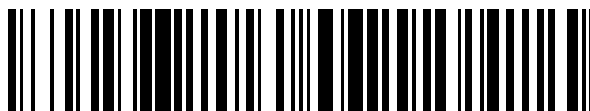


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 806**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00	(2006.01)	A61P 31/14	(2006.01)
A61K 31/53	(2006.01)		
A61K 31/675	(2006.01)		
A61K 31/685	(2006.01)		
C07H 1/00	(2006.01)		
C07H 11/00	(2006.01)		
C07H 15/18	(2006.01)		
C07D 487/04	(2006.01)		
C07D 519/00	(2006.01)		
C07H 1/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2015 PCT/US2015/057933**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16069826**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2015 E 15797205 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 3212174**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de infecciones del virus filoviridae**

30 Prioridad:

29.10.2014 US 201462072331 P
20.01.2015 US 201562105619 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2018

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

CHUN, BYOUNG, KWON;
CLARKE, MICHAEL, O'NEIL HANRAHAN;
DOERFFLER, EDWARD;
HUI, HON, CHUNG;
JORDAN, ROBERT;
MACKMAN, RICHARD, L.;
PARRISH, JAY, P.;
RAY, ADRIAN, S. y
SIEGEL, DUSTIN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 674 806 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).

Métodos para el tratamiento de infecciones del virus filoviridae**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente a compuestos para su uso en métodos de tratamiento de infecciones por virus *Filoviridae*, particularmente métodos y nucleósidos para tratar el virus del Ébola, el virus de Marburg y el virus Cueva.

10

Antecedentes de la invención

Los filovirus (por ejemplo, el virus del Ébola (EBOV) y el virus de Marburg (MARV)) se encuentran entre los virus más letales y destructivos. Causan fiebres hemorrágicas virales graves, a menudo mortales, en seres humanos y primates no humanos (por ejemplo, monos, gorilas y chimpancés). Los filovirus son una preocupación particular como posibles armas biológicas ya que tienen el potencial de diseminación en aerosoles y de convertirse en armas.

15

El período de incubación de la infección por Filovirus varía de 2 a 21 días. El inicio de la enfermedad es abrupto y se caracteriza por fiebre alta, dolores de cabeza, dolores musculares y articulares, dolor de garganta, fatiga, diarrea, vómitos y dolor de estómago. En algunos pacientes se puede observar un sarpullido, ojos rojos, hipo y hemorragia interna y externa. En una semana después de haberse infectado con el virus, la mayoría de los pacientes experimentan dolores en el pecho y fallo multiorgánico, entran en estado de shock y mueren. Algunos pacientes también experimentan ceguera y hemorragia extensa antes de morir.

20

Filoviridae es una familia de virus de ARN. Se han identificado dos miembros de la familia Filoviridae: EBOV y MARV. Se han identificado dos tipos de patógenos clave de la familia Filoviridae: el virus del ébola y el MARV. Se ha identificado una variante del MARV y cinco especies identificadas de ebolavirus: Zaire (es decir, virus del ébola, EBOV), Sudán, Tai Forest, Bundibugyo y Reston. El origen exacto, la localización y el hábitat natural de Filoviridae son desconocidos. Sin embargo, sobre la base de la evidencia disponible y la naturaleza de virus similares, se ha postulado que los Filoviridae son zoonóticos (es decir, de origen animal) y normalmente se mantienen en un huésped animal que es nativo del continente africano.

25

Durante más de 30 años, los ebolavirus se han asociado con episodios periódicos de fiebre hemorrágica en África Central que producen enfermedad grave en pacientes infectados. Las tasas de mortalidad en los brotes han oscilado entre el 5 0% para las especies de ebolavirus de Sudán (SEBOV) y hasta el 90 % para las especies de ebolavirus de Zaire (EBOV, ZEBOV) (Sánchez et al., *Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses*, en *Fields Virology* (eds. Knipe, D.M. y Howley, P.M.) 1409–1448 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia)). Un brote a finales de 2007 causado por una especie aparentemente nueva de ebolavirus en Uganda dio como resultado una tasa de mortalidad de aproximadamente el 25 % (Towner et al., *PLoS Pathog.*, 4:e1000212 (2008)). ZEBOV también ha diezmo las poblaciones de simios salvajes en esta misma región de África (Walsh et al., *Nature*, 422:611–614 (2003)).

35

40

La prevención y el tratamiento de las infecciones por filovirus, incluidos los ebolavirus (es decir, EBOV) presenta muchos desafíos. De hecho, no se dispone de vacunas o modalidades de tratamiento posteriores a la exposición para prevenir o tratar las infecciones por EBOV. Los pacientes, en cambio, reciben tratamiento de soporte, es decir, equilibrado de electrolitos y fluidos, oxígeno, mantenimiento de la presión arterial y tratamiento para cualquier infección secundaria.

