) (20 g, 76,9 mmol) y la mezcla se agitó por debajo de -10 °C durante 3 h y después se dejó calentar lentamente a 20 °C (6 h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante una noche (15 h) y después se inactivó con 10 ml de metanol. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió de nuevo en EtOAc (400 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua (200 ml), HCl 1 N (3 x 100 ml), una solución acuosa al 2 % de NaHCO₃ (100 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se secó a 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 capa superior se decantó y el residuo se agitó de nuevo con 50 ml de soluciones 2:3 de EtOAc/heptano durante 10 min y después se decantó. El residuo se secó a alto vacío para dar una espuma de color blanco (31 g).
- 15 La espuma anterior se disolvió en 46 ml de DCM y después se añadieron 95 ml de IPE para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de un lecho pequeño 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 (-85:15 de mezcla de S_P-4:R_P-4 respectivamente según se determinó por ³¹P RMN) de polvo de color blanco. El sólido anterior se suspendió en 36 ml de DCM y después 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 a alto vacío a 45 °C para dar >99 % de S_P-4 puro (4,78 g, 11,6 % del nucleósido de uridina).

- Método 3: Carga de gel de sílice de **4** en bruto: Se produjeron 5,0 g de **4** en bruto de la misma manera que la mezcla de diastereómeros justo antes de la etapa de cromatografía en columna partiendo con aproximadamente 2,5 g de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**). El producto en bruto se disolvió en 10 ml de DCM y a la solución se le añadieron 10 g de gel de sílice. El disolvente se evaporó para dar una suspensión seca. La suspensión se agitó con 40 ml de EtOAc al 50 %/hexanos durante 15 min y después se filtró. El gel de sílice se lavó con 10 ml más de EtOAc al 50 %/hexanos. Después, el gel de sílice se lavó con MeOH al 15 %/DCM (100 ml) y se recogió por separado. El disolvente se evaporó y se secó a alto vacío para dar 4,0 g del residuo (espuma). El residuo se disolvió en DCM (6 ml) y después se añadieron ~9 ml de IPE para hacer una solución saturada. Después, 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. ³¹P RMN reveló que el producto anterior contenía 77:23 de mezcla de S_P-4:R_P-4 respectivamente. Esto se recrystalizó en 20 ml de DCM para obtener 0,75 g de >99 % de S_P-4 puro (aproximadamente 12 % del nucleósido de uridina). Esta preparación de S_P-4 no requiere la etapa de sililación como se hizo para la mezcla, por lo que todo el procedimiento de reacción se ha mostrado anteriormente. Los aspectos de las formas monocristalinas y polimórficas de S_P-4 se presentan a continuación.

- Método 4: Se disolvieron 40,0 g de mezcla 1:1 de **4** en 90 ml de diclorometano. Se añadió éter diisopropílico (70 ml) a la solución anterior para dar una solución saturada. (La cantidad de éter diisopropílico puede variar basándose en la pureza del producto). La solución se pipeteó con S_P-4 puro (>99 %) y la mezcla se agitó suavemente con una barra de agitación a temperatura ambiente durante 20 h (se observó la formación de sólido después de 2 h). El sólido se filtró, se lavó con 40 ml de la mezcla de éter diisopropílico/diclorometano (1:1) y se secó para dar un sólido de color blanco (16,6 g, 89,35 % de S_P-4 puro por 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 por HPLC). Se disolvieron de nuevo 11 g de este sólido en 330 ml de DCM en condiciones calientes. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se dejó 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 % por HPLC).

- 50 Como alternativa, los compuestos S_P-4 y R_P-4 pueden prepararse por un método desvelado en el presente documento y que no forma parte de la presente invención, haciendo reaccionar el nucleósido (protegido o no protegido) **3** con y alanil-fosforamidato de isopropilo (mezcla de **C** y **C'**, **C** o **C'**), como se muestra en la siguiente ecuación.

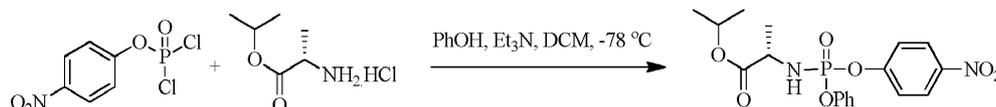


55

P.D. Howes y col. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2003, Vol. 22, n.º 5-8, págs. 687-689 ("Howes") desvelan 2'- y 5'-fosforamidatos obtenidos por una reacción con cloruro de t-butilmagnesio. Aquí, Howes desvela

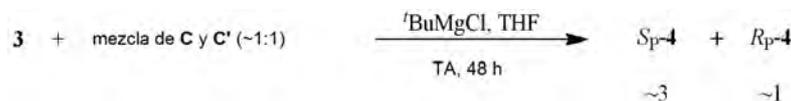
que cuando un nucleósido de 3'-desoxi-citidina se hace reaccionar con éster metílico del ácido (S)-2-[cloro-fenoxi-fosforilamino] propiónico en presencia de 1,2 equivalentes de cloruro de t-butilmagnesio, se produce una fosforilación selectiva en la posición 2', pero que con un equivalente adicional de cloruro de t-butilmagnesio se produce una fosforilación selectiva en la posición 5'. Esta divulgación debe contrastarse con la que se desvela en el Esquema 1.

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



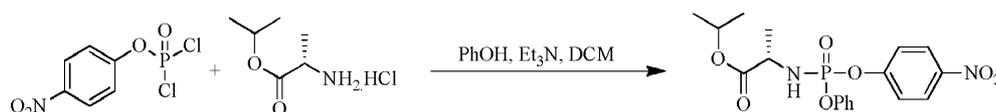
A una solución agitada de fosfordicloridato de 4-nitrofenilo (12,8 g, 50 mmol) en diclorometano (100 ml) se le añadió una solución de fenol y trietilamina (7,7 ml, 55 mmol) en diclorometano (100 ml) a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y después se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (8,38 g, 50 mmol) en diclorometano (100 ml) a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. A la mezcla se le añadió una segunda porción de trietilamina (14,6 ml, 105 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h y después 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 aceite de color amarillo pálido. El compuesto en bruto se sometió a cromatografía usando gradiente de acetato de etilo al 0-20 %/hexanos para dar un producto (17 g, rendimiento del 83 %) en forma de una mezcla de diastereómeros en una relación de aproximadamente 1:1. ^{31}P RMN (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0,31, -0,47; ^1H RMN (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); MS (ESI) m/z 407 (M-1)⁺. ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -2,05, -2,10; ^1H RMN (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); MS (ESI) m/z 407 (M-1)⁺.

Ejemplo de referencia 5-2. Preparación de Sp-4/Rp-4.



A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroxi-metil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (130 mg, 0,5 mmol) en THF seco (1,5 ml) se le 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 periodo de 5 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico 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 periodo de 5 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 48 h y después se inactivó con NH₄Cl 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 amarillo pálido. La cromatografía en columna del residuo usando gradiente de MeOH al 0-2 %/diclorometano dio un sólido espumoso de color blanco (125 mg, rendimiento del 47 %, mezcla de Sp-4/Rp-4 en una relación de aproximadamente 3,05:1,0).

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



Se secó previamente clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (330 g, 1,97 mol) por co-evaporación con tolueno (2 x 400 ml) a presión reducida y después se secó en un horno de vacío ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,2 mmHg, 17 h). A una solución agitada de fosfordicloridato de 4-nitrofenilo (500,0 g, 1,953 mol) en diclorometano anhidro (3,0 l) se le añadió una solución de fenol (183,8 g, 1,953 mol) y trietilamina (300 ml, 2,15 mol) en diclorometano (900 ml) a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura interna durante un periodo de 3 horas. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min más y después se dejó calentar hasta $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2,5 horas. El éster de aminoácido secado previamente se añadió a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera de nitrógeno durante 10 min. El residuo de sal 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 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 min y se añadió una segunda porción de trietilamina (571 ml, 4,10 mol) durante un periodo de 40 min a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se agitó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h y después 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 esta manera se retiró por filtración y se aclaró con MTBE (3 x 150 ml). El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color pardo claro transparente. El residuo se co-evaporó 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 éter diisopropílico (IPE, 1,1 l) y se agitó a 5 °C en un baño de hielo-agua. A la solución se le añadió una pequeña cantidad de cristales de siembra del isómero S_P deseado del producto y la mezcla se agitó a 5 °C durante 22 h para formar una suspensión medio espesa. Ésta se dejó en reposo en un refrigerador (-10 °C) durante 44 h. El producto precipitado se recogió por filtración y se aclaró con disolventes mixtos enfriados previamente de IPE y hexanos (1:1, 3 x 190 ml). El sólido se secó al vacío (0,5 mm de 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 relación de dos diastereómeros $S_P:R_P$ fue de 9,65/1 basado en ^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6 , δ -0,31 (S_P), -0,47). El producto se recrystalizó disolviendo 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 después se añadió una pequeña cantidad de semillas de isómero S_P cristalino. Se formó un polvo de color blanco en 2 horas y el matraz se almacenó en un refrigerador (-10 °C) durante 16 horas. Un sólido cristalino de color blanco y fino obtenido se filtró, se lavó con IPE enfriado previamente (3x 50 ml) y se secó al vacío (ambiente, 0,5 mm de Hg) a un peso constante para dar un sólido mullido de color blanco (177,7 g, rendimiento total del 22 % o rendimiento total del 44 % basándose en el rendimiento teórico del isómero S_P) con una relación diastereomérica de 48/1 basado en ^{31}P -RMN. P.f. 62-66 °C.

^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0,31; ^1H RMN (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);

^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3): δ -2,05; (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0,31; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): 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); ^1H RMN (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)

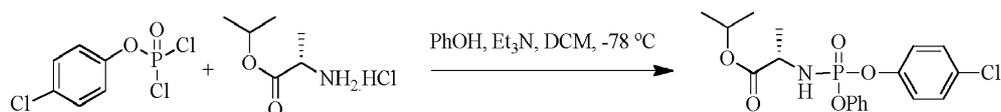
MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$.

La estereoquímica de **8** (isómero S_P) se ha confirmado por cristalografía de rayos X monocristalina, véanse los detalles proporcionados a continuación.

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

Una muestra 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 isopropanol al 35 % en dióxido de carbono a 100 bar. Se usó una carga de inyección de 4 ml de muestra a una concentración de 17 mg/ml de metanol. El isómero R_P [éster isopropílico del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] se eluyó en primer lugar. Las fracciones apropiadas de las múltiples realizaciones se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar 2,9 g del isómero R_P [éster isopropílico 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 isopropílico 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 por el método de cristalización anterior. **Datos analíticos para éster isopropílico del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero R_P)**: ^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0,47; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): 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); **MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$.**

Ejemplo de referencia 8-1. Preparación de éster isopropílico del ácido 2-[(4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico (\pm):



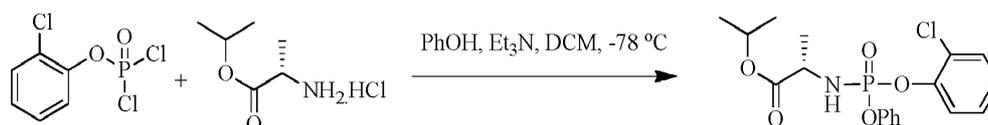
A una solución agitada de fosforodichloridato de 4-cloro-fenilo (2,45 g, 10,0 mmol) en diclorometano (20 ml) se le añadió una solución de fenol (0,94 g, 10 mmol) y trietilamina (1,56 ml, 11 mmol) en diclorometano (20 ml) a -78 °C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y después se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (1,67 g, 10 mmol) en diclorometano (50 ml) a 0 °C. A la mezcla se le añadió un segundo lote de trietilamina (2,92 ml, 21 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y después 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 aceite de color amarillo pálido. El compuesto en bruto se sometió a cromatografía usando gradiente de acetato de etilo al 10-20 %/hexanos para dar un producto (2,0 g, rendimiento del 50 %) en forma de una mezcla de diastereómeros en una relación de aproximadamente 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -1,58, -1,62; ¹H RMN (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). MS (ESI) m/z 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purificó por extracción, cristalización o cromatografía, como se ha indicado anteriormente.

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

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroxi-metil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (3, 2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se le añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (2-[(4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico (4,08 g, 10 mmol) en THF (15 ml) durante un periodo de 10 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 72. El análisis por TLC co-punteado con producto auténtico mostró que se había formado aproximadamente el 5 % del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

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

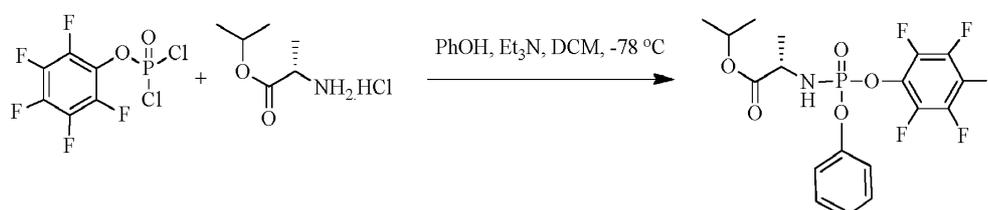


A una solución agitada de fosforodichloridato de 2-cloro-fenilo (9,8 g, 40 mmol) en diclorometano (80 ml) se le añadió una solución de fenol (3,76 g, 40 mmol) y trietilamina (6,16 ml, 44 mmol) en diclorometano (80 ml) a -78 °C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y después se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (6,7 g, 40 mmol) en diclorometano (150 ml) a 0 °C. A la mezcla se le añadió una segunda porción de trietilamina (11,6 ml, 84 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y después 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 aceite de color amarillo pálido. El compuesto en bruto se sometió a cromatografía usando un gradiente de acetato de etilo al 10-20 %/hexanos para dar un producto (11,3 g, rendimiento del 72 %) en forma de una mezcla de diastereómeros en una relación de aproximadamente 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -1,58, -1,61; ¹H RMN (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); MS (ESI) m/z 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización o cromatografía, como se ha indicado anteriormente.

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

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroxi-metil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (3, 2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se le añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (2-[(2-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (racémico, 4,08 g, 10 mmol) en THF (15 ml) durante un periodo de 10 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 72 h. El análisis por TLC co-punteado con producto auténtico mostró que se había formado aproximadamente el 5-10 % del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

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

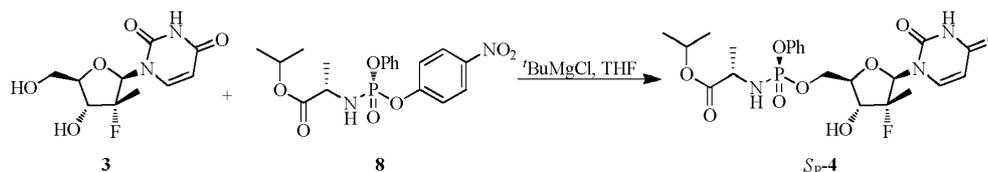


A una solución agitada de fosforodichloridato de pentafluorofenilo (6,0 g, 20 mmol) en diclorometano (40 ml) se le añadió una solución de fenol y trietilamina (3,08 ml, 22 mmol) en diclorometano (40 ml) a -78 °C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y después se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (3,35 g, 20 mmol) en diclorometano (100 ml) a 0 °C. A la mezcla se le añadió un segundo lote de trietilamina (5,84 ml, 42 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y después 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 aceite de color amarillo pálido en forma de una mezcla de diastereómeros en una relación de aproximadamente 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -0,49, -0,58, El producto resultante se purifica por extracción, cristalización o cromatografía, como se ha indicado anteriormente.

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

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (3, 2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se le añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico 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 periodo de 10 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 72 h. El análisis por TLC co-punteado con producto auténtico mostró que se había formado aproximadamente el 40-50 % del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

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



Ejemplo de referencia 11. Preparación de S_P-4 (escala de 32 mg): A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona 3 (32 mg, 0,12 mmol) en THF seco (1 ml) se le añadió una solución 1 M de cloruro de tButilmagnesio (0,26 ml, 0,26 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un periodo de 3 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero S_P) en THF (0,5 ml) durante un periodo de 3 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 42 h y después se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (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 metanol al 0-4 %/diclorometano para dar S_P-4 en forma de un sólido espumoso (29 mg, rendimiento del 44,5 %). ¹H y ³¹P RMN coinciden con lo que se desvela en el presente documento.

Ejemplo de referencia 12. Preparación de S_P-4 (escala de 2,6 g, sin cromatografía): A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 ml) se le añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero S_P, 4,08 g, 10 mmol) en THF (15 ml) durante un periodo de 10 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 60 h y después 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 amarillo pálido (3,8 g). El residuo se disolvió en diclorometano (7,6 ml) y después se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. El sólido de color blanco se filtró, se lavó con 1:1 de IPE/diclorometano (5 ml) y se secó al vacío para dar un producto puro en forma de un sólido de color blanco (1,85 g, rendimiento del 35 %).

Ejemplo de referencia 13. Preparación de S_P-4 usando NaHMDS: A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidrofuran-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (71 mg, 0,27 mmol) en THF seco (2,0 ml) se le añadió una solución 2,0 M de bis(trimetilsilil)amida sódica (NaHMDS) en THF (270 µl, 0,54 mmol) a -78 °C durante un periodo de 2 min. Después de 30 min, a la mezcla se le añadió una solución de éster isopropílico 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 dejó agitar a esta temperatura durante 2 h y después se calentó a -20 °C a cuya temperatura se agitó durante 20 h más. El análisis por TLC indicó ~30 % de material de partida de nucleósido sin reaccionar. Por lo tanto, a la mezcla se le añadieron 0,5 equivalentes más del reactivo (55 mg, 0,14 mmol) en THF (0,5 ml) y se agitó durante 6 h más. La mezcla de reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de cloruro

de amonio y después 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 metanol al 0-5 %/diclorometano dio *S_P*-4 (22 mg, rendimiento del 15 %), 3'-fosforamidato (5, isómero *S_P*, 11,5 mg, rendimiento del 16 %) y bis fosforamidato (6, *S_P*, isómero *S_P*, 12,6 mg).

5

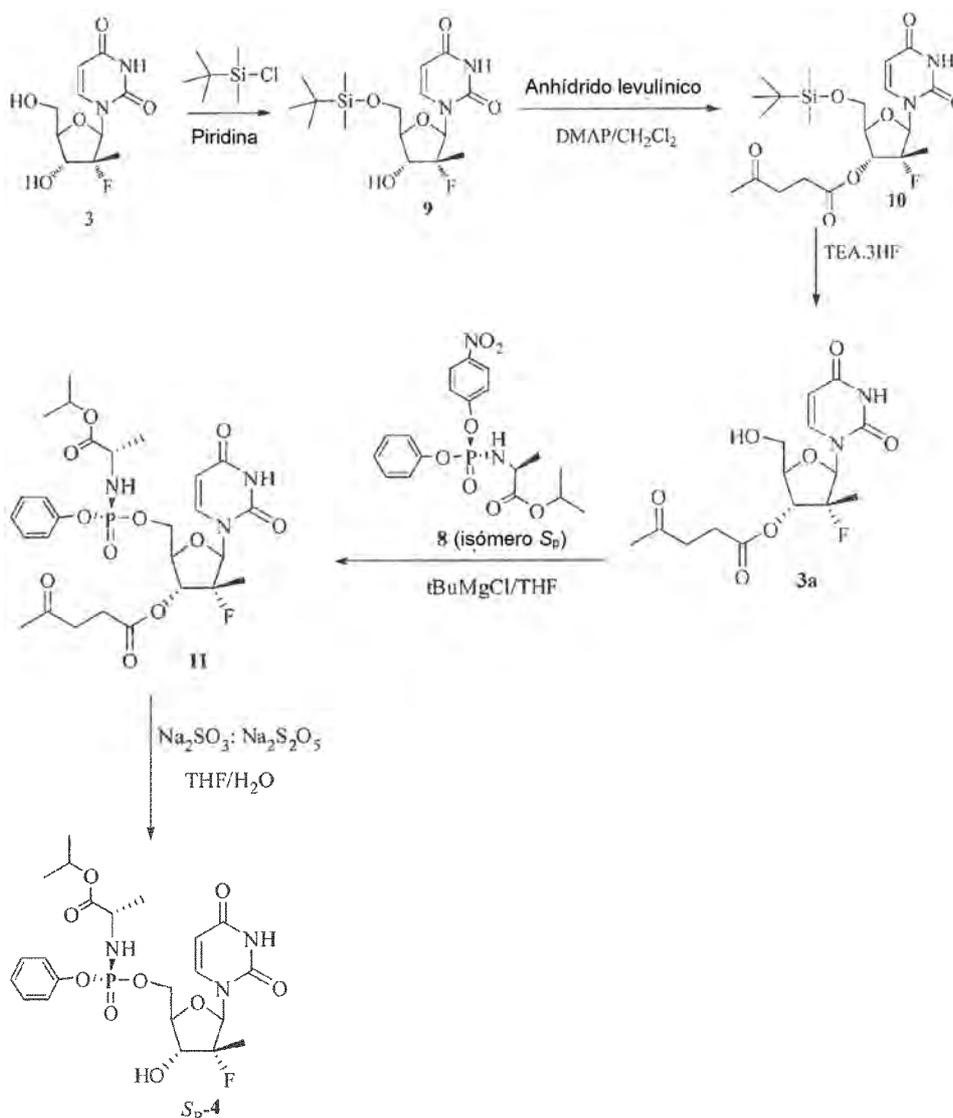
Ejemplo de referencia 14. Preparación de *R_P*-4 (escala de 260 mg): A una solución agitada de 1-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1*H*-pirimidina-2,4-diona (260 mg, 1 mmol) en THF seco (6 ml) se le añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,23 ml, 2,1 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un periodo de 5 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(*R*)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero *R_P*) en THF (3 ml) durante un periodo de 3 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 96 h y después se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (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 amarillo pálido (490 mg). El residuo se sometió a cromatografía usando un gradiente de metanol al 0-5 %/diclorometano para dar un producto en forma de un sólido de color blanco (160 mg, rendimiento del 30 %).