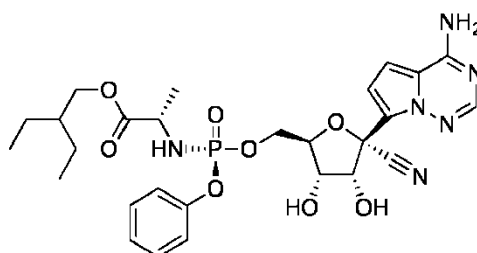
45

Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones y métodos para tratar infecciones por EBOV. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

50

Sumario de la invención

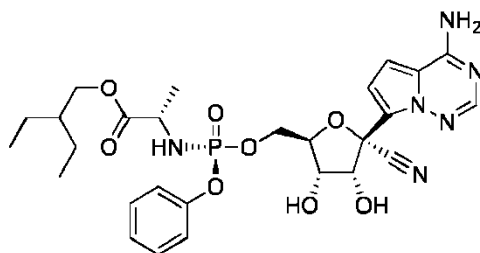
Se proporciona un compuesto que tiene la estructura:



55

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para tratar una infección por *Filoviridae* en un ser humano que lo necesite, en el que dicho compuesto tiene la estructura:



5

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

10 A menos que se indique lo contrario, con los siguientes términos y frases como se usan en la presente memoria descriptiva se pretende que tengan los significados siguientes:

Cuando en el presente documento se usan nombres comerciales, los solicitantes pretenden incluir de forma independiente el producto comercial y el ingrediente o ingredientes farmacéuticos activos del producto comercial.

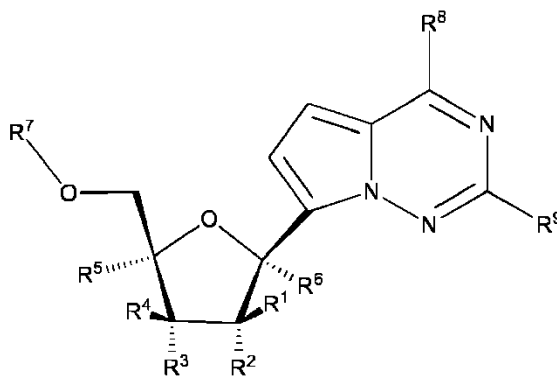
15

Tal como se usa en el presente documento, "un compuesto de la invención" significa un compuesto de la estructura indicada en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Del mismo modo, con respecto a intermediarios aislables, la frase "un compuesto de fórmula (número)" significa un compuesto de dicha fórmula y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

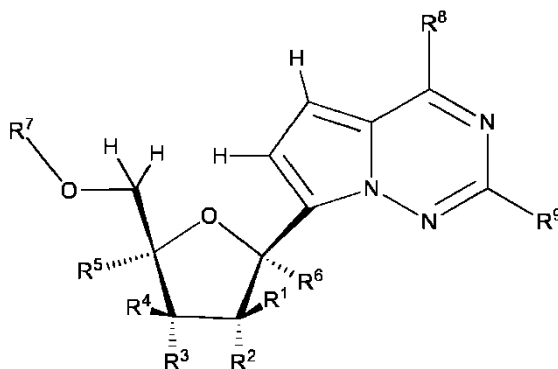
20

A menos se especifique lo contrario, los átomos de carbono del compuesto de la invención están destinados a tener una valencia de cuatro. En algunas representaciones de la estructura química en la que los átomos de carbono no tienen un número suficiente de variables unidas para producir una valencia de cuatro, debe asumirse que los sustituyentes de carbono restantes necesarios para proporcionar una valencia de cuatro son hidrógeno. Por ejemplo,

25



tiene el mismo significado que



30

"Grupo protector" se refiere a un resto de un compuesto que enmascara o altera las propiedades de un grupo funcional o las propiedades del compuesto como un todo. La subestructura química de un grupo protector varía

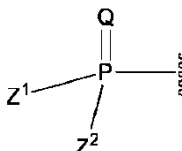
ampliamente. Una función de un grupo protector es servir como intermedio en la síntesis de la sustancia fármaco parental. Química de grupos protectores y estrategias para la protección/desprotección son bien conocidos en la técnica. Véase: Protective Groups in Organic Chemistry, Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991. Véase también Protective Groups in Organic Chemistry, Peter G. M. Wuts y Theodora W. Greene, 4^a Ed., 2006. Los grupos protectores a menudo se utilizan para enmascarar la reactividad de ciertos grupos funcionales para ayudar a la eficiencia de las reacciones químicas deseadas, por ejemplo formación y rotura de enlaces químicos de un modo ordenado y planificado. La protección de grupos funcionales de un compuesto altera otras propiedades físicas además de la reactividad del grupo funcional protegido, tales como la polaridad, la lipofilidad (hidropoficidad) y otras propiedades que se pueden medir con herramientas analíticas habituales. Los productos intermedios químicamente protegidos pueden ser, ellos mismos, biológicamente activos o inactivos. Grupos protectores de hidroxilo se refiere a aquellos grupos protectores útiles para proteger grupos hidroxilo (-OH).

Los compuestos protegidos pueden también exhibir propiedades alteradas y en algunos casos optimizadas, *in vitro* e *in vivo*, tales como el paso a través de membranas celulares y la resistencia a la degradación o secuestro enzimático. En este papel, los compuestos protegidos con efectos terapéuticos pretendidos pueden denominarse profármacos. Otra función de un grupo protector es convertir el fármaco parental en un profármaco, de modo que el fármaco parental se libera tras la conversión del profármaco *in vivo*. Dado que los profármacos activos pueden absorberse con más eficacia que el fármaco parental, los profármacos pueden poseer mayor potencia *in vivo* que el fármaco parental. Los grupos protectores se eliminan *in vitro*, en el caso de los productos intermedios químicos, o *in vivo* en el caso de los profármacos. Con los productos intermedios químicos no es particularmente importante que los productos resultantes tras la desprotección, por ejemplo alcoholes, sean fisiológicamente aceptables, aunque, en general, es más deseable que los productos sean farmacológicamente inocuos.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de superposición de la pareja imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se pueden superponer sobre su pareja imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diaestereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son especulares unas de otras. Los diaestereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales, reactividades y propiedades biológicas. Por ejemplo, los compuestos de Fórmula IV pueden tener un átomo de fósforo quiral cuando R⁷ es



y Z¹ y Z² son diferentes. Cuando al menos uno de Z¹ o Z² también tiene un centro quiral, por ejemplo con Z¹ o Z² es un éster de α-aminoácido de origen natural, quiral, ligado a nitrógeno, el compuesto de Fórmula IV existirá como diastereómeros porque hay dos centros de quiralidad en la molécula. Todos estos diastereómeros y sus usos descritos en el presente documento están abarcados por la presente invención. Las mezclas de diaestereómeros se pueden separar mediante procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis, cristalización y cromatografía. Los diastereómeros pueden tener diferentes características físicas tales como, entre otras, solubilidad, estabildades químicas y cristalinidad y también pueden tener diferentes propiedades biológicas tales como, entre otras, la estabilidad enzimática, la absorción y la estabilidad metabólica.

"Enantiómeros" se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles uno de otro.

El modificador "aproximadamente" usado en relación con una cantidad incluye el valor indicado y tiene el significado dictado por el contexto (por ejemplo, incluye el grado de error asociado con la medición de la cantidad concreta).

El término "tratar", como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a invertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o afección al que se aplica tal término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere al acto de tratar, tal y como se ha definido "tratar" inmediatamente antes.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, es la cantidad de compuesto de Fórmula IV presente en una composición descrita en el presente documento que es necesaria para proporcionar un nivel deseado de fármaco en las secreciones y tejidos de las vías respiratorias y los pulmones, o, como alternativa, en el flujo sanguíneo de un sujeto a tratar para dar una respuesta fisiológica anticipada o efecto biológico

deseado cuando dicha composición se administra por la vía de administración elegida. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el compuesto particular de Fórmula IV, la actividad específica de la composición, el dispositivo de administración empleado, las características físicas de la composición, su uso previsto, así como las consideraciones del paciente tales como la gravedad del estado de la enfermedad, la cooperación del paciente, etc., y un experto en la técnica puede determinarla fácilmente en base a la información proporcionada en el presente documento.

La expresión "solución salina normal" significa una solución acuosa que contiene 0,9 % (p/v) de NaCl.

La expresión "solución salina hipertónica" significa una solución acuosa que contiene más del 0,9 % (p/v) de NaCl. Por ejemplo, la solución salina hipertónica al 3 % contendría 3 % (p/v) de NaCl.

"Formar una mezcla de reacción" se refiere al proceso de poner en contacto al menos dos especies distintas de manera que se mezclan y pueden reaccionar. Sin embargo, debe apreciarse que el producto de reacción resultante se puede producir directamente a partir de una reacción entre los reactivos añadidos o a partir de un intermedio de uno o más de los reactivos añadidos que se pueden producir en la mezcla de reacción.

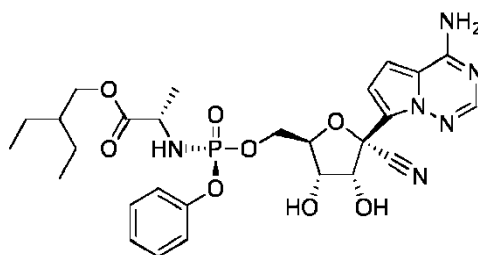
"Agente de acoplamiento" se refiere a un agente capaz de acoplar dos compuestos dispares. Los agentes de acoplamiento pueden ser catalíticos o estequiométricos. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento pueden ser un agente de acoplamiento basado en litio o un agente de acoplamiento basado en magnesio tal como un reactivo de Grignard. Los ejemplos de agentes de acoplamiento incluyen, pero no se limitan a, n-BuLi, MgCl₂, iPrMgCl, tBuMgCl, PhMgCl o combinaciones de los mismos.

"Agente de desprotección" se refiere a cualquier agente capaz de eliminar un grupo protector. El agente de desprotección dependerá del tipo de grupo protector utilizado. Los agentes de desprotección representativos son conocidos en la técnica y se pueden encontrar en Protective Groups in Organic Chemistry, Peter G. M. Wuts y Theodora W. Greene, 4^a Ed., 2006.