10

15

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

20 **Ejemplo de referencia 15. Preparación de *S_P*-4 con 3a como un intermedio sintético**



Ejemplo de referencia 15-1. Síntesis de 5'-O-terc-Butildimetilsilil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (9):

25

A una solución agitada de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3, 81,1 g, 312 mmol) en piridina seca (750 ml) se le

añadió gota a gota una solución de TBDMSCI (103,19 g, 685,6 mmol) en piridina seca (500 ml) durante un periodo de 45 min a temperatura ambiente. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A la mezcla de reacción se le añadió metanol (85 ml) y se dejó en agitación durante 10 min, y después los disolventes se retiraron por destilación a presión reducida. A la masa de reacción se le añadió agua caliente (45 °C) (1 l) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 500 ml) y se lavó con agua (1 x 500 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. Se retiró por destilación acetato de etilo y el residuo obtenido se co-evaporó con tolueno (2 x 500 ml) para dar **9** en bruto en forma de una espuma de color blanco. Rendimiento = 116,9 g (cuantitativo). ¹H RMN (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).

Ejemplo de referencia 15-2. Síntesis de 5'-O-(terc-Butildimetilsilil)-3'-O-levulinil-2'-desoxi-2'-fluoro 2'-C-metil-uridina (10):

A una solución agitada del nucleósido **9** (116,9 g, 312,1 mmol) en DCM (1 l) se le añadió DMAP (30,5 g, 249,7 mmol) y esto se dejó en agitación a TA durante 20 min. A la mezcla se le añadió una solución de anhídrido levulinico (133,6 g, 642,3 mmol) en DCM (200 ml) y se dejó en agitación durante 24 h. El análisis por TLC de la mezcla indicó la finalización de la reacción. Se añadió agua fría (500 ml) y la mezcla se agitó durante 20 min. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con una solución sat. de bicarbonato sódico (2 x 250 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y después 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 tal cual para la siguiente etapa. ¹H RMN (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).

Ejemplo de referencia 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) al que se le añadió TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) y se dejó agitar durante una noche a temperatura ambiente. El análisis por TLC de la mezcla indicó un 50 % de finalización de la reacción. Se añadió otro equivalente de TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 6 h. El análisis por TLC en este punto indicó aproximadamente un 10 % de material de partida sin reaccionar. Se añadieron 0,25 equiv. más de TEA.3HF (12,5 g, 78,0 mmol) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a sequedad para dar un aceite de color amarillo. El producto en bruto de todos los lotes se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-2 % en DCM) para dar 124,1 g de 3'-levulinato en forma de un sólido espumoso de color blanco (rendimiento del 90 % purificado en tres etapas de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina). ¹H RMN: (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).

Ejemplo de referencia 15-4. Síntesis estereoselectiva de (S)-isopropil éster 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-tetrahydro-furan-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 le añadió tBuMgCl (1,7 M en THF, 2 equiv.), se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante media hora. A esta mezcla se le añadió en un lote el reactivo (pureza quiral de aprox. el 97 %) éster isopropílico del ácido (S)-2-[[[(S)-4-nitro-fenoxi]-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero S_P) (408 mg, 1,00 mmol, 1,00 equiv.) y se dejó en agitación a ta. Después de 16 h, quedó ~30 % de material de partida. La mezcla de reacción se inactivó con una solución saturada de NH₄Cl 10 ml, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad para dar una espuma de color amarillo pálido (500 mg). Esto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando metanol al 2-5 % en cloruro de metileno para dar el producto en forma de una espuma de color blanco (275 mg) de pureza quiral P de aproximadamente el 97 % y material de partida sin reaccionar (162 mg). Basado en el material de partida consumido, el rendimiento fue del 76 %.

³¹P RMN (CDCl₃, 162 MHz): 3,7 ppm; ¹H RMN (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).

Ejemplo de referencia 15-5. Síntesis de (S)-isopropil éster 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-tetrahydro-furan-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (S_P-4)

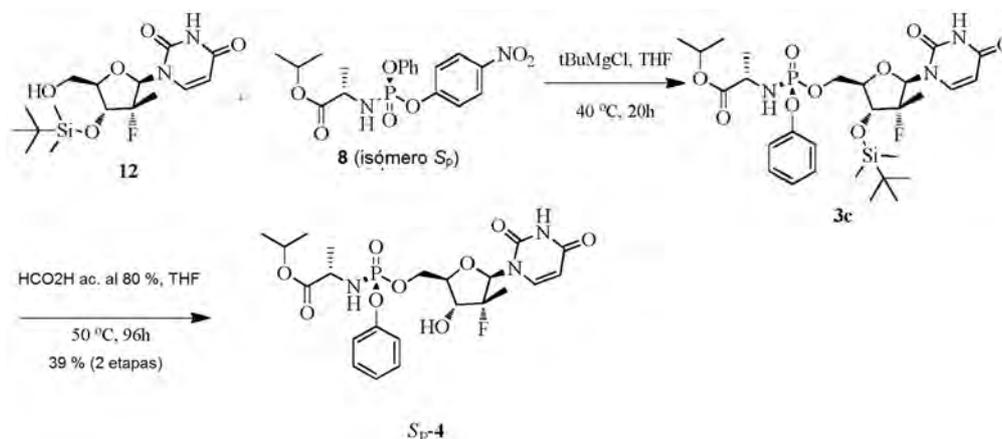
Una solución de sulfito sódico se preparó añadiendo Na₂S₂O₃ (1,51 g) y Na₂S₂O₅ (0,57 g) en agua (25 ml). A una solución del levulinato (**11**, 250 mg, 0,40 mmol) en THF anhidro (2,5 ml) se le añadió 1,0 ml de la solución de sulfito sódico. Esto se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (15 ml), 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 una pureza quiral P de aproximadamente el 97 % que correspondió con las propiedades físicas y espectrales del S_P-4 producido directamente a partir del nucleósido no protegido.

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

5 A una solución agitada de (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-fluoro-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-il éster del ácido 4-oxo-pentanoico (**3a**, 210 mg, 0,59 mmol) en THF seco (1,5 ml) se le añadió una
 10 solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,07 ml, 1,82 mmol) a temperatura ambiente durante un periodo de 2 min. Inicialmente, se observó un precipitado de color blanco y después 10 min, la mezcla de reacción se convirtió
 en una solución de color amarillo oscuro. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster
 15 isopropílico 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 periodo de 3 min. La mezcla se calentó a 40 °C durante 5 h, momento en el que el
 análisis por TLC y ¹H RMN indicaron menos del 2 % de material de partida sin reaccionar. La reacción se interrumpió
 con cloruro de amonio acuoso saturado y después se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica
 20 combinada se lavó con una solución acuosa al 10 % de Na₂CO₃ (3 x 10 ml) seguido de agua. La capa 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 después 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
 25 durante 20 h, fase en la que únicamente se observó una conversión de aproximadamente el 10 % por TLC, por lo
 tanto, se añadió más cantidad del sulfito sódico (74 mg) y el metabisulfito sódico (448 mg), y el calentamiento se
 continuó durante 52 h más. En este momento, se observó una conversión de aproximadamente el 40 % 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 MeOH al 0-5 %/DCM dio material de partida sin reaccionar (89 mg) y S_P-4 (57 mg,
 rendimiento del 18 %, 24 % basado en el material de partida recuperado).

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



30 Ejemplo de referencia 17-1. Preparación de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilaniloxi)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona, **12**.

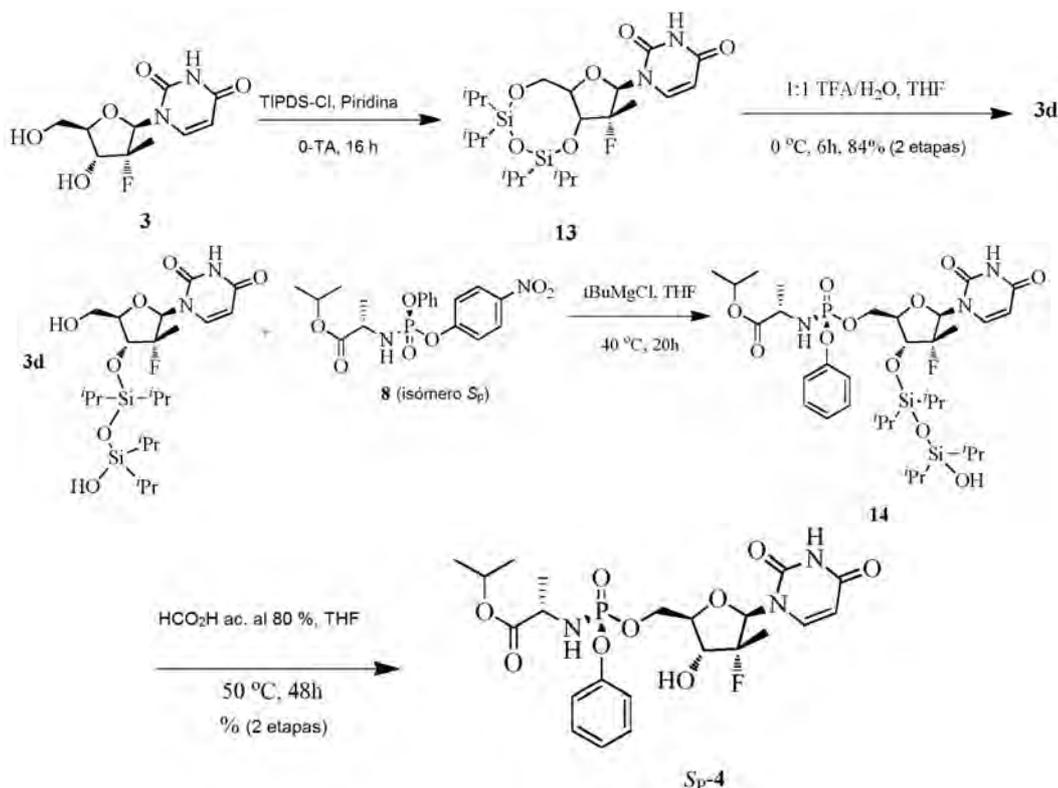
A una solución de **3** (10,0 g, 38,43 mmol) en piridina (50 ml) se le añadió diclorometano (50 ml). La solución se enfrió
 35 a 0 °C. A la solución se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (14,32 g, 42,27 mmol) y la solución se agitó a 0 °C
 durante 5 h. Se añadió metanol (5 ml) para interrumpir la reacción. La solución se concentró a 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
 salmuera (50 ml) y se secó (sulfato sódico, 4 g). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en
 40 diclorometano (100 ml). A la solución se le 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 (EtOAc al 10-40 % en Hexano) para dar el producto intermedio de 5'-O-DMT-
 3'-O-tBDMS. A su vez, este se trató con ácido trifluoroacético al 1 % en diclorometano (200 ml). La solución se agitó
 45 a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió agua (20 ml) y la solución se agitó a ambiente durante 1 h más. Se
 añadió lentamente metanol (5 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h más. 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 a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de
 sílice (metanol al 1-5 % en diclorometano) para dar **12** en forma de un sólido de color blanco 7,5 g con un
 50 rendimiento del 50 % en tres etapas. ¹H RMN (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).

Ejemplo de referencia 17-2. Preparación de S_P-4 usando 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona (3c).

5 A una solución agitada de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona (**12**, 374 mg, 1 mmol) en THF seco (3 ml) se le añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,8 ml, 3,1 mmol) a temperatura ambiente durante un periodo de 2 min. Inicialmente, se observó un precipitado de color blanco y después de 10 min la mezcla de reacción se convirtió en una solución de color amarillo oscuro transparente. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico 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 periodo de 3 min. La mezcla se calentó a 40 °C durante 20 h, momento en el que el análisis por TLC y ¹H RMN indicó menos del 5 % de material de partida sin reaccionar. La mezcla de reacción se inactivó con cloruro de amonio acuoso saturado y después se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa al 10 % de Na₂CO₃ (3 x 10 ml), seguido de agua (20 ml). La capa 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 tetrahydrofurano (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 una conversión de aproximadamente el 70 % por TLC. La mezcla de reacción se vertió en bicarbonato sódico acuoso saturado frío y después 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 MeOH al 0-5 %/DCM dio material de partida sin reaccionar (21 mg) y S_P-4 (77 mg, rendimiento del 35 %, rendimiento del 39 % basado en el material de partida recuperado).

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

25



30 Ejemplo de referencia 18-1. Preparación de 3d

A una solución agitada de **3** en piridina (20 ml) a 0 °C se le añadió gota a gota TIPDS-Cl durante un periodo 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 co-evaporó con tolueno (50 ml). Después, el residuo se trituró con hexanos y el precipitado blanco se retiró por filtración usando una capa de Celite. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un sólido espumoso (12,97 g). El producto en bruto (**13**) se disolvió de nuevo en tetrahydrofurano (75 ml) y se añadió una solución acuosa de TFA (75 ml, 1:1 TFA/agua) a 0 °C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 6 h. El análisis por TLC indicó ~5 % de material de partida. La mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado hasta un pH 8 y después 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

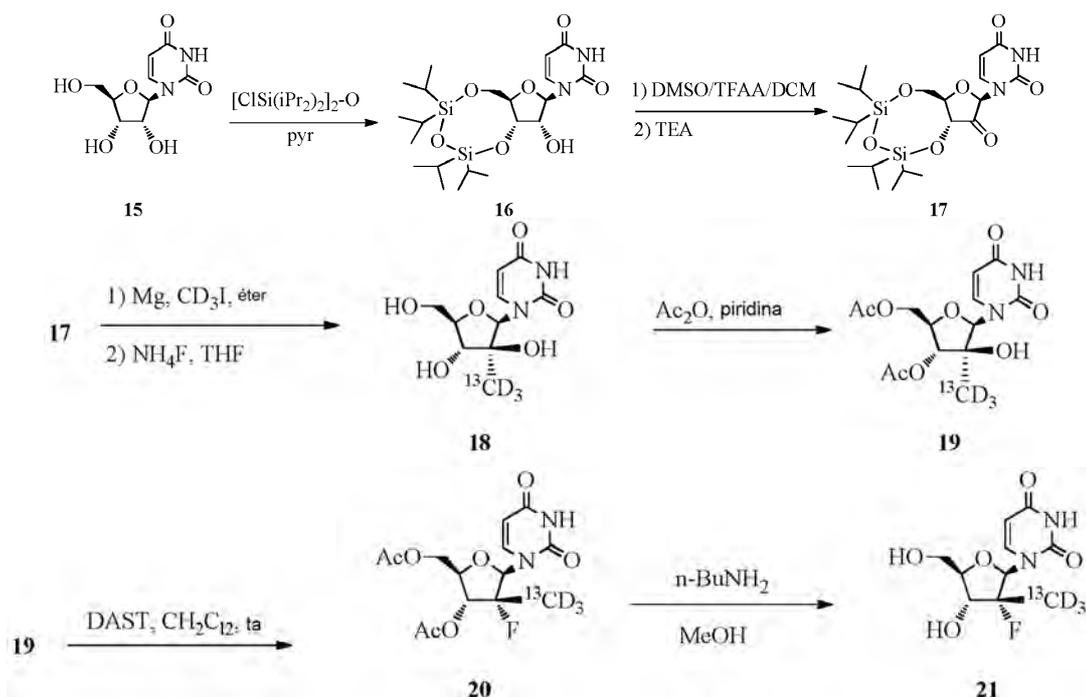
trituration adicional del sólido con hexanos (30 ml) dio un sólido de color blanco que se filtró y se secó a alto vacío para dar **3d** (10,1 g, rendimiento del 84 % en 2 etapas). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8,83 (s a, 1H), 7,94 (d a, J = 6,0 Hz, 1H), 6,10 (d a, J = 18,4 Hz, 1H), 5,71 (d, J = 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).

Ejemplo de referencia 18-2. Preparación de S_P -4

A una solución agitada de **3d** (520 mg, 1 mmol) en THF seco (5 ml) se le 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 periodo de 15 min. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico (**8**, isómero S_P , 653 mg, 1,6 mmol) en THF (1 ml) durante un periodo de 3 min. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 60 h. El análisis ^1H y ^{31}P RMN de la muestra en bruto indicó una mezcla de diastereómeros en aproximadamente 1:0,76. La mezcla de reacción se inactivó con NH_4Cl acuoso saturado (20 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (150 ml) y secuencialmente, Na_2CO_3 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 amarillo pálido (**14**, 878 mg).

El compuesto anterior, **14**, se disolvió de nuevo en tetrahidrofurano (3 ml) y después 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 después se inactivó con bicarbonato sódico acuoso saturado (pH 7,0). Después, la mezcla de reacción se repartió 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 metanol al 0-5 %/diclorometano para dar material de partida sin reaccionar (**14**, 242 mg) y S_P -4 (80 mg, rendimiento del 15 %) en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo de referencia 19. Preparación de S_P -4 marcado con isótopos



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

Se co-evaporó uridina (**15**, 100,0 g, 409,5 mmol) a sequedad con piridina anhidra (600 ml) y se suspendió de nuevo en piridina anhidra (700 ml). A esta suspensión fina agitada se le añadió 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (135,7 g, 482,5 mmol) durante 60 min a temperatura ambiente. Después de agitar la suspensión fina durante 17 h a temperatura ambiente, la reacción se interrumpió añadiendo metanol (20 ml) y después se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre acetato de etilo (1,5 l) y agua (2 l). La capa orgánica se lavó adicionalmente con ácido clorhídrico al 5 % (2 x 1 l) y salmuera (500 ml), se secó sobre sulfato sódico sólido (50 g), se filtró y se concentró a presión reducida para dar el producto en bruto, aprox. 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 al 20-65 %. Las fracciones del producto puro, según se determinó por un análisis TLC homogéneo (Fr 0,55 en 1:1 de hexanos-acetato de etilo) se combinaron, se concentraron a presión reducida y se secaron (40 °C, 0,2 mm de Hg, 24 h) para proporcionar 145,5 g

(76 %) de **16** en forma de un sólido espumoso de color blanco. También se recogió una fracción adicional (35 g) de **16** ligeramente impuro. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 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'-*H*_a y *H*_b), 1,02-0,95 (m, 28H, CH(CH₃)₂).

5 **Ejemplo de referencia 19-2. Preparación de 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-tetraisopropil-9-oxotetrahidro-6H-furo[3,2- η][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, 17**

10 En un matraz de fondo redondo de tres bocas seco 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) mediante una jeringa durante 40 min y proporcionó una mezcla turbia. A la mezcla una solución del derivado de uridina **16** en DCM (600 ml) se le añadió gota a gota durante 75 min a -78 °C mediante un embudo de adición. La mezcla heterogénea se agitó durante 2 h a -78~65 °C y después se añadió trietilamina anhidra (92 ml) mediante una jeringa rápidamente para formar una solución de color amarillo claro transparente. Después de 1 h a baja temperatura, la reacción se completó como se muestra por TLC (EtOAc al 30 % en hexanos). El baño de refrigeración se retiró y la mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se interrumpió mediante la adición de NH₄Cl sat. (180 ml). Se añadió agua (200 ml) y la fase orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM (300 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (3 x 400 ml) y salmuera (150 ml), y se secó sobre Na₂SO₄. La retirada del disolvente proporcionó un residuo de color pardo pegajoso.

25 El residuo oleoso en bruto (contenía traza de DCM) se almacenó durante una noche en el refrigerador. Después de durante una noche, se observó algo de sólido de cristal en el aceite. El aceite se disolvió en 500 ml de hexanos a temperatura ambiente. La solución se almacenó en el refrigerador durante 24 horas y se formó más sólido. El sólido se recogió por filtración y se aclaró con DCM frío al 10 % en hexanos (1 l) para retirar la mayor parte del color naranja. El sólido (**17**) se secó al vacío durante 2 h y después se secó al aire durante 24 h. El sólido pesó 21 g después de secarse a 50 °C al vacío. El filtrado se concentró y el residuo se purificó a través de cromatografía en columna (acetato de etilo al 10-70 % en hexanos) para proporcionar 37 g más (rendimiento combinado de 97 %) de **17** en forma de un sólido de color naranja claro.

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

35 Se lavó magnesio (3,53 g, 147 mmol) con ácido clorhídrico acuoso al 5 %, se secó (50 °C, 0,2 mm de Hg, 24 h), 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 después se añadió éter anhidro (80 ml). Al magnesio en éter se e añadió lentamente metil yoduro de perdeuterio-¹³C (15,06 g, 110,3 mmol), que generó una reacción exotérmica. Después de que la mezcla de reacción se enfriase, el sobrenadante se transfirió a una solución del compuesto seco **17** (50 °C, 0,2 mm de Hg, 15 h) (10,0 g, 20,63 mmol) en THF anhidro (1 l) a -50 °C durante 20 min. La temperatura se dejó elevar hasta -40 °C y la mezcla se agitó entre -40 a -25 °C durante 4 h. Tras la finalización de la reacción, la mezcla se diluyó con EtOAc (1 l) a -50 °C y después se añadió lentamente salmuera (300 ml). La capa orgánica se separó, después se lavó con una solución sat. de cloruro de amonio (300 ml x 2) y se secó con sulfato sódico. Después de la filtración y la 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 después se concentró con gel de sílice (20 g) a presión reducida. Después de un extenso secado al vacío, el residuo obtenido se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna 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. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 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'').

50 **Ejemplo de referencia 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-tetrahidrofurano-2-il)metilo, 19**

55 A una solución del compuesto **18** (5,00 g, 19,1 mmol) en piridina anhidra (100 ml) se le 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 la filtración y la concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH del 0 al 5 % en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **19** (4,0 g, 68 %) en forma de un sólido de color gris.

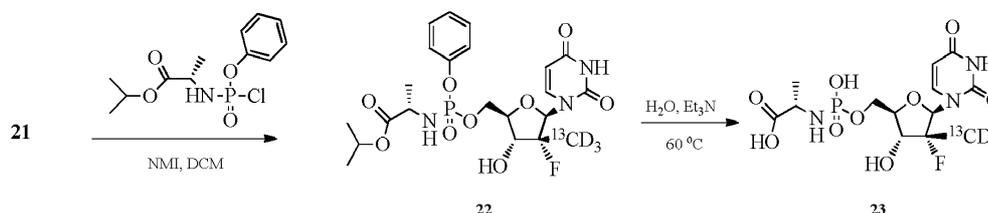
60 **Ejemplo de referencia 19-5. Preparación de acetato de ((2R,3R,4R,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahidrofurano-2-il)metilo, 20**

65 A una solución del compuesto **19** (2,33 g, 6,73 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (60 ml) se le 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 realizaron dos reacciones a escala de 2,33 g adicionales y una reacción a escala de 1,00 g exactamente de la misma manera. Las cuatro mezclas de reacción se combinaron, se diluyeron con CH₂Cl₂

(300 ml), y se lavaron con hielo-agua (100 ml x 2) y después una solución acuosa fría de NaHCO₃ (100 ml x 2). Después del secado, la filtración y la concentración, el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice (EtOAc del 0 % al 50 % en hexanos, compuesto obtenido a aproximadamente el 48 %) para dar el compuesto **20** (2,0 g, 24 % de 7,99 g totales del compuesto 19) en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (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).

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

A una solución del compuesto **20** (2 g, 5,74 mmol) en metanol (20 ml) se le 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 ultrarrápida en columna sobre gel de sílice (MeOH del 0 al 10 % en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **21** (1,3 g, 85 %) en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (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.



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

A una solución del nucleósido no protegido **21** (207 mg, 0,783 mmol) y *N*-metilimidazol (0,4 ml, 5 mmol) en THF (4 ml) se le 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 después se añadieron agua (1 ml) y EtOAc (5 ml). La solución orgánica se lavó con citrato sódico mono básico ac. sat. (2 x 2 ml), NaHCO₃ ac. sat. (1 x 2 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice usando ⁱPrOH del 0 al 5 % en CH₂Cl₂ como eluyentes para dar el fosforamidato, **22** (216 mg, 52 %, mezcla 1:1 de *P*-diastereómeros) en forma de un sólido de color blanco: ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,54 (s, 1H), 7,56 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,40-7,35 (m, 2H), 7,23-7,18 (m, 3 H), 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); ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4,90, 4,77; LRMS (ESI) [M + H]⁺ calculado para C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534,5, observado 534,4.

Ejemplo de referencia 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 tetrahidrofurano-2-il)metoxi)(hidroxi)fosforil)amino)propanoico, **23**

Se suspendió fosforamidato **22** (147 mg, 0,276 mmol) en trietilamina (2 ml) y agua (0,5 ml), y se calentó a 60 °C durante 30 h. Después, los componentes volátiles se evaporaron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice eluyendo con ⁱPrOH al 50-70 % en CH₂Cl₂ y después, NH₄OH del 0 al 20 % en ⁱPrOH para dar **23** en forma de un sólido de color blanco (95 mg, 83 %): ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) 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); ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,12; LRMS (ESI) [M + H]⁺ calculado para C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₉P 416,3, observado 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 analizaron por difracción de polvo de rayos X (XRPD), espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis gravimétrico térmico (TGA), absorción de vapor gravimétrico (GVS), solubilidad acuosa termodinámica, y cromatografía líquida de alto rendimiento).

Ejemplo de referencia 20. Difracción de polvo de rayos X

Las muestras de R_P-4, **4** y S_P-43 se analizaron por difracción de polvo de rayos X (XRPD) en el siguiente régimen.

a. Bruker AXS/Siemens D5000

Los patrones de difracción de polvo de rayos X se recogieron en un difractómetro Siemens D5000 usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetros θ - θ , divergencia de V20 y hendiduras de recepción, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. El instrumento es la realización verificada usando un estándar Corundum certificado (NIST 1976). El software usado para la recogida de datos fue Diffrac Plus XRPD Commander v2.3.1 y los datos se analizaron y presentaron usando Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones ambientales

Las muestras realizadas en condiciones ambientales se prepararon como especímenes de placa plana usando polvo como se recibe. Aproximadamente se empaquetaron suavemente 35 mg de la muestra en una cavidad cortada en obleas de silicio (510) de respaldo nulo y pulidas. La muestra se giró en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recogida de datos son: intervalo angular: 2 a 42°2 θ ; tamaño de la etapa: 0,05°2 θ ; y tiempo de recogida: 4 s.etapa⁻¹.

b. Bruker AXS C2 GADDS

Los patrones de difracción de polvo de rayos X se recogieron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), etapa XYZ automática, microscopio de video láser para el posicionamiento de la auto-muestra y un detector de área dimensional HiStar 2. Las ópticas de rayos X consisten en un espejo de capa múltiple Göbel individual acoplado con un colimador pinhole de 0,3 mm.

La divergencia del haz, es decir, el tamaño efectivo del haz de rayos X en la muestra, fue aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de barrido continuo θ - θ con una distancia del detector de muestra de 20 cm que da un intervalo de 2 θ efectivo de 3,2°- 29,7°. Normalmente, la muestra deberá exponerse 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

Las muestras realizadas bajo condiciones ambientales se prepararon como especímenes de placa plana usando polvo como se recibe sin moler. Aproximadamente 1-2 mg de la muestra se presionaron ligeramente en un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana.

Difracción de polvo de rayos X (XRPD)

Se descubrió por XRPD que **4** era amorfo (véase la **figura 1**). El análisis XRPD de alta resolución de **R_P-4** preparado de acuerdo con el Ejemplo 3 confirmó un sólido cristalino que mostraba un patrón en polvo diferente al de 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 XRPD para **R_P-4** y **S_P-4** se muestra en la **Tabla 1** con todos los picos mostrando muestran una intensidad de ≤ 5 % (**R_P-4**) y ≤ 3 % (**S_P-4**) excluido.

Tabla 1. Datos XRPD para **R_P-4 y **S_P-4**.**

Datos XRPD para R_P-4		Datos XRPD para S_P-4 (Forma 1)	
Ángulo 2-Theta °	% de intensidad	Ángulo 2-Theta °	% de 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		

Una muestra de S_{P-4} se molió con un mortero, y después se pasó sucesivamente a través de tamices de 500 y 250 µm para producir la muestra en forma de un polvo fino. Esta muestra se analizó de nuevo por XRPD de alta resolución, confirmando que no se produce ningún cambio de forma.

5

Ejemplo de referencia 21. Estudios de cristalización para S_{P-4}.

S_{P-4} cristalino muestra polimorfismo. Por lo tanto, un aspecto se dirige a S_{P-4} cristalino y sus formas polimórficas individuales. S_{P-4} puede existir en al menos cinco forma polimórficas, designadas como Formas 1-5. Además, S_{P-4} amorfo también puede prepararse. Una cristalización típica se prevé disolver aproximadamente 100 mg de S_{P-4} en un volumen apropiado del disolvente de cristalización (acetonitrilo (5 vol.), cloroformo (5 vol.), acetato de n-butilo (7 vol.), diclorometano (50 vol.), anisol (7 vol.), y 1:1 de MTBE/heptano (50 vol.)) y después permite la evaporación de la solución a 5 °C. Se obtuvieron diversas formas cristalinas, pero cada forma, durante la filtración y/o el secado, proporcionó la Forma 1.

10

15

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

20

25

Ejemplo de referencia 21-1. Forma 1 de S_{P-4}

Se presenta una lista de picos de la Forma 1 de S_{P-4} en la **Tabla 2**.

30

Angulo 2-Theta °	% de intensidad %
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

Ejemplo de referencia 21-2. Forma 2 de SP-4

Se representa un patrón de XRPD de la Forma 2 de SP-4 en la **Figura 5**.

5

Se presenta una lista de picos de la Forma 2 de SP-4 en la **Tabla 3**.

Ángulo 2-Theta °	% de 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

Ejemplo de referencia 21-3. Forma 3 de SP-4

Se representa un patrón de XRPD de la Forma 3 de SP-4 en la **Figura 6**.

5

Se presenta una lista de picos de la Forma 3 de SP-4 en la **Tabla 4**.

Ángulo 2-Theta °	% de intensidad %
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

Ejemplo de referencia 21-4. Forma 4 de SP-5

10 Se representa un patrón de XRPD de la Forma 4 de SP-4 en la **Figura 7**.

Se presenta una lista de picos de la Forma 4 de SP-4 en la **Tabla 5**.

Ángulo 2-Theta °	% de intensidad %
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

Ejemplo de referencia 21-5. Forma 5 de SP-4

15

Se representa un patrón de XRPD de la Forma 5 de SP-4 en la **Figura 8**.

Se presenta una lista de picos de la Forma 5 de SP-4 en la **Tabla 6**.

Ángulo 2-Theta °	% de intensidad %
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

Ejemplo de referencia 21-6, S_P-4 (Amorfo)

Se representa un patrón XRPD para S_P-4 amorfo en la **Figura 9**.

5

Ejemplo de referencia 22. Cristalografía de rayos X monocristalina de S_P-4 y sus solvatos**Ejemplo de referencia 22-1. Cristalografía de rayos X monocristalina de S_P-4 (Forma 1)**

- 10 La figura 10 muestra una estructura de cristal de rayos X para la Forma 1 de S_P-4. Aquí, la figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 1 de la estructura de cristal que muestra el esquema de numeración empleado. Los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópicos para los átomos distintos de de hidrógeno se muestran en el nivel de probabilidad del 50 %. Los átomos de hidrógeno se muestran con un radio arbitrariamente pequeño.
- 15 La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con peso $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0592P)^2 + (0,6950P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en un algoritmo de escala 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 valores F de 7090 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,016$ para todos los datos y 870 parámetros. Δ/σ (máx) final 0,001, Δ/σ (promedio), 0,000. Mapa de diferencia final entre +0,534 y -0,36 e Å^{-3} .
- 20

Tabla 7. Parámetros de 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 de cristal	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	Cu K α , 1,54178Å				
F(000)	1112				
T	100(1)K				
Cristal	Placa incolora, 0,12 x 0,09 x 0,03 mm				
Datos truncados para	0,80 Å				
$\theta_{\text{máx}}$	74,48°				
Plenitud	99,4 %				
Reflexiones	14854				
Reflexiones únicas	7513				
R_{int}	0,0217				

Ejemplo de referencia 22-2. Cristalografía de rayos X monocristalina de S_P-4 (Forma 2)

25

La figura 11 muestra una estructura de cristal de rayos X para la Forma 2 de S_P-4. Aquí, esta figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 2 de la estructura de cristal que muestra el esquema de numeración empleado. Los heteroátomos se resolvieron isotrópicamente debido a datos muy débiles. Los átomos de hidrógeno no se muestran.

30

La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con peso $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0975P)^2 + (10,6969P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en un algoritmo de escala 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, R_1 convencional = 0,0741 en valores F de 2525 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,05$ para todos los datos y 158 parámetros. Δ/σ (máx) final 0,000, Δ/σ (promedio), 0,000. Mapa de diferencia final entre +1,388 y -0,967 e Å^{-3} .

35

Tabla 8. Parámetros de cristal individual de la Forma 2

Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ FN ₃ O ₉ P				
Peso molecular	614,38				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo espacial	P2 ₁	a	12,8315(3)Å,	α	90°

	<i>b</i>	6,14530(10)Å,	β	91,752(2)°,
	<i>c</i>	17,6250(4)Å,	γ	90°
<i>V</i>	1389,14(5)Å ³			
<i>Z</i>	2			
<i>D_c</i>	1,469 g.cm ⁻¹			
μ	3,196 mm ⁻¹			
Fuente, λ	Cu-K, 1,54178Å			
<i>F</i> (000)	640			
<i>T</i>	293(2)K			
Datos truncados para	0,80 Å			
$\theta_{\text{máx}}$	62,23°			
Plenitud	91,1 %			
Reflexiones	3528			
Reflexiones únicas	2562			
<i>R_{int}</i>	0,0227			

Ejemplo de referencia 22-3. Cristalografía de rayos X monocristalina de Sp-4 (Forma 2)

La figura 12 representa una estructura de cristal de rayos X (ORTEP - anisotrópica) Sp-4 (Forma 2). Una estructura de cristal del solvato de cloruro de metileno de Sp-4 (Forma 2), C₂₃H₃₁N₃PO₉FCl₂, produce un grupo espacial monoclinico P2₁ (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_{calc.} = 1,449 g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron en un detector de área Rigaku Mercury CCD empleando radiación Mo-K α monocromada por grafito (λ = 0,71073 Å) a una temperatura de 143 °K. La indexación preliminar se realizó a partir de una serie de doce imágenes de rotación de 0,5° con exposiciones de 30 segundos. Se recogieron un total de 648 imágenes de rotación con un cristal a una distancia del detector de 35 mm, un ángulo de balanceo 2 θ de -12°, anchuras de rotación de 0,5° y exposiciones de 30 segundos: El barrido n.º 1 fue un barrido Φ de 315° a 525° a ω = 10° y χ = 20°; el barrido n.º 2 fue un barrido ω de -20° a 5° a χ = -90° y Φ = 315°; el barrido n.º 3 fue un barrido ω de -20° a 4° a χ = -90° y Φ = 135°; el barrido n.º 4 fue un barrido ω de -20° a 5° a χ = -90° y Φ = 225°; el barrido n.º 5 fue un barrido ω de -20° a 20° a χ = -90° y Φ = 45°. Las imágenes de rotación se procesaron usando CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), produciendo una lista de valores no promediados F² y σ (F²) que después se pasaron al paquete de programas CrystalStructure (CrystalStructure: Paquete de análisis de estructura de cristal, Rigaku Corp. Rigaku/MSC (2002)) para un procesamiento adicional y una solución de la estructura en un ordenador Dell Pentium III. Se midieron un total de 7707 reflexiones sobre los intervalos 5,48 ≤ 2 θ ≤ 50,04°, -14 ≤ h ≤ 15, 15, -7 ≤ k ≤ 6, -19 ≤ l ≤ 21 produciendo 4253 reflexiones únicas (R_{int} = 0,0180). Los datos de intensidad se corrigieron para los efectos Lorentz y de polarización y para la absorción usando REQAB (transmisión mínima y máxima 0,824, 1,000).

La estructura se resolvió por 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 por mínimos cuadrados de matriz completa basado en F² 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 peso 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 distintos de de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de "soporte". El refinamiento convergió en R₁ = 0,0328 y wR₂ = 0,0817 para 4046 reflexiones para las que F > 4 σ (F) y R₁ = 0,0348, wR₂ = 0,0838 y GOF = 1,056 para todas las 4253 reflexiones únicas no nulas 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 = el número de reflexiones y p = el 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 absoluto de Flack refinado en -0,06(6) corrobora de esta manera la estereoquímica del compuesto del título.

La Tabla 1 enumera la información celular, los parámetros de recogida de datos y los datos de refinamiento. Los parámetros térmicos isotrópicos equivalentes y posicionales finales se dan en la Tabla 2. Los parámetros térmicos anisotrópicos se encuentran en la Tabla 3. ("ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations". C.K. Johnson (1976) ORNL-5138). Se muestra la representación de la molécula con un 30 % de probabilidad de elipsoides térmicos.

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

Fórmula:	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ PO ₉ FCl ₂
Peso de la fórmula:	614,38
Clase del cristal:	monoclinico
Grupo espacial:	P2 ₁ (#4)
Z	2

Constantes celulares:	
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 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 (λ = 0,71073Å)
ángulo 2 θ	5,48 - 50,04°
hkl recogido:	-14h \leq h \leq 15; -7 \leq k \leq 6; -19 \leq l \leq 21
N.º de reflexiones medidas:	7707
N.º de reflexiones únicas:	4253 (R _{int} =0,0180)
N.º de reflexiones observadas	4046(F>4 σ)
N.º de reflexiones usadas en el refinamiento	4253
N.º de parámetros	358
Índices R (F>4 σ) \square	R ₁ = 0,0328 wR ₂ = 0,0817
Índices R (todos los datos) \square	R ₁ = 0,0348 wR ₂ = 0,0838
GOF:	1,056
Picos de diferencia finales, e/Å ³	+0,312, -0,389

Ejemplo de referencia 22-4. Cristalografía de rayos X monocristalina de Sp-4 (Forma 3)

5 La figura 13 muestra una estructura de cristal de rayos X para la Forma 3 de Sp-4. Aquí, esta figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 3 de la estructura de cristal que muestra el esquema de numeración empleado. Los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópicos para los átomos distintos de de hidrógeno se muestran en el nivel de probabilidad del 50 %. Los átomos de hidrógeno se muestran con un radio arbitrariamente pequeño.