II. Compuestos de la presente invención

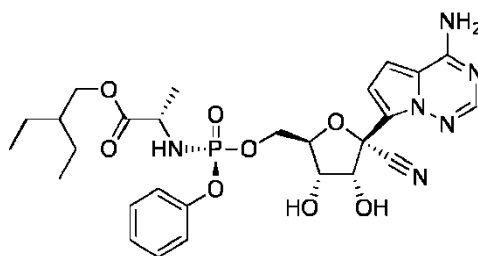
A continuación se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en la descripción adjunta, las estructuras y las fórmulas. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no se pretende que limiten la invención a esas realizaciones. Por el contrario, la invención pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, pero solo en la medida en que estén cubiertos por el alcance de las reivindicaciones.

Se proporciona un compuesto para su uso en un método para tratar una infección por *Filoviridae* en un ser humano que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

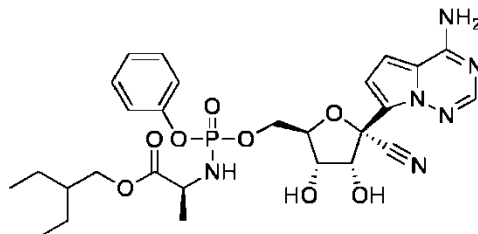
La presente invención proporciona un compuesto que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

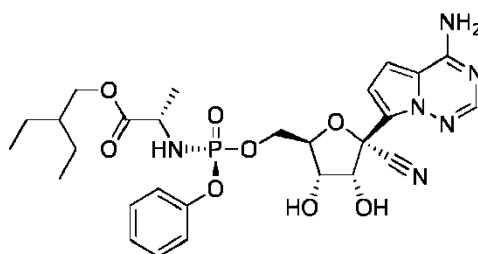
Los nombres de los compuestos de la presente divulgación se proporcionan usando el software ACD/Name para nombrar compuestos químicos (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canadá). Otros compuestos o radicales pueden nombrarse con nombres comunes o nombres sistemáticos o no sistemáticos. La nomenclatura y numeración de los compuestos de la divulgación se ilustra con un compuesto representativo:

5



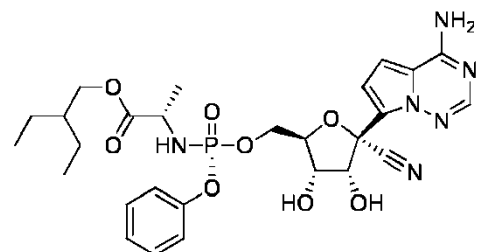
que se denomina 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-2-etilbutilo. El compuesto de la presente invención es:

10



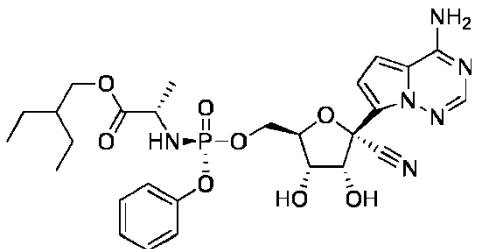
que se denomina 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo. También se divulgan:

15



que se denomina 2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo. 2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo también se puede ilustrar como

20



25

Cualquier referencia al compuesto de la invención descrito en el presente documento también incluye una referencia a su sal fisiológicamente aceptable. Ejemplos de sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen sales derivadas de una base adecuada. Tal como un metal alcalino (por ejemplo, sodio), un metal alcalino-térreo (por ejemplo, Na⁺, Li⁺, K⁺, Ca⁺² y Mg⁺²), amoniaco y NR₄⁺ (en el que R es como se define en el presente documento). Las sales fisiológicamente aceptables de un átomo de nitrógeno o un grupo amino incluyen (a) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, sulfámico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (b) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido isetiónico, ácido lactobiónico, ácido

30

tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico, ácido malónico, ácido sulfosalicílico, ácido glicólico, 2-hidroxi-3-naftoato, pamoato, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido ftálico, ácido mandélico, ácido láctico, ácido etanosulfónico, lisina, arginina, ácido glutámico, glicina, serina, treonina, alanina, isoleucina, leucina y similares; y (c) sales formadas a partir de aniones elementales, por ejemplo, cloro, bromo, y yodo. Las sales fisiológicamente aceptables de un compuesto de un grupo hidroxilo incluyen el anión de dicho compuesto en combinación con un catión adecuado tal como Na⁺ and NR₄⁺.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden existir en forma de diferentes polimorfos o pseudopolimorfos. Como se usa aquí, el polimorfismo cristalino significa la capacidad de un compuesto cristalino de existir en diferentes estructuras cristalinas. El polimorfismo cristalino puede ser el resultado de diferencias en el empaquetamiento en cristal (polimorfismo del empaquetamiento) de diferencias en el empaquetamiento entre diferentes conformeros de la misma molécula (polimorfismo conformacional). Como se usa en el presente documento, el pseudopolimorfismo cristalino significa la capacidad de un hidrato o solvato de un compuesto cristalino de existir en diferentes estructuras cristalinas. Los pseudopolimorfos de la presente invención pueden existir debido a las diferencias en el empaquetamiento en cristal (pseudopolimorfismo del empaquetamiento) o debido a las diferencias en el empaquetamiento entre diferentes conformeros de la misma molécula (pseudopolimorfismo conformacional). La presente invención comprende todos los polimorfos y pseudopolimorfos de los compuestos de Fórmula IV y sus sales farmacéuticamente aceptables.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables también pueden existir en forma de un sólido amorfo. Como se usa en el presente documento, un sólido amorfo es un sólido en el que no hay ninguna orden de largo alcance de las posiciones de los átomos en el sólido. Esta definición se aplica también cuando el tamaño del cristal es de dos nanómetros o menos. Se pueden usar aditivos, incluidos los disolventes, para crear las formas amorfas de la presente invención. La presente invención comprende todas las formas amorfas de los compuestos de Fórmula IV y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Para uso terapéutico, las sales de principios activos del compuesto de la invención serán fisiológicamente aceptables, es decir serán sales derivadas de un ácido o base fisiológicamente aceptable. No obstante, las sales de ácidos o bases que no son fisiológicamente aceptables también pueden encontrar utilidad en, por ejemplo, la preparación o purificación de un compuesto fisiológicamente aceptable. Todas las sales, sean o no una forma derivada de un ácido o base fisiológicamente aceptables, entran dentro del alcance de la presente invención.