10 La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F² con peso $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0512P)^2 + (0,6810P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en un algoritmo de escala 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, R₁ convencional = 0,0294 en los valores F de 2486 reflexiones con F_o > 4 σ (F_o), S = 1,068 para todos los datos y 377 parámetros. Δ/σ (máx) final 0,001, Δ/σ (promedio), 0,000. Mapa de diferencia final entre +0,211 y -0,334 e Å⁻³.

15

Tabla 10. Parámetros de 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 de cristal	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	Cu K α , 1,54178Å				
F(000)	672				
T	100(1)K				
Cristal	Aguja incolora, 0,22 x 0,03 x 0,02 mm				
Datos truncados para	0,80 Å				
θ _{máx}	74,41°				
Plenitud	69,1 %				
Reflexiones	3062				
Reflexiones únicas	2607				
R _{int}	0,0198				

Ejemplo de referencia 23. Estabilidad a temperaturas elevadas y humedad relativa

20 Una muestra de Rp-4 se almacenó en una cámara de humedad a 40 °C y humedad relativa al 75 % durante una semana, y la muestra se analizó de nuevo por XRPD. El patrón de polvo obtenido para Rp-4 no mostró ningún

cambio sustancial durante el transcurso del experimento, lo que significa que no se observó ningún en la forma sólida. Esto debe contrastarse con una muestra de 4, que se convirtió en líquido en aproximadamente 16 horas tras el almacenamiento a 40 °C y una humedad relativa al 75 %. De hecho, se ilustra una ilustración de la naturaleza delicuescente de 4 mediante lo siguiente. Una muestra de 4 se pasó a través de un tamiz de 250 μm y después las muestras se almacenaron a 40 °C/HR al 75 % y 25 °C/humedad relativa al 53 % y se hicieron observaciones visuales a intervalos reguladores. Los resultados se dan en la Tabla 4.

Tabla 11. Estabilidad de 4 a humedad relativa elevada.

Condiciones	t = 1,5 h	t = 4,5 h	t = 6,5 h	t = 8,5 h	t = 73 h
40 °C/HR al 75 %	Delicuescencia	-	-	-	-
25 °C/HR al 53 %	Sin delicuescencia	Sólido pegajoso	Delicuescencia parcial	Delicuescencia casi completa	Delicuescencia

Tras el almacenamiento a 40 °C y humedad relativa al 75 %, una muestra de S_{P-4} se hizo delicuescente en 16 horas. Por ejemplo, una muestra de S_{P-4} se molió con un mortero, y después se pasó 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 una humedad relativa al 75 % y 25 °C y HR al 53 % y se hicieron observaciones visuales a intervalos regulares. Los resultados se dan en la Tabla 5.

Tabla 12. Estabilidad de S_{P-4} a humedad relativa elevada.

Condiciones	t = 1,5 h	t = 4,5 h	t = 104 h
40 °C/HR al 75 %	Sin delicuescencia	Delicuescencia	-
25 °C/HR al 53 %	Sin delicuescencia	Sin delicuescencia	Sin delicuescencia

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

Ejemplo de referencia 24. Transformada de Fourier - Espectrometría de infrarrojos (FT-IR)

Los datos se recogieron en un Perkin-Elmer Spectrum One equipado con un accesorio de muestreo de reflectancia total atenuada (ATR) universal. Los datos se recogieron y se analizaron usando el software Spectrum v 5.0.1.

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 mencionan a continuación:

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).

Ejemplo de referencia 25. Análisis termogravimétrico (TGA) por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los datos DSC se recogieron en un TA Instruments Q2000 equipado con un auto-muestreador de 50 posiciones. La calibración para la capacidad térmica se realizó usando zafiro y la calibración para la energía y temperatura se realizó usando indio certificado.

La temperatura modulada DSC se realizó en normalmente 0,8-1,2 mg de cada muestra, en un plato de aluminio agujereado, usando una velocidad de calentamiento subyacente de 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y parámetros de modulación de temperatura de $\pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y 40 segundos. Se mantuvo sobre la muestra una purga de nitrógeno seco a 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

El software de control del instrumental fue Advantage para Q Series v 2.8.0.392 y Thermal Advantage v 4.8.3 y los datos se analizaron usando Universal Analysis v 4.3A.

Los datos DSC se recogieron en un Mettler DSC 823e equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para la energía y la temperatura usando indio certificado. Normalmente, se calentaron 0,8-1,2 mg de cada muestra, en un plato de aluminio agujereado, a 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 25 °C a 250 °C. Se mantuvo sobre la muestra una purga de nitrógeno a 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. El software de control de los instrumentos y el análisis de datos fue STARe v 9.20.

Los datos TGA se recogieron en un Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para la temperatura usando indio certificado. Normalmente se cargaron 8-12 mg de cada muestra sobre un crisol de aluminio pesado previamente y se calentó a 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de la temperatura ambiente a 350 °C. Se mantuvo sobre la muestra una purga de nitrógeno a 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. El software de control de los

instrumentos y el análisis de datos fue STARe v 9.20.

- 5 El análisis por DSC de **4** mostró una endotermy amplia individual con una aparición de 58,7 °C (ΔH 14 J.g⁻¹) confirmada que se debe a la relajación molecular durante la transición vítrea por un análisis por DSC modulado adicionalmente (figura 17). El análisis por TGA de **4** no mostró ninguna pérdida de peso antes de la descomposición por encima de 240 °C, lo que conforma que el material estaba sin solvatar. Dado que el análisis por XRPD de **4** confirmó que el material era amorfo, el análisis por DSC modulada se llevó a cabo en un intento de calcular la temperatura de la transición vítrea, que se descubrió que era 57 °C.
- 10 El análisis por DSC mostró una única endotermy marcada con una aparición de 136,2 °C (ΔH 76 J.g⁻¹) que se confirmó que era una fusión por microscopía en fase caliente. Véase la figura 18. El análisis por TGA de *R_P-4* no mostró ninguna pérdida de peso antes de la descomposición por encima de 240 °C, lo que confirmó que el material estaba sin solvatar.
- 15 El análisis por DSC de *S_P-4* mostró una única endotermy amplia con una aparición de 93,9 °C (ΔH 43 J.g⁻¹) que se confirmó a una fusión por microscopía en fase caliente. Véase la figura 19. El análisis por TGA de *S_P-4* no mostró ninguna pérdida de peso antes de la descomposición por encima de 240 °C, lo que confirmó que el material estaba sin solvatar.

20 Ejemplo de referencia 26. Absorción de vapor gravimétrica (GVS)

SMS DVS intrínseco

25 Las isotermyas de absorción se obtuvieron usando un analizador de absorción de humedad SMS DVS intrínseco, controlado por el software SMS Analysis Suite. La temperatura de muestra se mantuvo a 25 °C por los controles del instrumento. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un caudal total de 200 ml.min⁻¹. La humedad relativa se midió por una sonda Rotronic calibrada (intervalo dinámico de HR al 1,0-100 %), situada cerca de la muestra. El cambio de peso, (relajación de la masa) de la muestra en función del % de HR se controló constantemente por la microbalanza (precisión $\pm 0,005$ mg).

30 Normalmente se pusieron 5-20 mg de muestra en una cesta de acero inoxidable de malla tarada en condiciones ambientales. La muestra se cargó y se descargó a una HR del 40 % y 25 °C (condiciones ambientales típicas). Se realizó una isotermya de absorción de la humedad como se describe a continuación (2 barridos dando 1 ciclo completo). La isotermya estándar se realizó a 25 °C a intervalos de HR al 10 % sobre un intervalo de HR al 0,5-90 %.

35

Tabla 13. Parámetros del método para experimentos SMS DVS intrínsecos

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

La muestra se recuperó después de la finalización de la isotermya y se analizó de nuevo por XRPD.

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

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

50 Ejemplo de referencia 27. Solubilidad acuosa termodinámica

55 La solubilidad acuosa se determinó suspendiendo una cantidad suficiente de compuesto en agua para dar una concentración final máxima de ≥ 10 mg.ml⁻¹ de la forma libre de partida del compuesto. La suspensión se equilibró a 25 °C durante 24 horas y después se midió el pH. Después, la suspensión se filtró a través de un filtro C de fibra de vidrio en una placa de 96 pocillos. Después, el filtrado se diluyó en un factor de 101. La cuantificación fue por HPLC con referencia a una solución estándar de aproximadamente 0,1 mg.ml⁻¹ en DMSO. Se inyectaron diferentes

volúmenes de las soluciones de muestra diluidas y no diluidas estándar. La solubilidad se calculó usando las áreas pico determinadas por la integración del pico observado al mismo tiempo de retención que el pico principal en la inyección estándar.

5

Tabla 14. Parámetros del método por HPLC para mediciones de solubilidad

Tipo de método:	Fase inversa con gradiente de elución		
Columna:	Phenomenex Luna, C18 (2) 5 µm 50 x 4,6 mm		
Temperatura de columna (°C):	25		
Inyecciones estándar (µl):	1, 2, 3, 5, 7, 10		
Inyecciones de ensayo (µl):	1, 2, 3, 10, 20, 50		
Detección:	260,80		
Longitud de onda, ancho de banda (nm) :	260,80		
Caudal (ml.min ⁻¹):	2		
Fase A:	TFA al 0,1 % en agua		
Fase B:	TFA al 0,085 % en acetonitrilo		
Planificación:	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 realizó en las condiciones que se han indicado anteriormente en un sistema de la serie Agilent HP 1100 equipado con un detector de matriz de diodos y usando el software ChemStation vB.02.01-SR1.

10

Tabla 15. Resultado de solubilidad acuosa para *R_P-4*, *4*, y *S_P-4*.

Muestra ID	pH de mezcla no filtrada	Solubilidad/mg. ml ⁻¹	Comentarios
<i>R_P-4</i>	7,12	1,58	Suspensión
4	7,03	6,11	Sólido residual
<i>S_P-4</i>	6,88	5,65	Sólido residual

Ejemplo de referencia 28. Determinación de la pureza química por HPLC

15

Pueden usarse diversas condiciones de HPLC para determinar la pureza química de los compuestos desvelados en el presente documento. Un de dichos ejemplos se ha desvelado anteriormente en relación con los estudios de solubilidad acuosa termodinámica. Otro ejemplo se desvela a continuación.

Condiciones de HPLC:

LC:	Módulo de separaciones Waters Alliance 2695, detector Waters 2996 PDA y software Waters Empower 2 (Versión 6.00)
Columna:	Phenomenex 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 % Agua con Metanol al 5 % y acetato de amonio 10 mM; pH ~5,3 Disolvente B: MeOH con acetato de amonio 10 mM
Gradiente:	mantenimiento en 0 % de B 3 min 0-47 % de B 3-4 min mantenimiento en 47 % de B 4-10 min 47 %-74 % de B 10-11 min mantenimiento en 74 % de B 11-13,5 min regreso al 0 % de B 13,5-13,6 min mantenimiento en 0 % de B 13,6-15,5 min

20

En estas condiciones, la pureza de **4**, *R_P-4*, y *S_P-4* se determinó que era del ~99,6 %, ~99 %, y ~99,5 %, respectivamente. Se aprecia que pueden conseguirse mayores purezas optimizando los métodos desvelados anteriormente.

25

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

Ejemplo de referencia 29. Métodos de separación adicionales

La siguiente separación por SFC (condiciones enumeradas a continuación) produjo la separación adecuada de una mezcla de los 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)
metanol al 20 %/CO ₂ (100 bar)	metanol al 20 %/CO ₂ (100 bar)
50 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
Conc.: 260 mg/30 ml de metanol, vol. de iny.: 1,5 ml	

5

La siguiente separación por SFC (condiciones enumeradas a continuación) produjo una separación adecuada de una mezcla de los 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)
isopropanol al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO ₂ , 100 bar	metanol al 40 % (DEA)/CO ₂ , 100 bar
60 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
vol. de iny.: 2 ml, 20 mg/ml de metanol	

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

Análisis	R_P-4	4	S_P-4
RMN de protón	Diastereoisómero individual	Mezcla 1:1 de diastereoisómeros	Diastereoisómero individual
XRPD	Cristalino - diferente de S_P-4	Amorfo	Cristalino - diferente de R_P-4
DSC	Endotermia; fusión - 136 °C	Endotermia; 59 °C	Endotermia; 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 HPLC	96,9 %	99,6 %	99,5 %
40 °C/HR al 75 %	Sin cambio de forma	Delicuescencia en 1,5 h	Delicuescencia en 4,5 h
25 °C/HR al 53 %		Delicuescencia	Sin cambio de forma
GVS	No higroscópico hasta HR al 90 %		No higroscópico hasta HR al 60 %

10

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

El compuesto **8** (isómero S_P), C₁₈H₂₁N₂PO₇, cristaliza en el grupo espacial monoclinico P2₁ (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 d_{calc}=1,397 g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron en un detector de área Bruker APEXII CCD empleando radiación Mo-Kα monocromada por grafito (λ = 0,71073 Å) a una temperatura de 100(1)K. Las figuras 20A y 20B muestran moléculas numeradas 1 y 2, respectivamente, de la unidad asimétrica.

15

La indexación preliminar se realizó a partir de una serie de treinta y seis cuadros de rotación a 0,5° con exposiciones de 30 segundos. Se recogieron un total de 3608 cuadros con un cristal a una distancia del detector de 70,00 mm, anchuras de rotación de 0,5° y exposiciones de 20 segundos:

20

tipo de barrido	2θ	ω	φ	χ	cuadros
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 cuadros de rotación se integraron usando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos) produciendo una lista de valores no promediados F² y σ(F²) que después se pasaron al paquete de programas SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos) para un procesamiento adicional y una solución de la estructura en un ordenador Dell Pentium 4. Se midieron un total de 6909 reflexiones sobre los intervalos 1,58 ≤ θ ≤ 25,09°, -6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28 produciendo 6909 reflexiones únicas (R_{int} = 0,0581). Los datos de intensidad se corrigieron para los efectos Lorentz y de polarización y para la absorción usando SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Alemania) (transmisión mínima y máxima 0,6093, 0,7452).

25

30

La estructura se resolvió por métodos directos (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64,112-122,)). El refinamiento fue por 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 peso 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 diferentes de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de soporte. El refinamiento convergió en $R1 = 0,0847$ y $wR2 = 0,1899$ para 6173 reflexiones observadas para las que $F > 4\sigma(F)$ y $R1=0,0963$ y $wR2 = 0,1963$ y $GOF = 1,119$ para todas las 6909 reflexiones no nulas únicas y 512 variables ($R1 = \sum ||F_o|-|F_c||/\sum |F_o|$; $wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2/\sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2/(n - p)]^{1/2}$; donde $n =$ el número de reflexiones y $p =$ el 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 $e/\text{Å}^3$.

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

Fórmula empírica	$C_{18}H_{21}N_2PO_7$
Peso de la fórmula	408,34
Temperatura	100(1) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	monoclínico
Grupo espacial	$P2_1$
Constantes celulares	
a	5,3312(4) Å
b	15,3388(8) Å
c	23,7807(13) Å
β	92,891(3) $^\circ$
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
Rango Theta para recogida de datos	1,58 a 25,09 $^\circ$
Rangos de índice	-6 $\leq h \leq 6$, -18 $\leq k \leq 18$, -28 $\leq l \leq 28$
Reflexiones recogidas	6909
Reflexiones independientes	6909 [R(int) = 0,0581]
Plenitud hasta theta = 25,09 $^\circ$	99,6 %
Corrección de absorción	Semi-empírica de equivalentes
Transmisión máx. y mín.	0,7452 y 0,6093
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F^2
Datos/restricciones/parámetros	6909/1/512
Bondad de ajuste en F^2	1,119
Índices R finales [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0847$, $wR2 = 0,1899$
Índices R (todos los datos)	$R1 = 0,0963$, $wR2 = 0,1963$
Parámetro de estructura absoluta	0,1(2)
Pico y orificio de dif. mayor	0,402 y -0,559 $e \cdot \text{Å}^{-3}$

15

Ejemplo de referencia 31. Actividad biológica

Se sembraron células que contenían replicón a 3.000 células/pocillo (50 μ l) en placas blancas/opacas de 96 pocillos, o a 1.500 células/pocillo (25 μ l) en placas blancas/opacas de 384 pocillos. Se añadieron 50 μ l de compuesto 2X en la placa de 96 pocillos o se añadieron 25 μ l de compuesto 2X en la placa de 384 pocillos. Las placas se incubaron a 37 $^\circ$ C en una atmósfera de CO_2 humidificada al 5 % durante 4 días. Tras la incubación, se añadió el reactivo Bright-Glo (50 μ l para la placa de 96 pocillos, o 25 μ l para la placa de 384 pocillos) para medir el indicador de luciferasa de luciérnaga para la replicación del VHC. El porcentaje de inhibición se calculó frente al control sin fármaco.

25

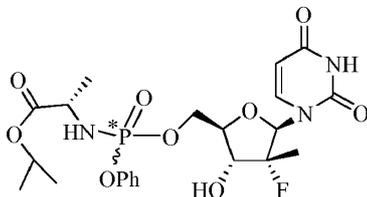
Compuesto	Actividad del replicón de VHC (μ M)
4	0,58
R_p - 4	2,87
S_p - 4	0,13

Se ha demostrado que R_p -**4**, o S_p -**4** tienen una amplia cobertura de genotipo. Por ejemplo, se ha demostrado que ambos son activos frente a los genotipos 1-4 del virus de la hepatitis C.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un compuesto representado por la fórmula 4, o un diastereómero a base de fósforo del mismo:

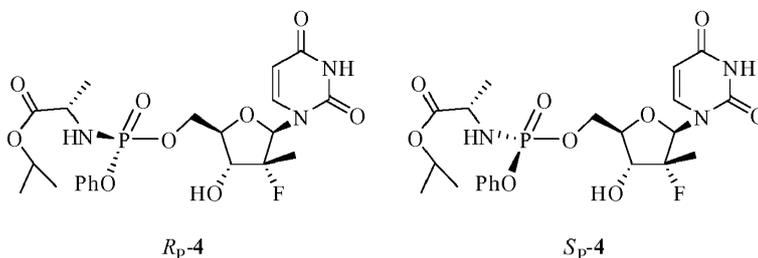
5



4

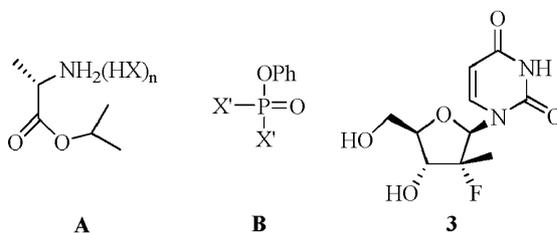
en la que P* representa un átomo de fósforo quiral, y en la que dicho diastereómero a base de fósforo se representa por las fórmulas R_P -4 o S_P -4:

10



que comprenden:

15 a) hacer reaccionar un alanato de isopropilo, A, un di- X' -fenilfosfato, B, 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, 3, y una base para obtener una primera mezcla que comprende 4, o el diastereómero a base de fósforo del mismo;



20 en donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y X' es un halógeno
 b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto protector para obtener una segunda mezcla que comprende 4, o el diastereómero a base de fósforo del mismo, en donde el compuesto protector se selecciona de entre un compuesto protector t-butildimetilsililo y un compuesto protector dimetoxitriphenilmetilo; y
 25 c) someter opcionalmente la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción con el fin de obtener 4, o el diastereómero a base de fósforo del mismo.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es cloruro y n es 1.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que A es anhídrido.

30

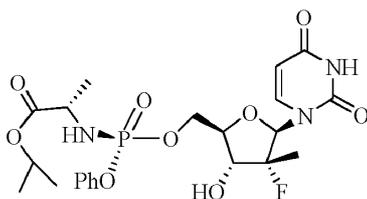
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la base es N-metilimidazol.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación molar de A con respecto a B con respecto a 3 es 1,6 con respecto a 1,3 con respecto a 1.