Por último, se debe entender que las composiciones de la presente memoria descriptiva comprenden compuestos de la invención en su forma no ionizada, así como zwitteriónica, y combinaciones con cantidades estequiométricas de agua como en los hidratos.

Cabe destacar que todos los enantiómeros, diastereómeros y mezclas racémicas, tautómeros, polimorfos, pseudopolimorfos del compuesto de la invención y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son abarcados por la presente invención. Todas las mezclas de tales enantiómeros y diastereómeros están dentro del alcance de la presente invención.

El compuesto de la invención tiene centros quirales, por ejemplo átomos quirales de carbono o fósforo. Las mezclas racémicas se separan en sus isómeros individuales sustancialmente ópticamente puros mediante técnicas bien conocidas tales como, por ejemplo, la separación de sales diaestereoméricas formadas con auxiliares ópticamente activos, por ejemplo ácidos o bases, seguido por conversión de nuevo en las sustancias ópticamente activas. En la mayoría de los casos, el isómero óptico deseado se sintetiza por medio de reacciones estereoespecíficas, comenzando con el estereoisómero adecuado del material de partida deseado.

Las definiciones estereoquímicas y consensos usados en la presente memoria descriptiva generalmente siguen las indicaciones de S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo se usan los prefijos D y L o R y S para indicar la configuración absoluta de la molécula sobre su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l, D y L o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, significando S, (-) o 1 que el compuesto es levorrotatorio, mientras que un compuesto con R, (+), o d como prefijo es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos a excepción de que son imágenes especulares uno de otro. Un estereoisómero específico pueden también denominarse enantiómero y una mezcla de dichos isómeros a menudo se denomina una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que se puede producir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o procedimiento químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

Los compuestos de la invención también se pueden existir en forma de isómeros tautoméricos en ciertos casos. Aunque sólo se puede representar una estructura de resonancia deslocalizada, todas estas formas se contemplan


dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los tautómeros eno-amina pueden existir para los sistemas de purina, pirimidina, imidazol, guanidina, amidina y tetrazol y todas sus posibles formas tautoméricas están dentro del alcance de la invención.

5 Cualquier fórmula o estructura dada en el presente documento también pretende representar formas no marcadas así como formas marcadas isotópicamente de los compuestos. Los compuestos marcados isotópicamente tienen estructuras representadas por las fórmulas dadas en el presente documento excepto que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico seleccionado. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la divulgación incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como, pero sin limitaciones, ^2H (deuterio, D), ^3H (tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl y ^{125}I . Diversos compuestos marcados isotópicamente de la presente divulgación, por ejemplo aquellos en los que isótopos radiactivos, tales como ^3H , ^{13}C y ^{14}C están incorporados. Tales compuestos marcados isotópicamente pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios cinéticos de reacción, técnicas de detección o imagen, tales como tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT), incluyendo ensayos de distribución de tejidos de fármacos o sustratos o en el tratamiento radiactivo de pacientes.

La divulgación también incluye el compuesto de la invención en el que de 1 a n hidrógenos unidos a un átomo de carbono se reemplazan por deuterio, en el que n es el número de hidrógenos en la molécula. Tales compuestos exhiben resistencia incrementada al metabolismo y, por lo tanto, son útiles para aumentar la semivida de cualquier compuesto de Fórmula IV cuando se administra a un mamífero, particularmente un ser humano. Véase, por ejemplo, Foster, "Deuterium Isotope Effects in Studies of Drug Metabolism", Trends Pharmacol. Sci. 5(12):524-527 (1984). Dichos compuestos se sintetizan por medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo, empleando materiales de partida en los que uno o más hidrógenos han sido reemplazados por deuterio.

Los compuestos terapéuticos sustituidos o marcados con deuterio de la divulgación pueden tener propiedades de DMPK (metabolismo y farmacocinética del fármaco) mejoradas, relacionadas con la distribución, el metabolismo y la excreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados tales como el deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, incremento de la semivida *in vivo*, reducción de los requisitos de dosificación y/o mejora del índice terapéutico. Un compuesto marcado con ^{18}F puede ser útil para estudios de PET o SPECT. Los compuestos marcados con isótopos de la presente divulgación y profármacos de los mismos se pueden preparar generalmente mediante los procedimientos divulgados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones que se describen más adelante sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente por un reactivo no marcado isotópicamente. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente en el compuesto de Fórmula IV.