35

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto protector es cloruro de t-butildimetilsililo.

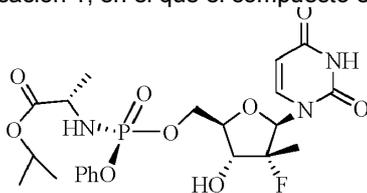
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es R_P -4:



R_p-4

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que X es cloruro y n es 1.
- 5 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que A es anhídrido.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la base es N-metilimidazol.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la relación molar de A con respecto a B con respecto a 3 es 1,6 con respecto a 1,3 con respecto a 1.
- 10 12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el compuesto protector es cloruro de t-butildimetilsililo.
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el *R_p-4* es cristalino, que comprende adicionalmente:
- 15 d) disolver o suspender la segunda mezcla o el *R_p-4* purificado en un disolvente;
 e) seguido opcionalmente de siembra con *R_p-4* cristalino; y
 f) añadir suficiente anti-disolvente para obtener *R_p-4* cristalino.

- 20 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es *S_p-4*:

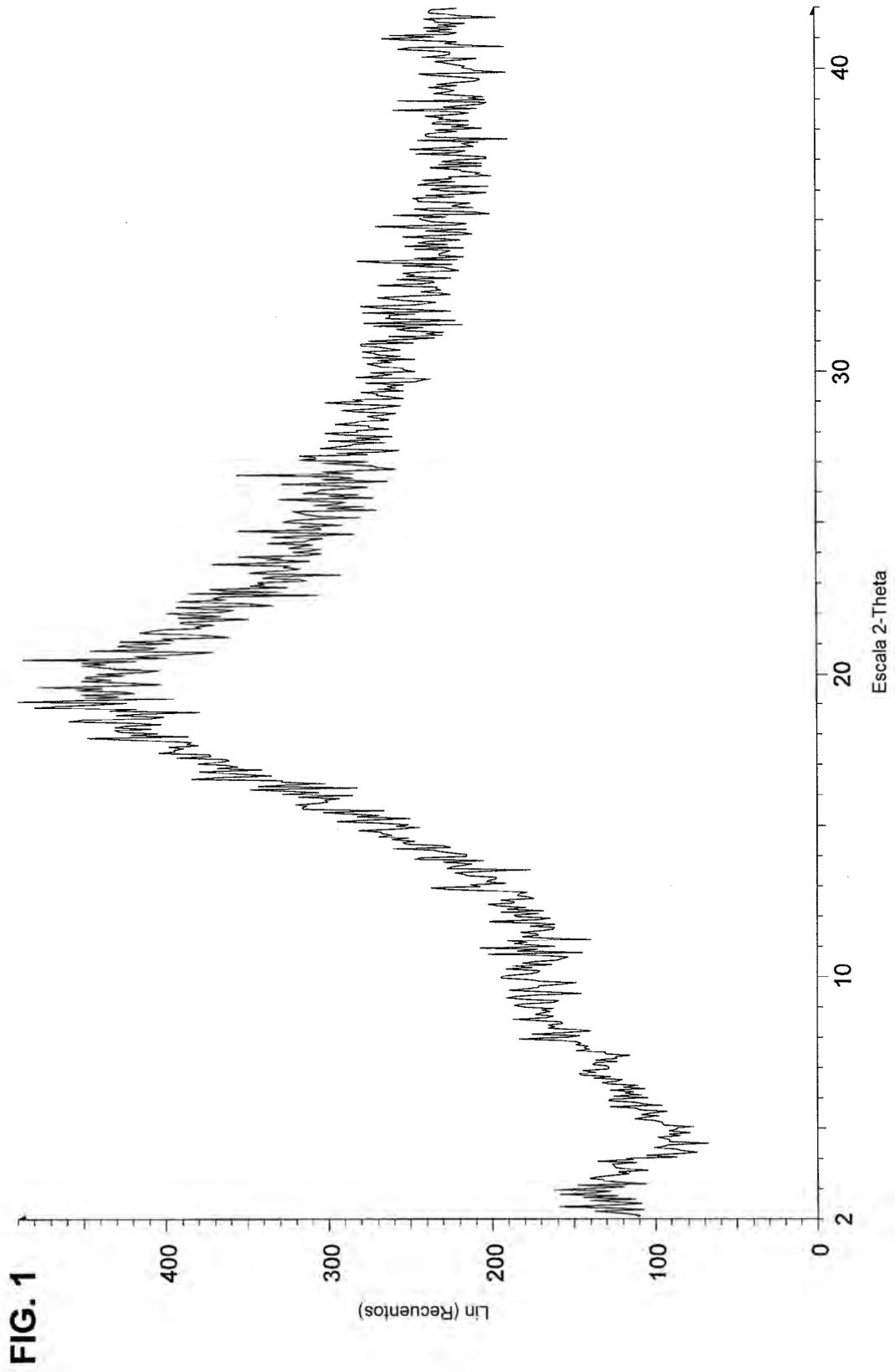


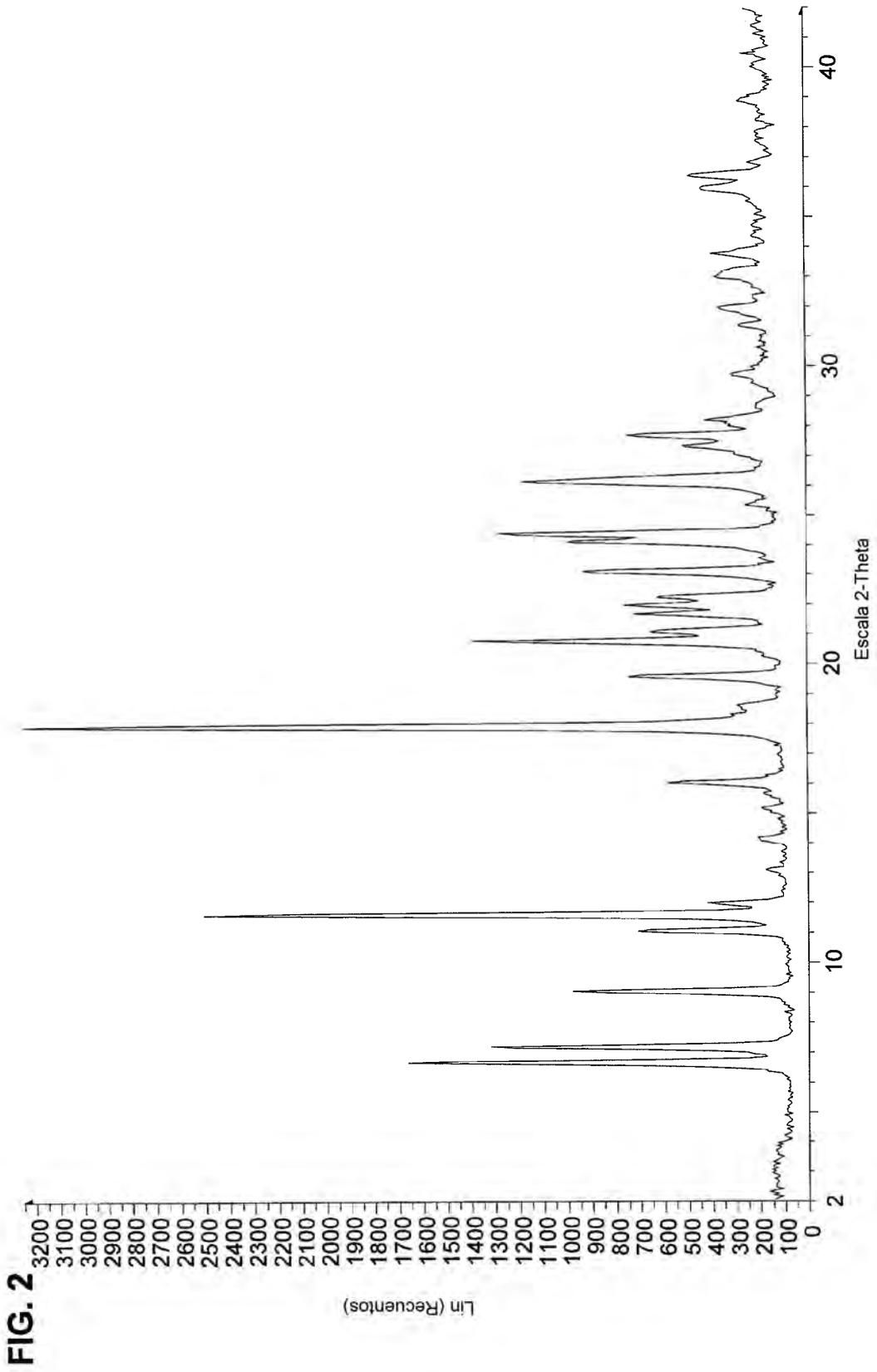
S_p-4

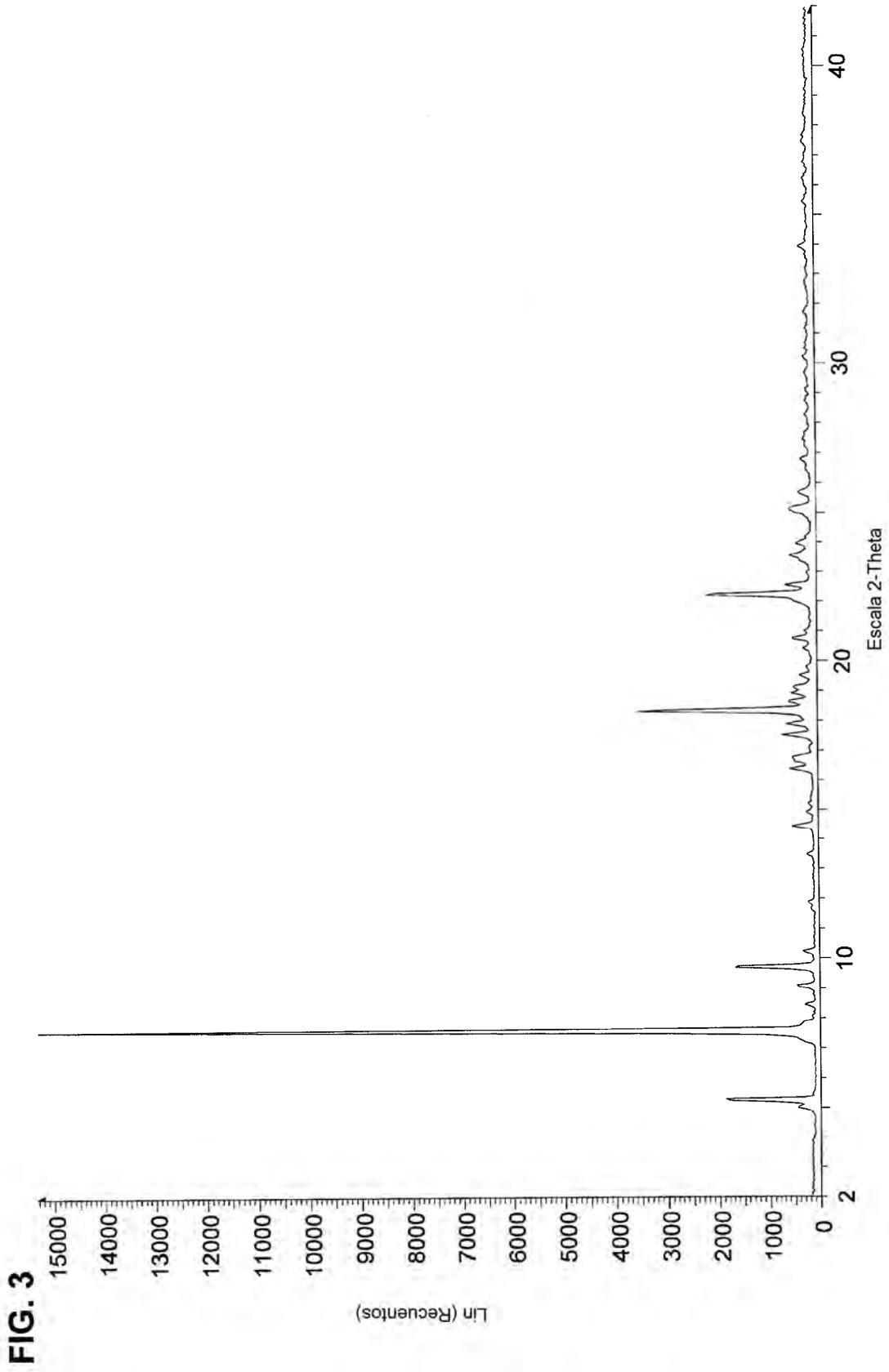
15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que X es cloruro y n es 1.
- 25 16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que A es anhídrido.
17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la base es N-metilimidazol.
18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la relación molar de A con respecto a B con respecto a 3 es 1,6 con respecto a 1,3 con respecto a 1.
- 30 19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el compuesto protector es cloruro de t-butildimetilsililo.
20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el *S_p-4* es cristalino, que comprende adicionalmente:
- 35 d) disolver o suspender la segunda mezcla o el *S_p-4* purificado en un disolvente seguido de siembra con *S_p-4* cristalino a temperatura ambiente;
 e) recoger un primer sólido, la mayor parte del cual comprende *S_p-4*;
 f) disolver o suspender el primer sólido en un disolvente a su temperatura de reflujo; y
 g) enfriar o añadir un anti-disolvente para obtener un segundo sólido.
- 40 21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el *S_p-4* es cristalino, que comprende adicionalmente:
- 45 d) disolver o suspender la segunda mezcla o el *S_p-4* purificado en un primer disolvente seguido de la adición de un anti-disolvente para obtener una primera composición en la que el disolvente/anti-disolvente residual se elimina por decantación para obtener un residuo;
 e) tratar el residuo con una solución que contiene el primer disolvente y anti-disolvente para producir una segunda composición por lo que tras reducir la presión produce un primer sólido;
 f) disolver o suspender el primer sólido usando un segundo disolvente para obtener una tercera composición;
 g) añadir cristales de siembra de *S_p-4* a la tercera composición;
- 50

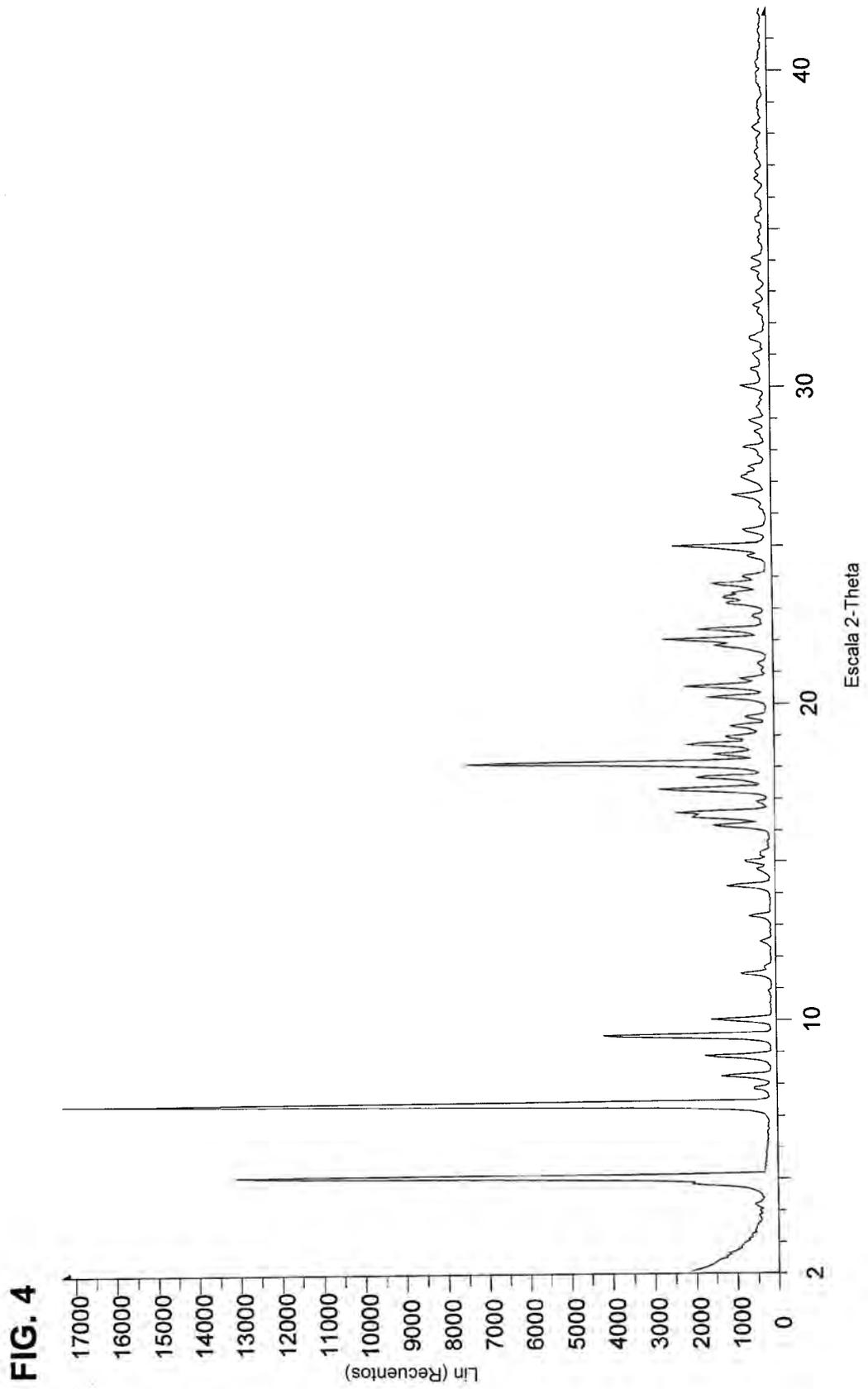
- h) recoger un segundo sólido;
- i) disolvente o suspender el segundo sólido en un tercer disolvente, opcionalmente calentado a la temperatura de reflujo del tercer disolvente para obtener una cuarta composición, y, si es necesario,
- j) enfriar la cuarta composición para obtener un tercer sólido que comprende S_{P-4} que se recoge por filtración.