La concentración de dicho isótopo más pesado, específicamente deuterio, puede definirse por un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de esta divulgación, cualquier átomo no designado específicamente como isótopo particular pretende representar cualquier isótopo estable de ese átomo. A menos que se indique lo contrario, cuando una posición se designa específicamente como "H" o "hidrógeno", se entiende que la posición tiene hidrógeno en su composición isotópica de abundancia natural. Por consiguiente, en los compuestos de la presente divulgación, se pretende que cualquier átomo designado específicamente como deuterio (D) represente deuterio.

Las líneas onduladas  indican el sitio de unión de los enlaces covalentes a las subestructuras, grupos, restos o átomos adyacentes.

El compuesto de la presente invención se puede preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 8.008.264 y la publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2012/0027752.

III. FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

El compuesto de la presente invención se formula con transportadores y excipientes convencionales, que se seleccionarán de acuerdo con la práctica habitual. Los comprimidos contendrán excipientes, deslizantes, cargas, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril y, cuando están destinadas a una administración distintas a la oral, serán, en general, isotónicas. Todas las formulaciones contendrán, opcionalmente, excipientes tales como los indicados en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA, hidratos de carbono tales como dextrano, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmetilcelulosa, ácido esteárico y similares. El pH de las formulaciones varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, pero normalmente es de aproximadamente 7 a 10. En algunas realizaciones, el pH de las formulaciones varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, pero normalmente es de aproximadamente 3 a aproximadamente 4. En algunas realizaciones, el pH de las formulaciones varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, pero es normalmente de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 8,5.

Aunque es posible administrar los principios activos solos, puede ser preferible presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, de la invención comprenden al menos un principio activo, como se ha definido con anterioridad, junto con uno o más transportadores aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos, en particular los ingredientes terapéuticos adicionales como se trata en el presente documento. El(los) transportador(es) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y fisiológicamente inocuos para el receptor de la misma.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones pueden presentarse cómodamente en una forma de monodosis y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Las técnicas y formulaciones generalmente se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Dichos procedimientos incluyen la etapa de llevar el principio activo en asociación con el transportador, que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha el principio activo con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o con ambos y, después, en caso necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse en forma de unidades pequeñas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos, en los que cada uno contiene una cantidad predeterminada del principio activo; en forma de polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua, o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede administrarse en forma de un bolo, elixir o pasta.

Un comprimido se fabrica mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos comprimidos se pueden preparar mediante compresión en una máquina adecuada del principio activo en forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, mezclarse opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente de superficie activa o de dispersión. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del principio activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o rasurarse y opcionalmente se formulan de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo.

Para las infecciones del ojo y otro tejido externo, por ejemplo boca y piel, las formulaciones se aplican, preferentemente, en forma de una pomada o crema tópica que contiene el(los) ingrediente(s) activo(s) en una cantidad de, por ejemplo, 0,075 a 20 % p/p (incluidos los principios activos en un intervalo entre 0,1 % y 20 % en incrementos de 0,1 % p/p tal como 0,6 % p/p, 0,7 % p/p, etc.), preferentemente de 0,2 a 15 % p/p y, más preferentemente, de 0,5 a 10 % p/p. Cuando se formula en forma de una pomada, los principios activos pueden emplearse con cualquier base de pomada de parafina o miscible en agua. Como alternativa, el principio o principios activos se pueden formular en una crema con una base para crema de aceite-en-agua.

Si se desea, la fase acuosa de la base para crema puede incluir, por ejemplo, al menos 30 % p/p de un alcohol polihídrico, es decir un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluido el PEG 400) y mezclas de los mismos. Deseablemente, las formulaciones tópicas pueden incluir un compuesto que potencia la absorción o penetración del principio activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención puede estar constituida por ingredientes conocidos de un modo conocido. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (conocido de otro modo como emulgente), comprende deseablemente una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite, o con una grasa y un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo, que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. En conjunto, el(los) emulsionante(s) con o sin estabilizante(s) forman la denominada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa forma la denominada base ungüento emulsionante que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones en crema.

Los emulgentes y estabilizantes de la emulsión adecuados para usar en la formulación de la invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato sódico. Otros emulgentes y estabilizantes de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 80.

La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en la consecución de las propiedades cosméticas deseadas. La crema debería ser un producto no graso, que no mancha y que se puede lavar, con una consistencia adecuada para evitar las fugas en tubos y otros envases. Se pueden usar ésteres de alquilo mono o dibásicos de cadena lineal o ramificada, tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, propilenglicoldiéster de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-étilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada, conocidos como Crodamol CAP, siendo los últimos tres los ésteres preferidos. Estos pueden usarse solos o en combinación en función de las propiedades requeridas.