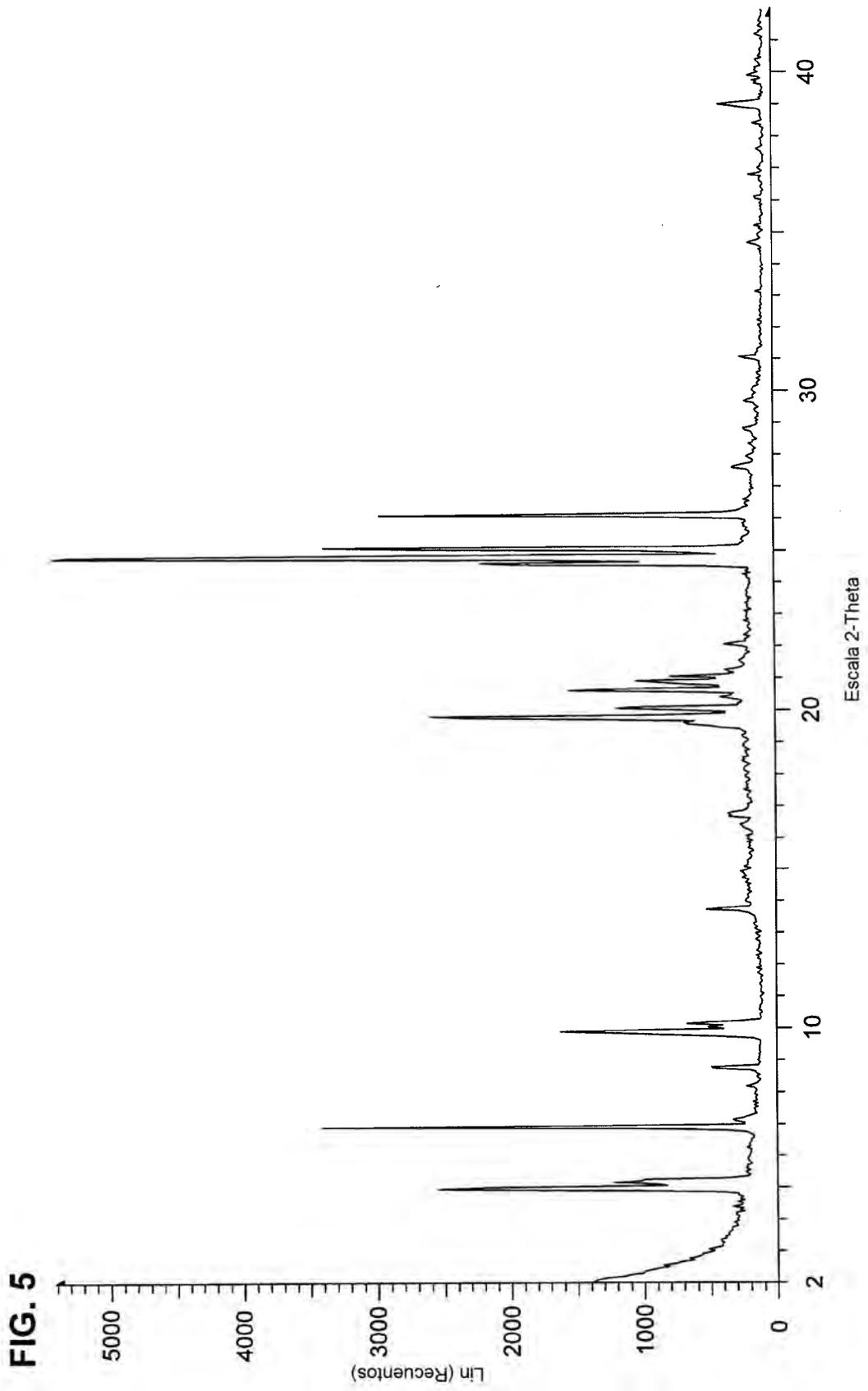
- 5
22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el S_{P-4} es cristalino, que comprende adicionalmente:
- d) añadir gel de sílice a la segunda mezcla o a la tercera mezcla seguido de evaporación del disolvente para proporcionar una suspensión seca;
 - 10 e) agitar la suspensión seca en una primera combinación de disolvente/anti-disolvente para obtener una primera suspensión húmeda;
 - f) decantar la primera combinación de disolvente/anti-disolvente de la primera suspensión húmeda para obtener una segunda suspensión húmeda y una primera composición;
 - 15 g) añadir a la segunda suspensión húmeda una segunda combinación de disolvente/anti-disolvente seguido de agitación;
 - h) decantar la segunda combinación de disolvente/anti-disolvente de la segunda suspensión húmeda para obtener una tercera suspensión húmeda y una segunda composición
 - i) repetir opcionalmente las etapas g)-h) en la tercera suspensión húmeda o las suspensiones húmedas adicionales;
 - 20 j) evaporar el disolvente de la segunda composición, y opcionalmente cualquier composición adicional obtenida de la etapa opcional i) para obtener un primer sólido;
 - k) disolver o suspender el primer sólido en una solución que contiene un tercer disolvente y opcionalmente un cuarto disolvente para obtener una tercera composición;
 - l) añadir opcionalmente cristales de siembra de S_{P-4} a la tercera composición;
 - 25 m) obtener de la tercera composición un segundo sólido que comprende S_{P-4} ; y
 - n) recristalizar opcionalmente el segundo sólido usando un tercer disolvente para obtener un tercer sólido que comprende S_{P-4} .

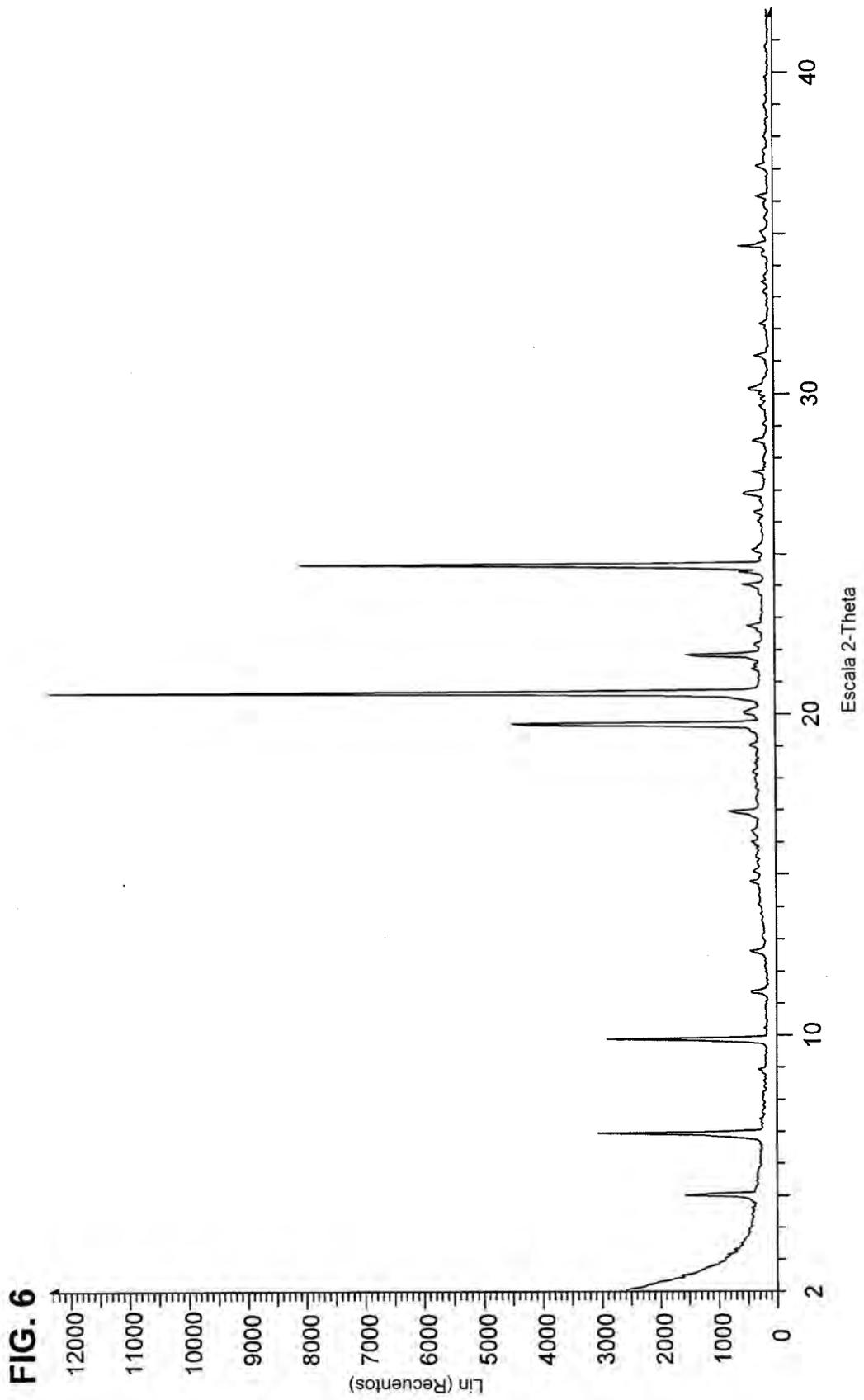


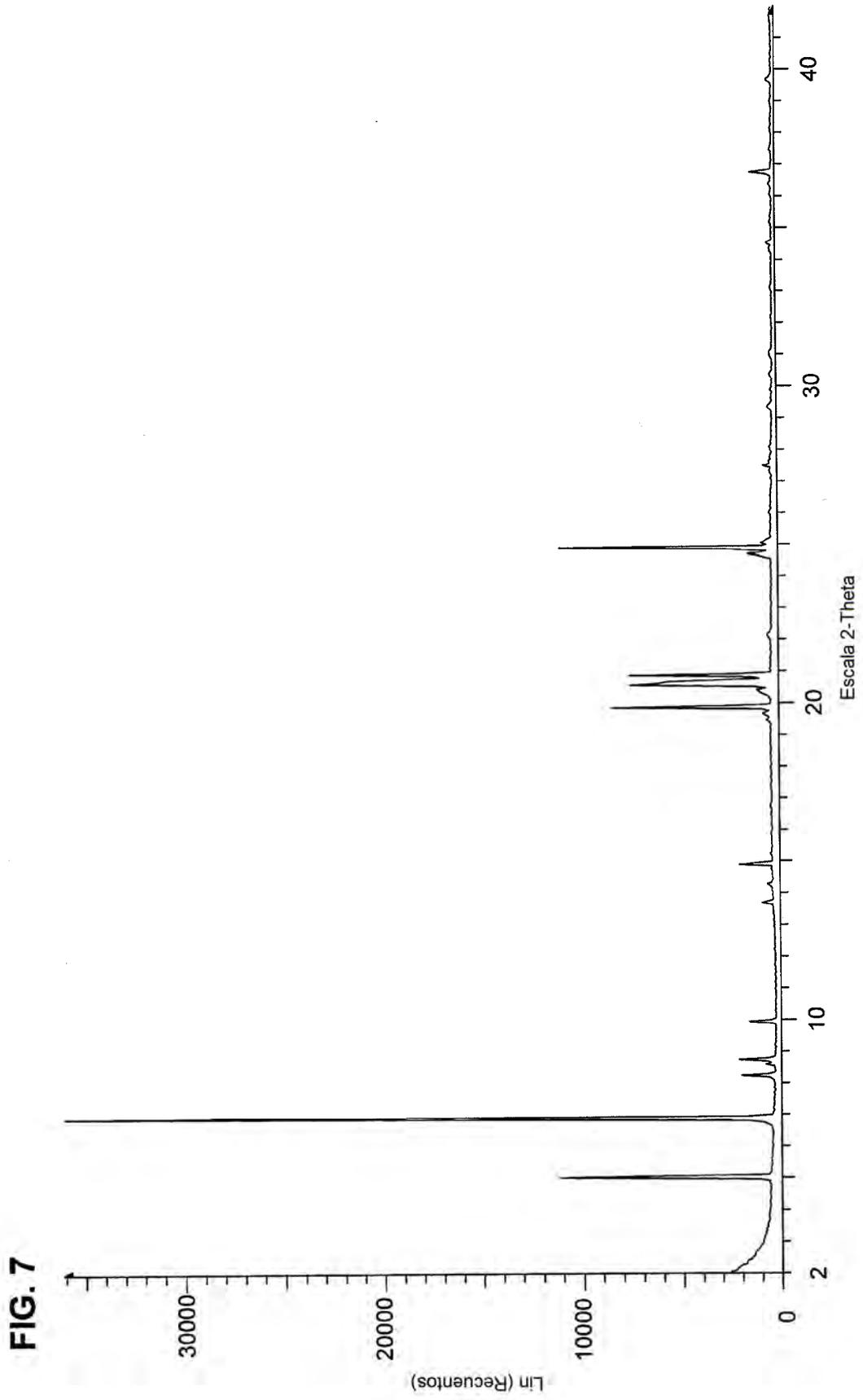












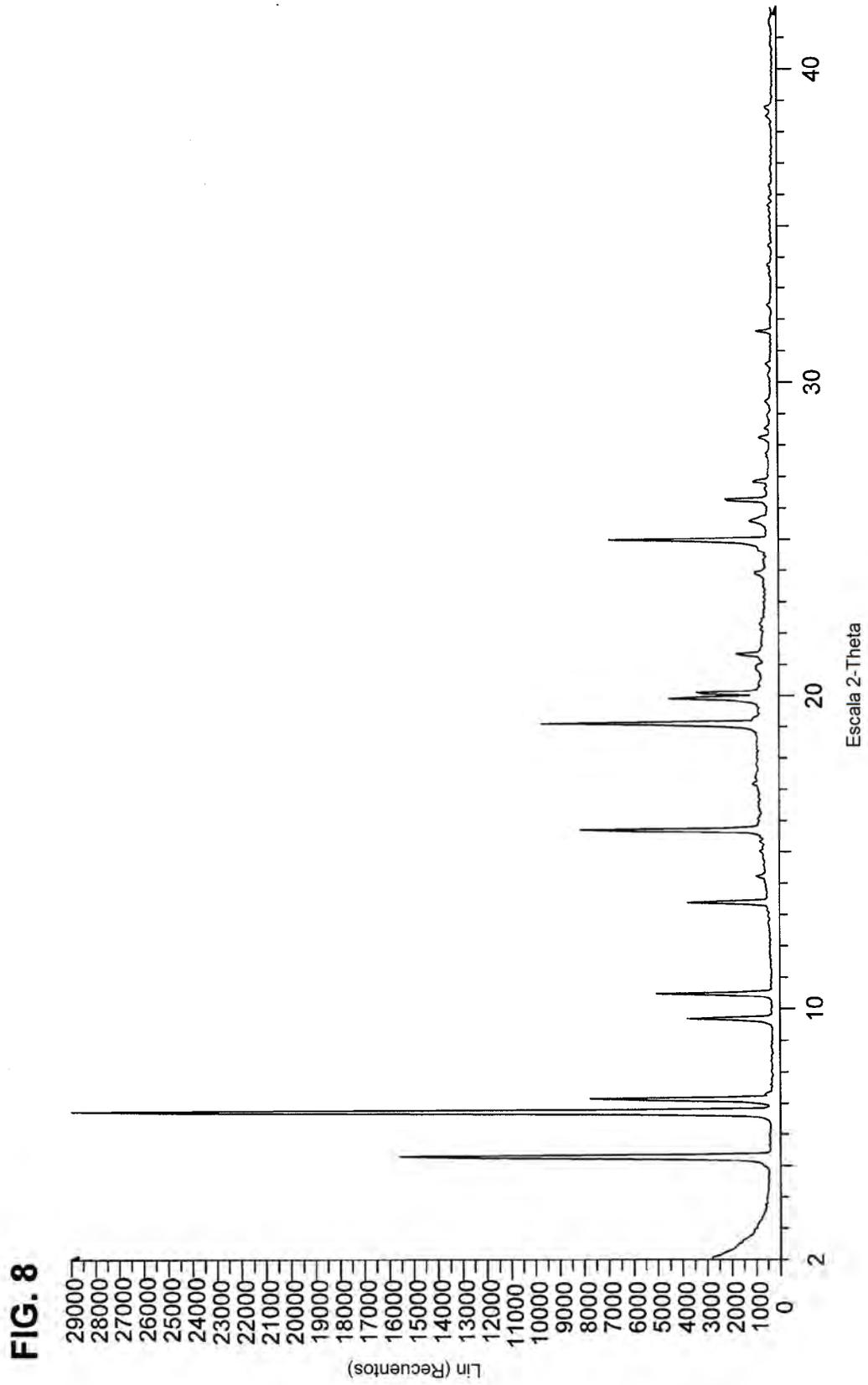
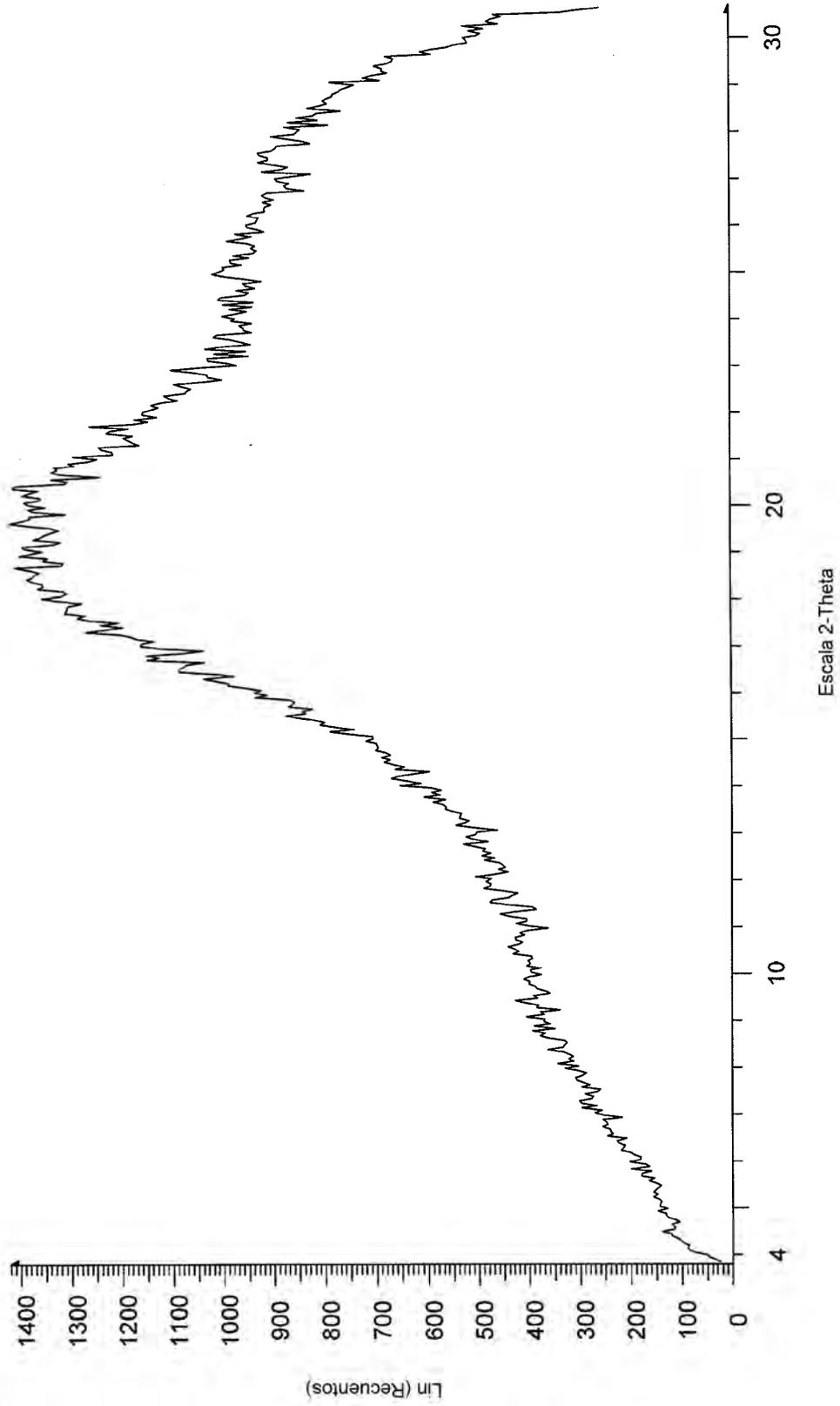


FIG. 9



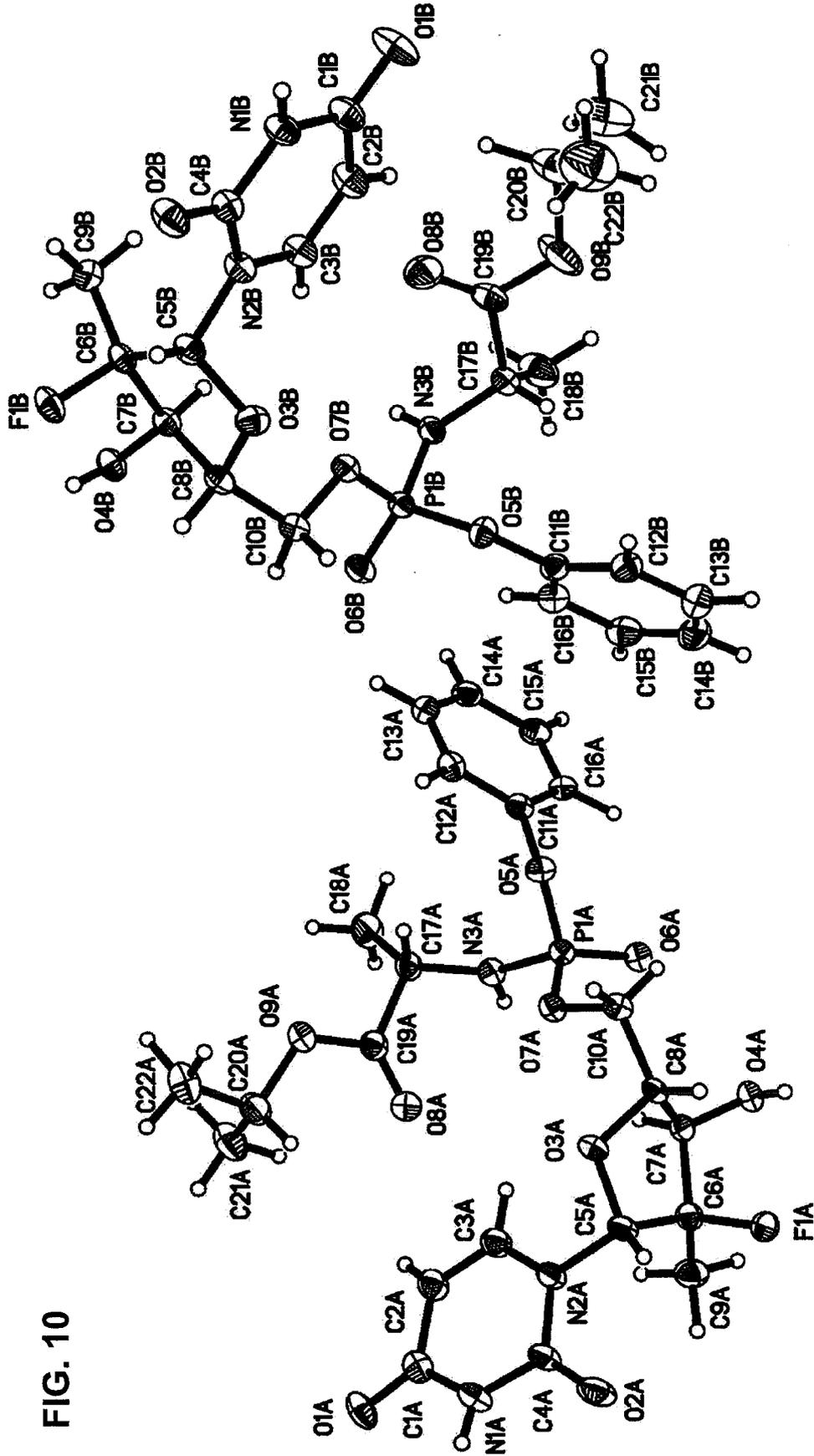
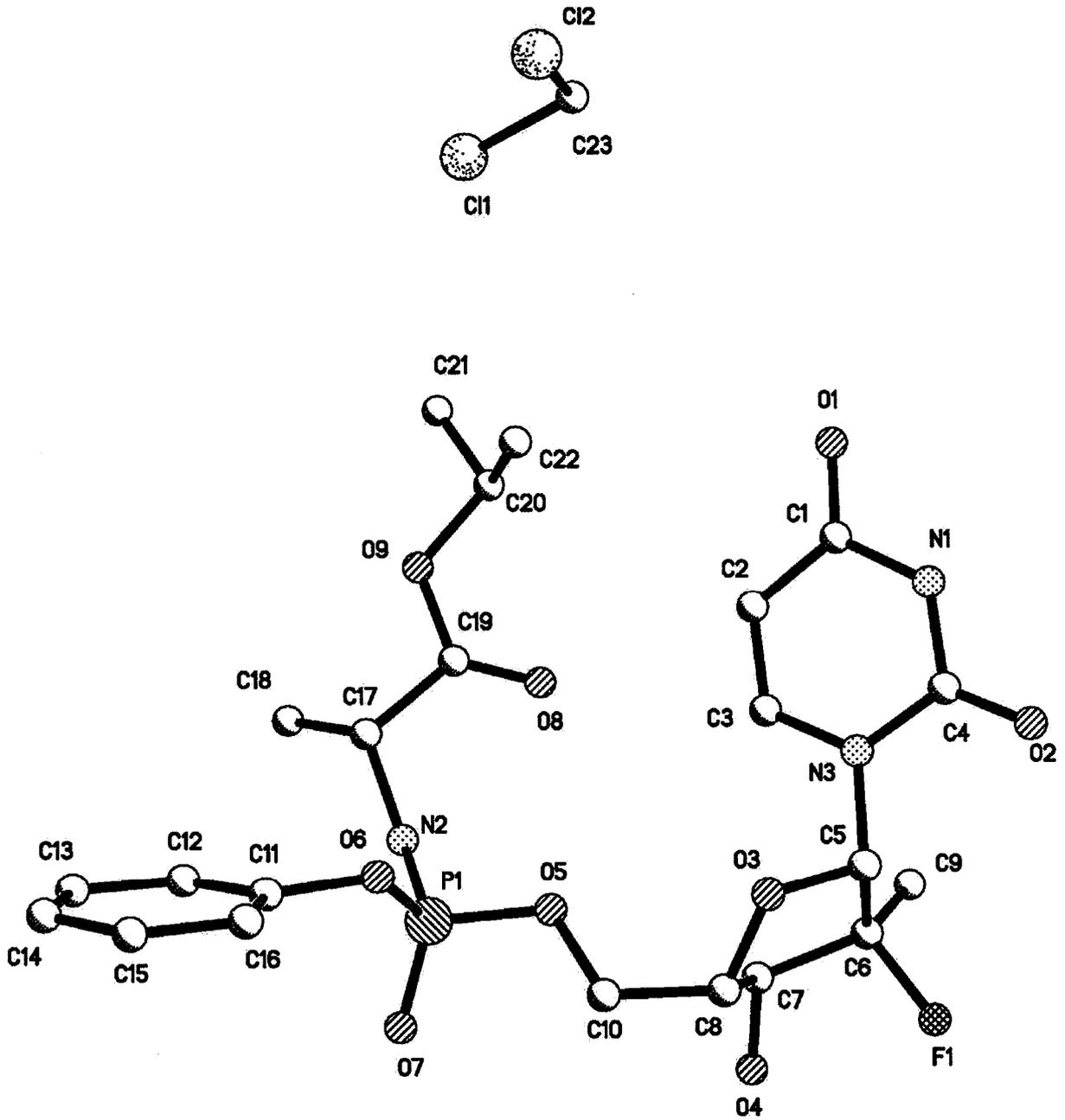


FIG. 10

FIG. 11



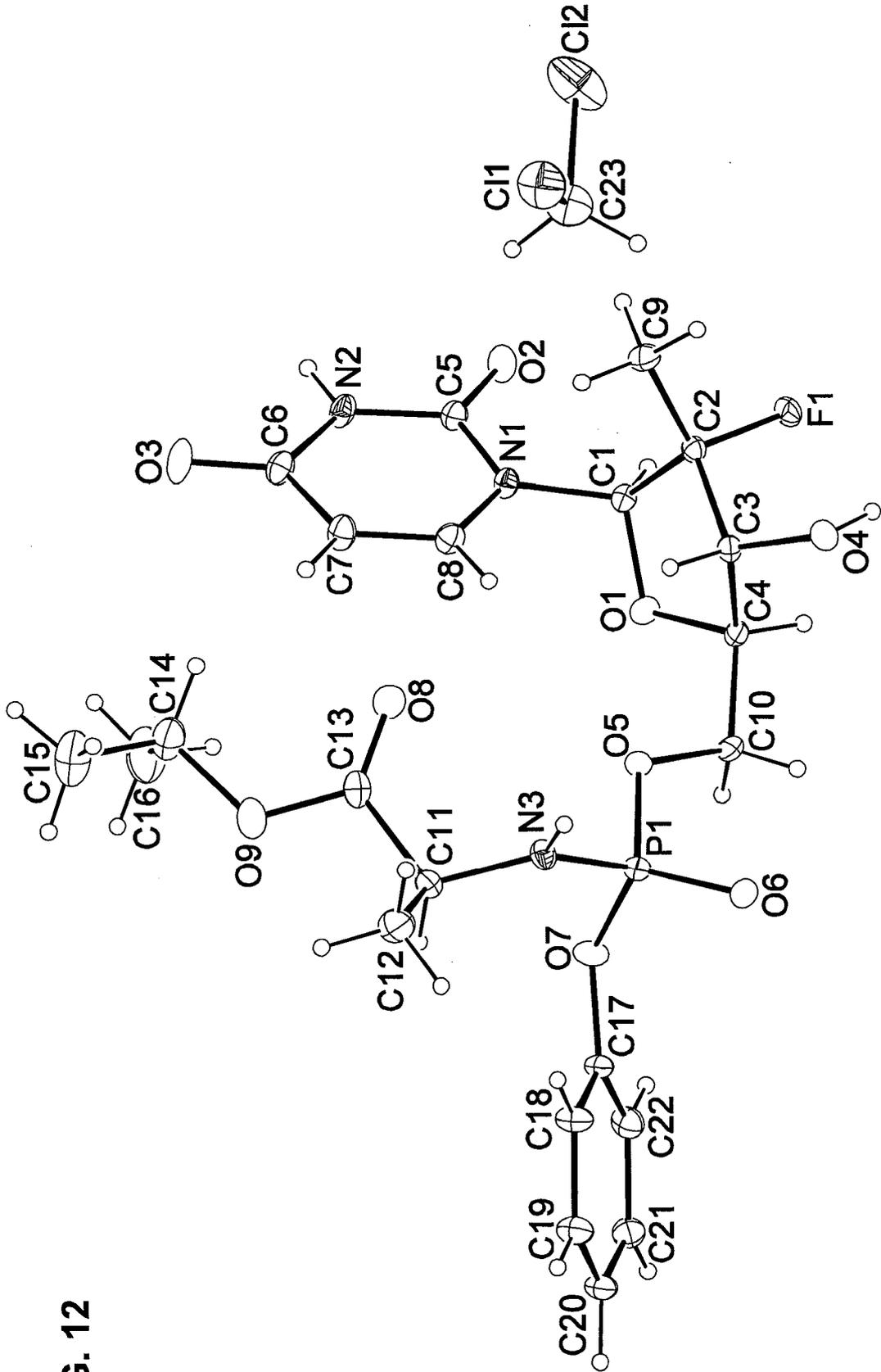


FIG. 12

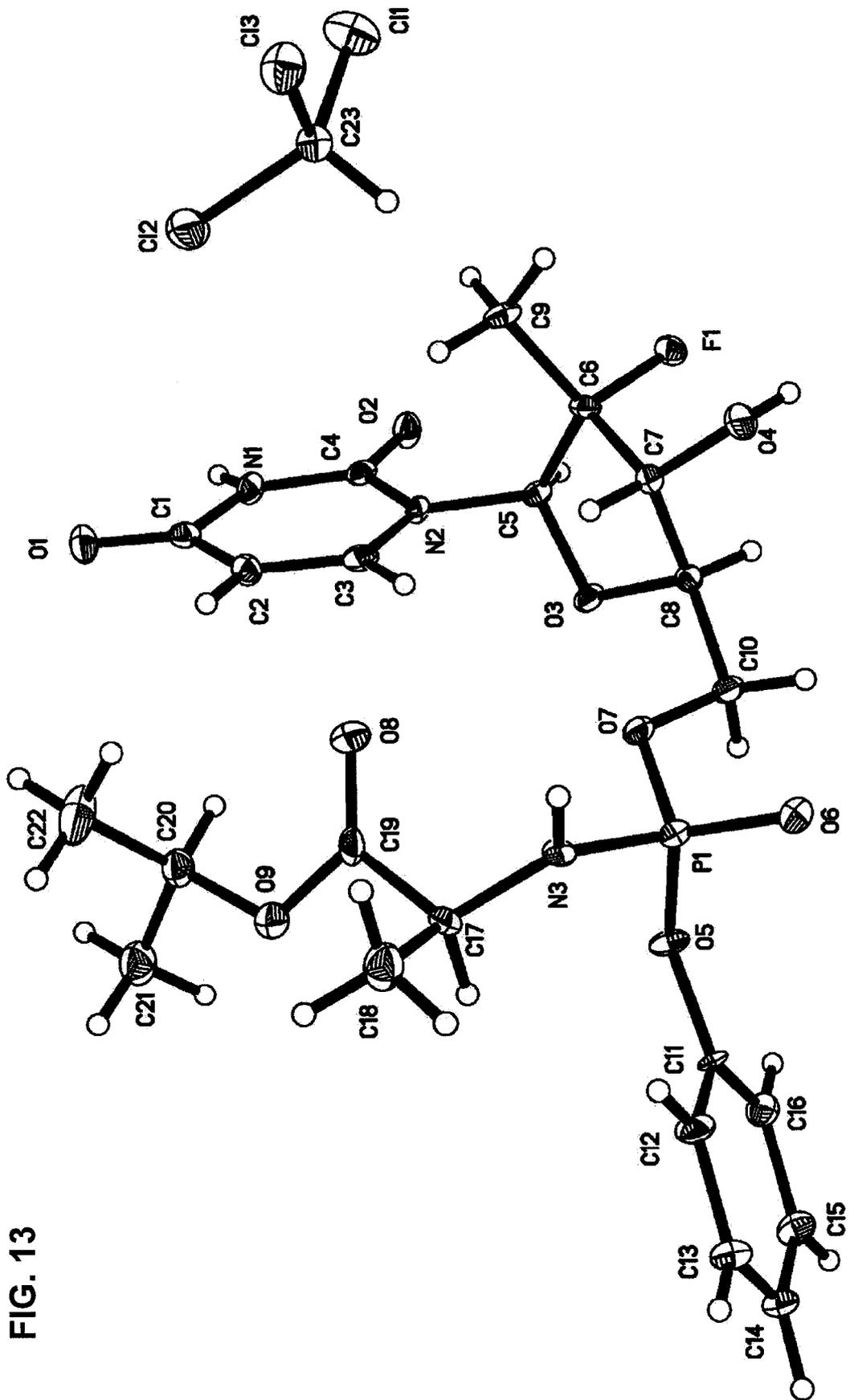
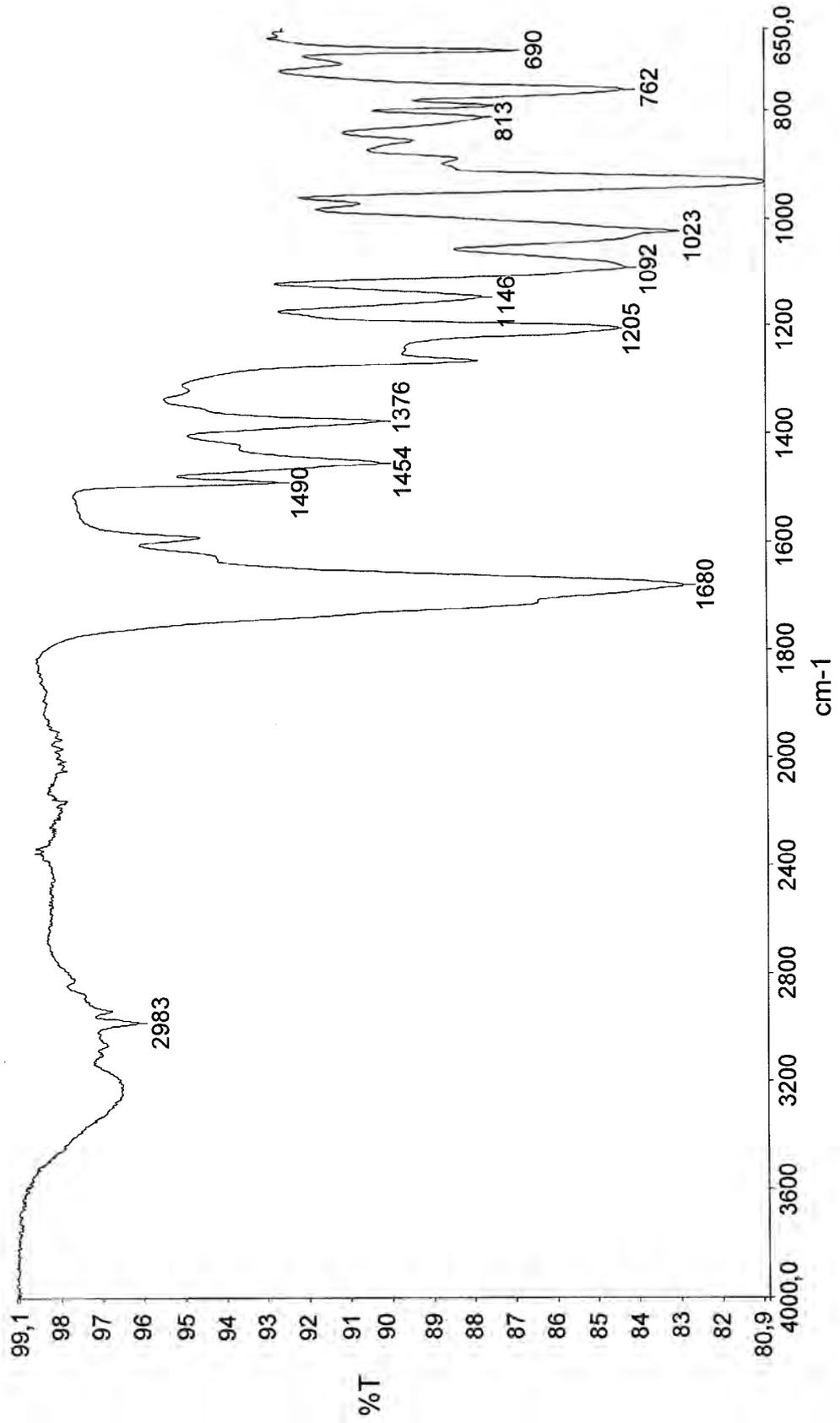
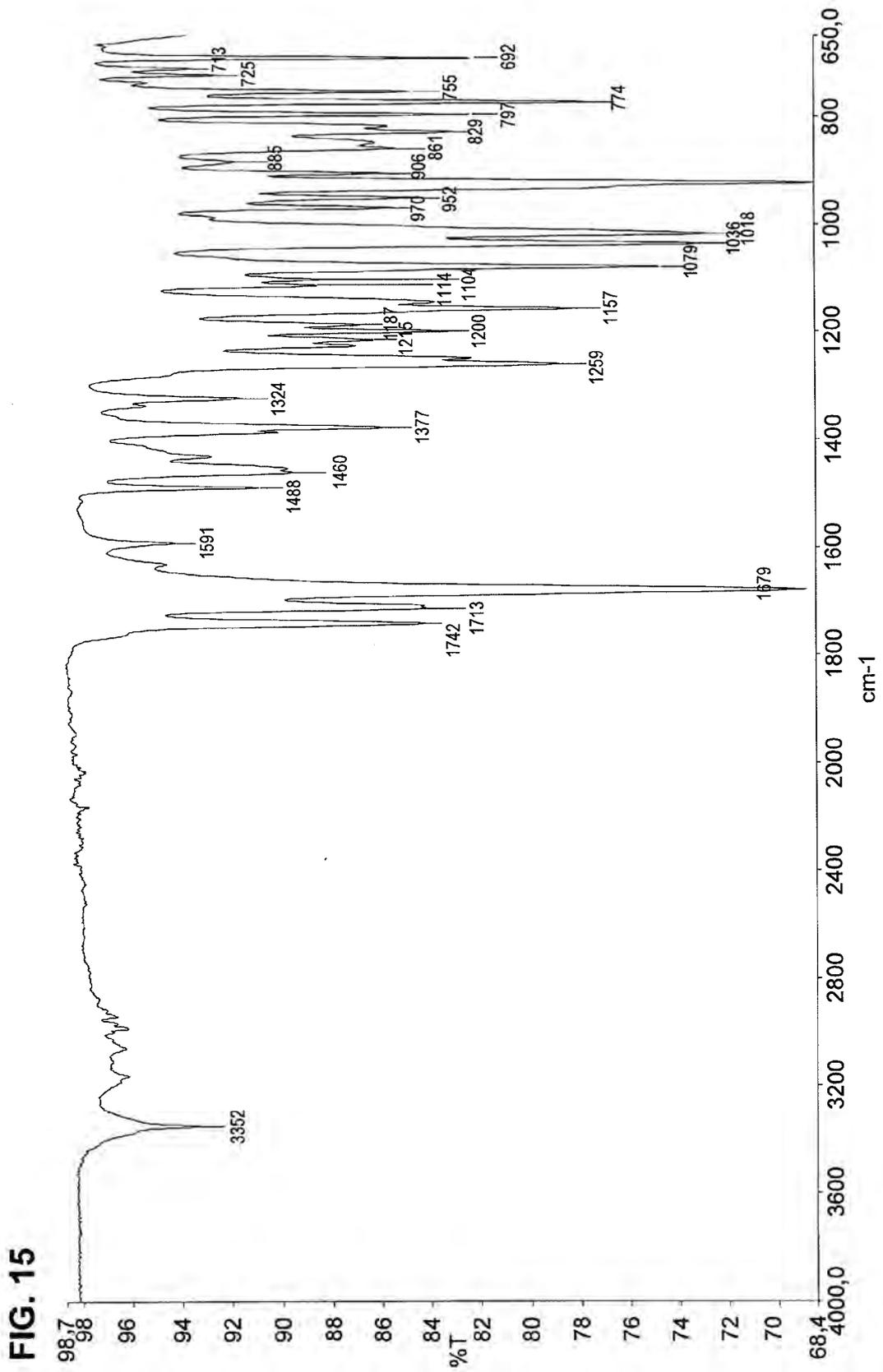