Como alternativa, se usan lípidos de alto punto de fusión, tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

5 Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden una combinación de acuerdo con la invención junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Las formulaciones farmacéuticas que contienen el principio activo pueden estar en cualquier forma adecuada para el procedimiento de administración previsto. Cuando se usa para uso oral se pueden preparar, por ejemplo comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica para fabricar composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes incluidos agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes de conservación con el fin de proporcionar una preparación agradable al gusto. Son aceptables los comprimidos que contienen el principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, que son adecuados para fabricar comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de calcio o de sodio, lactosa, fosfato de calcio o de sodio; agentes de granulación y disgregantes, tales como almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga, y agentes lubricantes, pro ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas, incluida la microencapsulación, para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionan una acción sostenida durante un periodo de tiempo largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

25 Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

30 Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosa. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga, y agentes de dispersión o humectantes tales como fosfatida natural (*por ejemplo*, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquilenos con un ácido graso (*por ejemplo*, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (*por ejemplo*, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (*por ejemplo*, monooleato de polioxietilensorbitano). Otros ejemplos no limitantes de agentes de suspensión incluyen Captisol® (sulfobutil éter betaciclodextrina, SBE-β-CD). La suspensión acuosa puede también contener uno o más conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

40 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los que se han indicado con anterioridad, y agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral agradable al gusto. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

50 Polvos y gránulos dispersables de la invención adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en mezcla con un agente de dispersión o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Ejemplos de agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión son como los que se han divulgado en lo que antecede. También pueden estar presentes excipientes, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y conservantes adicionales.

55 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden también estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una mezcla de estos. Agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas naturales, tales como goma arábiga y goma tragacanto, fosfatidas naturales, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitano, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano. La emulsión puede también contener agentes edulcorantes y aromatizantes. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones pueden también contener un demulcente un conservante, un aromatizante o un colorante.

65 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión

que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como una solución en 1,3-butano-diol, o prepararse en forma de un polvo liofilizado. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o una suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable.

5 Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente pueden emplearse aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico pueden usarse asimismo en la preparación de inyectables. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer,
10 solución isotónica de cloruro sódico, solución hipertónica de cloruro sódico y solución hipotónica de cloruro sódico.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con el material transportador para producir una única forma de dosificación variará en función del huésped tratado y el modo de administración concreto. Por ejemplo, una formulación de liberación en el tiempo destinada para administración oral a seres humanos puede contener de aproximadamente 1 a 1000 mg de material activo mezclado con una cantidad adecuada y conveniente del material transportador que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95 % de las composiciones totales (peso en peso). La composición farmacéutica puede prepararse para proporcionar cantidades fácilmente mensurables para administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada para infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg del principio activo por mililitro de solución con el fin de que se puede producir la infusión de un volumen adecuada a una velocidad de aproximadamente 30 ml/h.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en el ojo también incluyen gotas oculares en las que el principio activo se disuelve o suspende en un transportador adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el principio activo. Preferentemente, el principio activo está presente en dichas formulaciones en una concentración de 0,5 a 20 %, de forma ventajosa de 0,5 a 10 %, y particularmente de aproximadamente 1,5 % p/p.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el principio activo en forma aromatizada, normalmente sacarosa o goma arábiga o de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el principio activo en un transportador líquido adecuado.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar en forma de supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

35 Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 500 micrómetros, tal como 0,5, 1, 30, 35, etc., que se administra por inhalación rápida a través del conducto nasal o por inhalación a través de la boca para alcanzar los sacos alveolares. Formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo. Las formulaciones adecuadas para administración en aerosol o en polvo seco se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos convencionales y pueden liberarse con otros agentes terapéuticos tales como compuestos usados hasta ahora en el tratamiento o profilaxis de infecciones por *Filoviridae*, tal como se describe a continuación.

45 Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del principio activo, transportadores como los conocidos en la técnica que son adecuados.

Formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor que se pretenda; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

55 Las formulaciones se presentan en recipientes de dosis unitaria o de multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del transportador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Las formulaciones monodosis son las que contienen una dosis o subdosis de unidad diaria, tal como se indica anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de las mismas de un principio activo.

60 Debería entenderse que además de los ingredientes mencionados en particular anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que se han considerado para el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellos adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

65 La invención además proporciona composiciones veterinarias que comprenden al menos un principio activo como se ha definido anteriormente junto con un transportador veterinario de las mismas.

Transportadores veterinarios son materiales útiles para el fin de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que, de otro modo, son inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el principio activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía oral, parenteral o mediante otra ruta deseada.

El compuesto de la invención se usa para proporcionar formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como principio activo el compuesto de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en el que la liberación del principio activo está controlada y regulada para permitir la dosificación menos frecuente o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un principio activo dado.

IV. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

El compuesto de la invención (en el presente documento denominados principios activos) se administra por cualquier vía adecuada a la afección que se va a tratar. Las vías adecuadas incluyen las vías oral, rectal, pulmonar, tópica (incluidas bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluidas subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural) y similares. Se apreciará que la vía preferida puede variar con, por ejemplo, la afección del receptor. Una ventaja del compuesto de la presente invención es que está biodisponible oralmente y se puede administrar por vía oral.