FIG. 13

FIG. 14





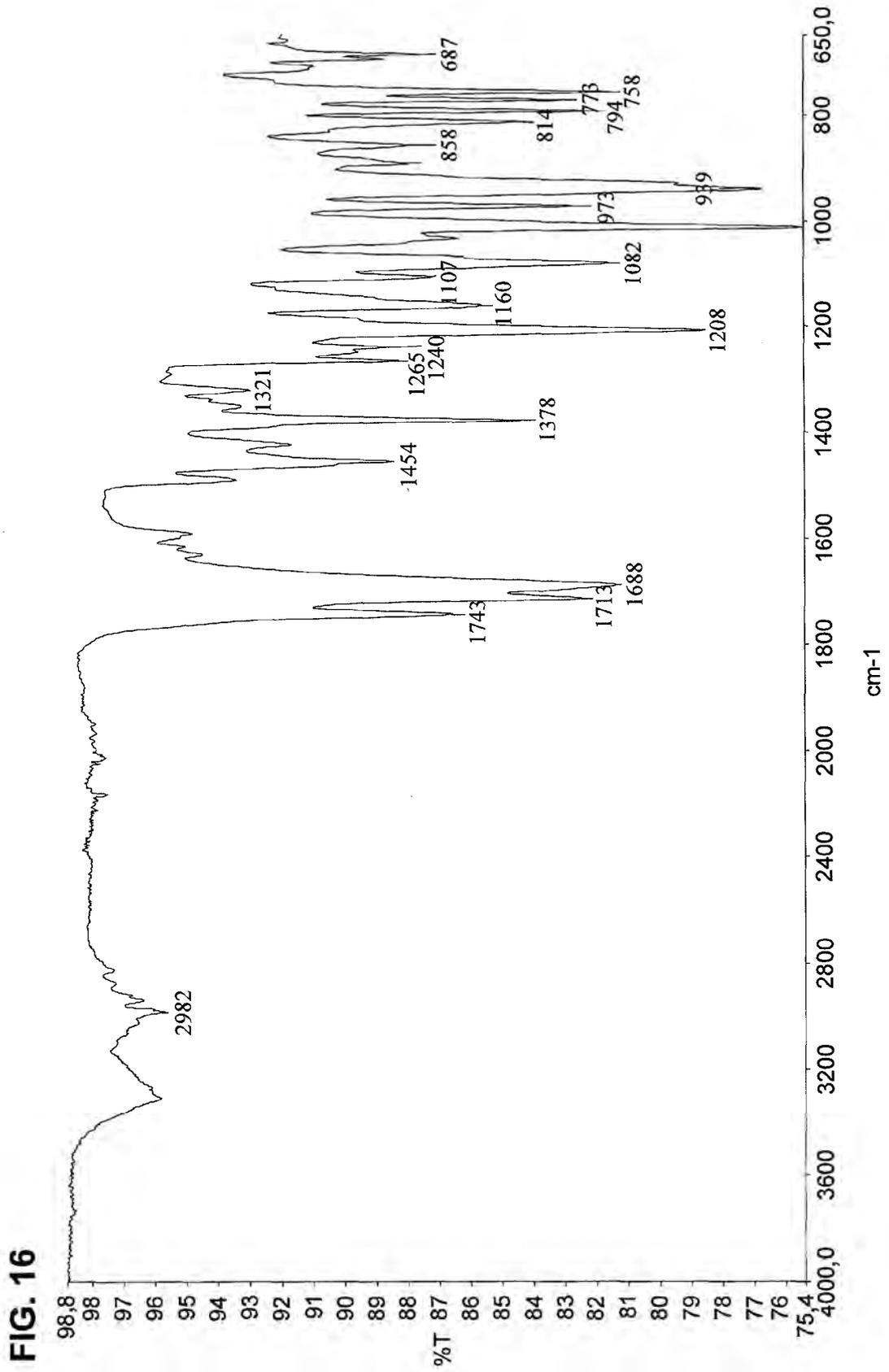


FIG. 17

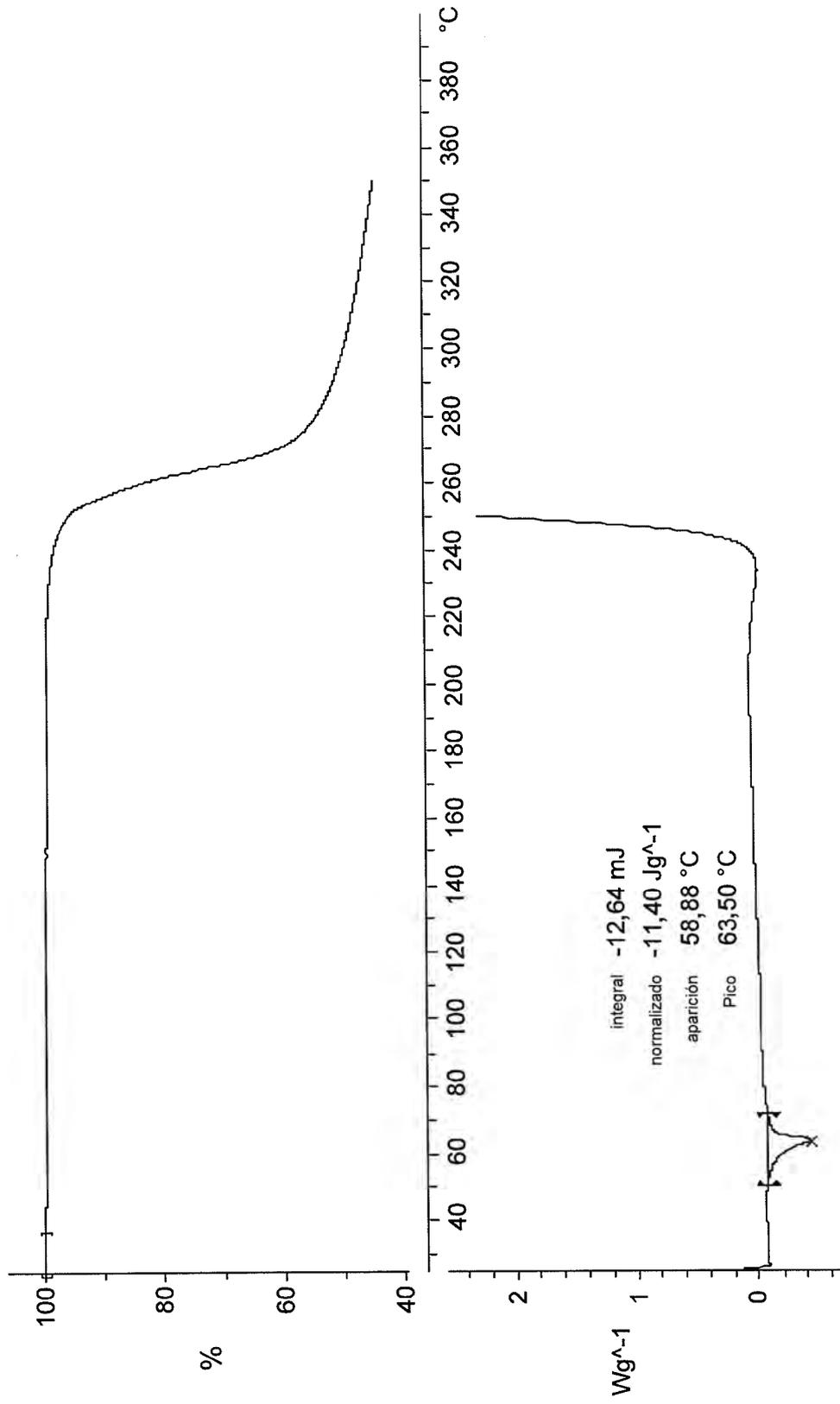


FIG.18

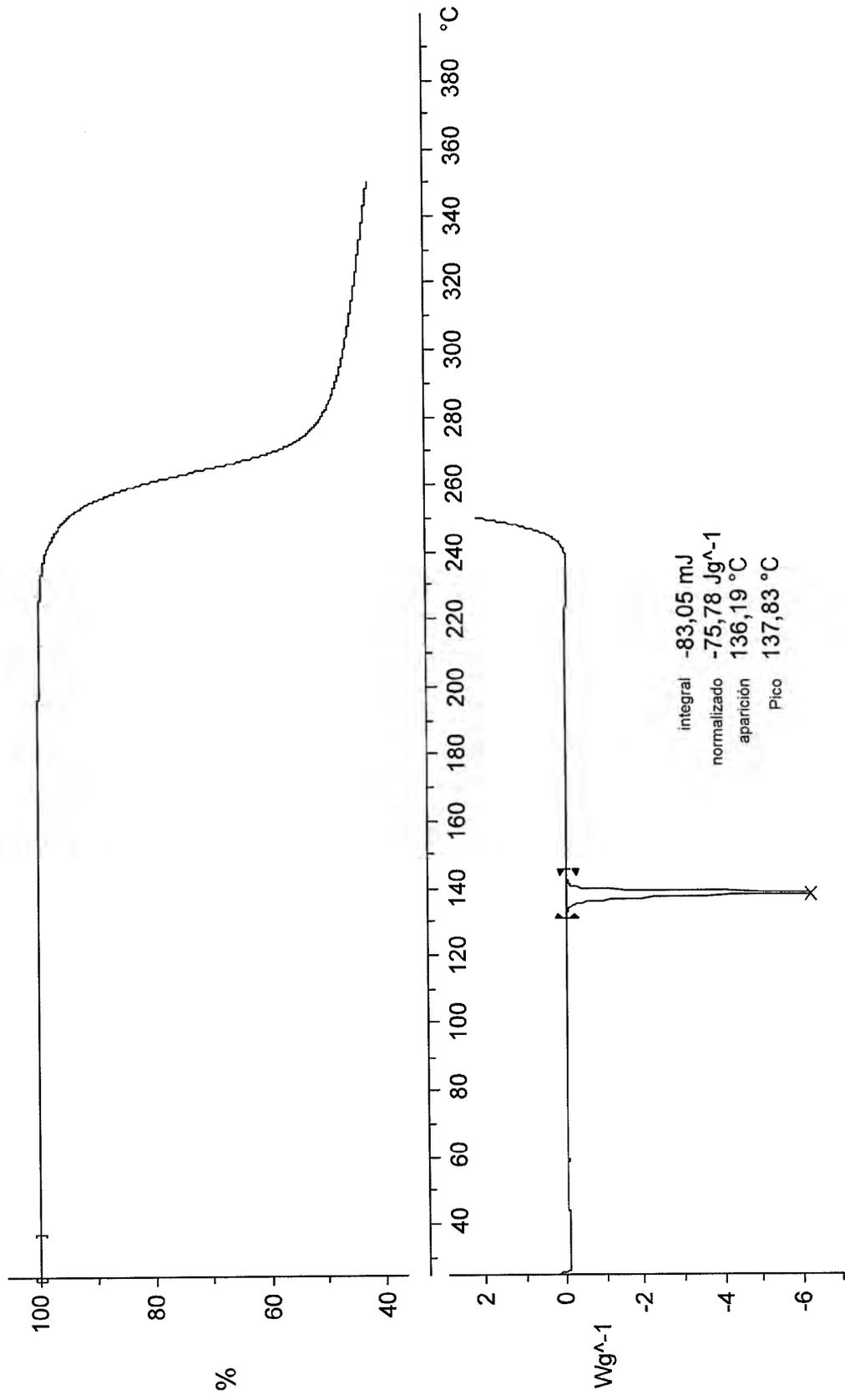


FIG. 19

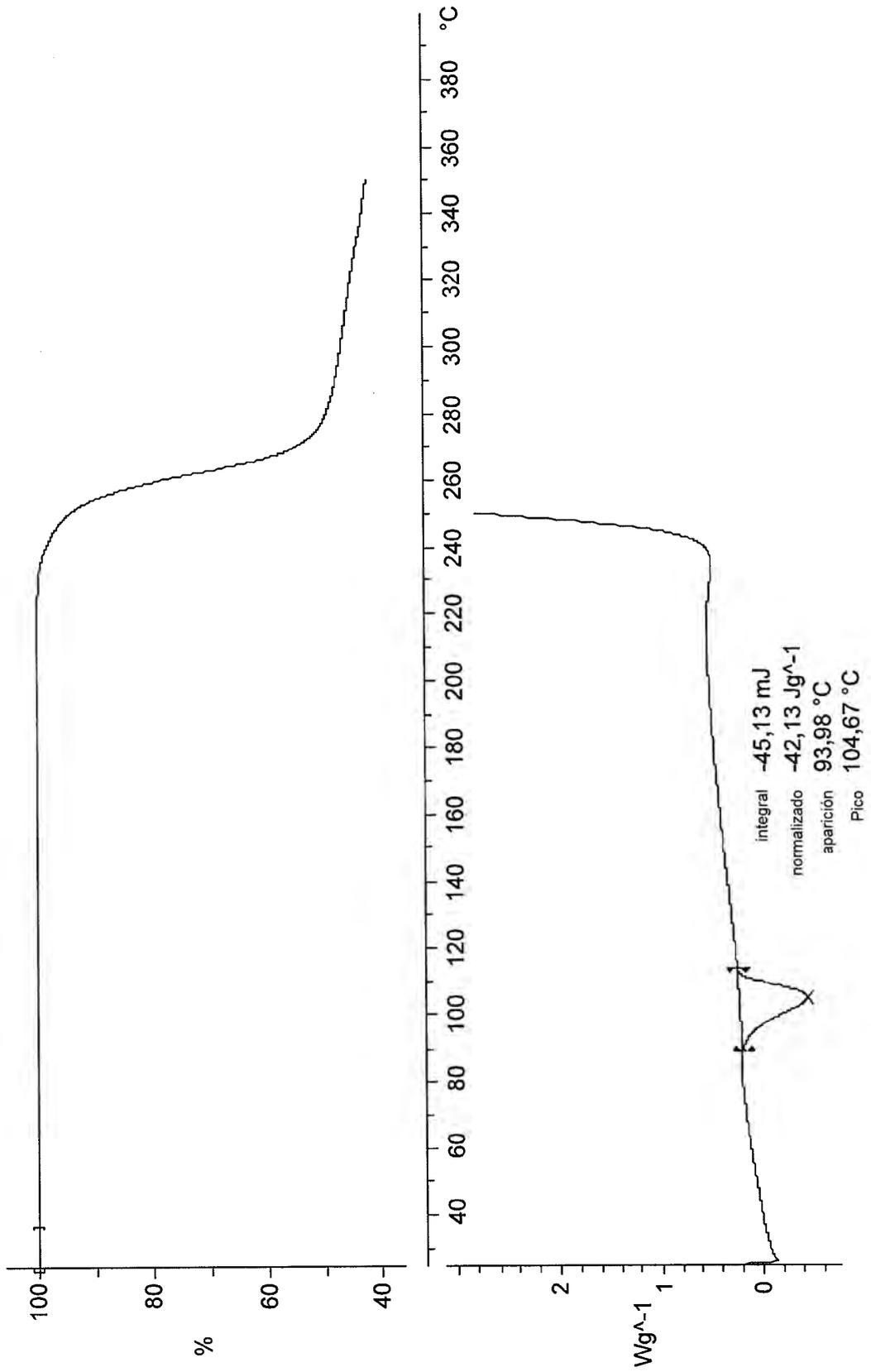


FIG. 20A

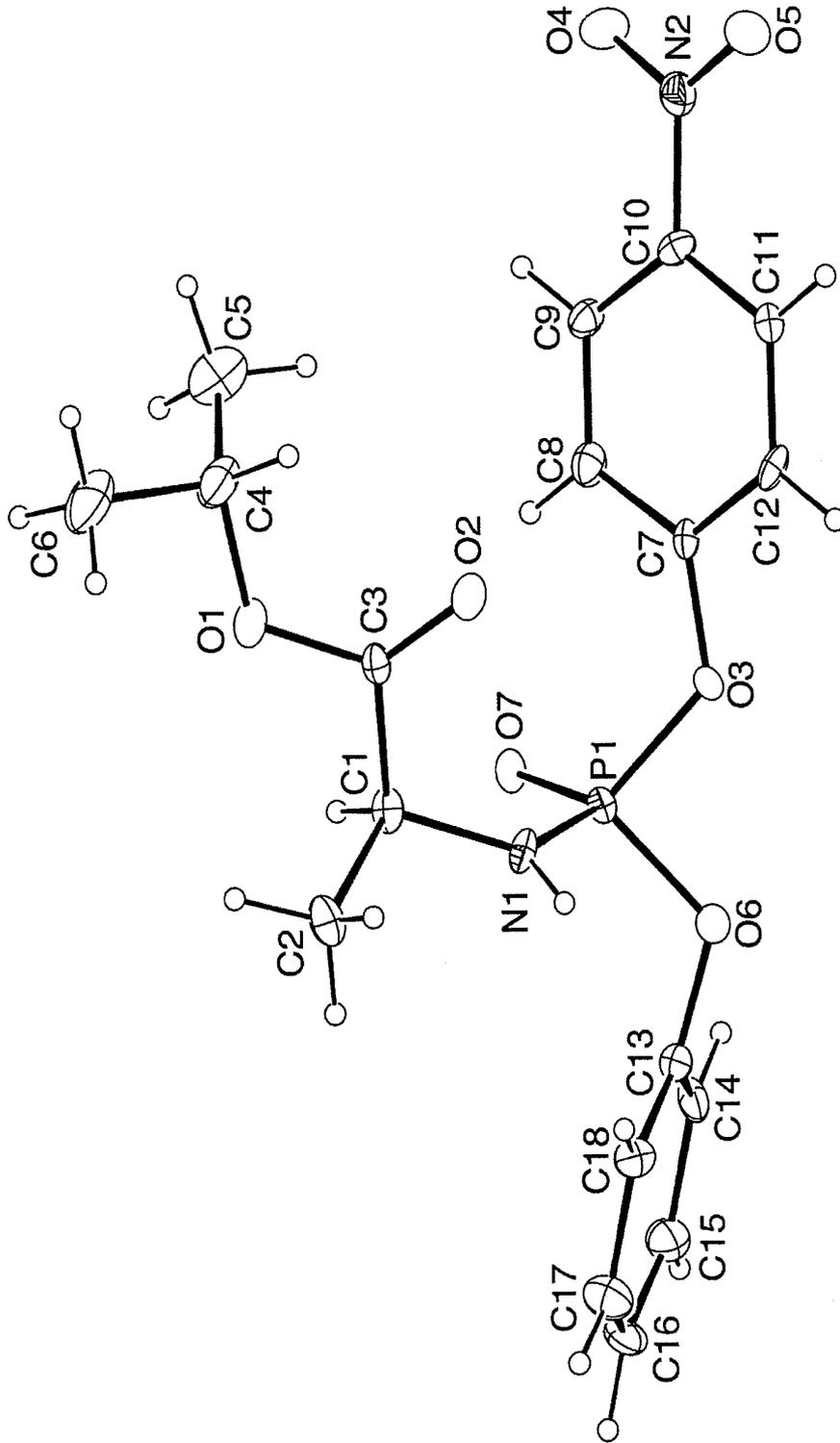


FIG. 20B