El compuesto de la presente invención se puede administrar en cualquier momento a un ser humano que pueda entrar en contacto con seres humanos que sufren una infección por *Filoviridae* o que ya está sufriendo una infección por *Filoviridae*. En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención puede administrarse profilácticamente a los seres humanos que entren en contacto con seres humanos que padecen *infección por Filoviridae*. En algunas realizaciones, la administración del compuesto de la presente invención puede ser a seres humanos que dan positivo para la *infección por Filoviridae* pero aún no muestra síntomas de *infección por Filoviridae*. En algunas realizaciones, la administración del compuesto de la presente invención puede ser a seres humanos al comienzo de los síntomas de *infección por Filoviridae*.

La dosis eficaz del principio activo depende al menos de la naturaleza de la afección que se está tratando, la toxicidad, si el compuesto se está usando de forma profiláctica (dosis menores) o contra una infección viral activa, el procedimiento de liberación y la formulación farmacéutica, y el clínico la determinará usando estudios convencionales de escalada de la dosis. Se puede esperar que sea de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; típicamente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; más típicamente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día; más típicamente, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, la dosis diaria candidata para un humano adulto de aproximadamente 70 mg de peso corporal variará de 1 mg a 1000 mg, preferentemente entre 5 mg a 500 mg, y pueden tomar la forma de una o múltiples dosis.

La dosis efectiva de un compuesto de la presente invención para tratar la infección por *Filoviridae* puede depender de si la dosis debe usarse profilácticamente o para tratar a un ser humano que ya padece *infección por Filoviridae*. Además, la dosis puede depender de si el sufrimiento humano por la infección por *Filoviridae* aún no muestra síntomas o ya muestra síntomas de infección por *Filoviridae*. Pueden ser necesarias dosis más grandes para el tratamiento de seres humanos que dan positivo para infección por *Filoviridae* y para seres humanos que muestran síntomas de infección por *Filoviridae* en comparación con seres humanos que reciben tratamiento profiláctico.

Se contempla cualquier período de tiempo adecuado para la administración de los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, la administración puede ser de 1 día a 100 días, incluidos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 días. La administración también puede ser de 1 semana a 15 semanas, incluidas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 semanas. También se contemplan períodos más largos de administración. El tiempo de administración puede depender de si el compuesto se administra profilácticamente o para tratar a un ser humano que sufre una infección por *Filoviridae*. Por ejemplo, una administración profiláctica puede ser durante un período de tiempo mientras el ser humano está en contacto regular con otros seres humanos que padecen infección por *Filoviridae*, y durante un período de tiempo adecuado después del último contacto con un ser humano que padece infección por *Filoviridae*. Para los humanos que ya sufren una infección por *Filoviridae*, el período de administración puede ser durante cualquier período de tiempo necesario para tratar al paciente y un período de tiempo adecuado después de una prueba negativa para infección por *Filoviridae* para garantizar que la infección por *Filoviridae* no recurre.

V. TERAPIA DE COMBINACIÓN

Las composiciones de la invención también se usan en combinación con otros principios activos. Para el tratamiento de las infecciones víricas producidas por *Filoviridae*, preferiblemente, el otro agente terapéutico activo es activo contra infecciones víricas producidas por *Filoviridae*, en particular las infecciones producidas por el virus de Marburg, el virus del Ébola y el virus Cueva. Ejemplos no limitantes de estos otros agentes terapéuticos activos son ribavirina, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV (RespiGam®), MEDI-557, A-60444, MDT-637, BMS-433771, amiodarona,

5 dronedarona, verapamilo, plasma de convaleciente de ébola (ECP), TKM-100201, BCX4430 ((2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrololo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol), favipiravir (también conocido como T-705 o Avigan), T-705 monofosfato, T-705 difosfato, T-705 trifosfato, FGI-106 (1-N,7-N-bis[3-(dimetilamino)propil]-3,9-dimetilquinolino[8,7-h]quinolon-1,7-diamina), JK-05, TKM-Ebola, ZMapp, rNAPc2, VRC-EBOADC076-00-VP, OS-2966, MVA-BN filo, brincidofovir, vacuna del ébola basada en el vector 5 del adenovirus de Vaxart, Ad26-ZEBOV, vacuna FiloVax, GOVX-E301, GOVX-E302, inhibidores de la entrada del virus del ébola (inhibidores de NPC1), y rVSV-EBOV, y mezclas de los mismos. Los compuestos y composiciones de la presente invención también pueden usarse en combinación con oligómeros de morfolino fosforamidato (PMO), que son análogos sintéticos de oligonucleótidos antisentido diseñados para interferir con los procesos de traducción formando dúplex de pares de bases con secuencias de ARN específicas. Los ejemplos de PMO incluyen AVI-7287, AVI-7288, AVI-7537, AVI-7539, AVI-6002 y AVI-6003. Los compuestos y composiciones de la presente invención también están destinados para su uso en pacientes tratados con cuidados generales con infecciones víricas producidas por *Filoviridae*, que incluyen fluidos parenterales (incluyendo dextrosa salina y lactato de Ringer) y nutrición, antibióticos (incluidos metronidazol y cefalosporinas, como ceftriaxona y cefuroxima) y/o profilaxis antifúngica, medicamentos para la fiebre y el dolor, antieméticos (como metoclopramida) y/o antidiarreicos, suplementos de vitaminas y minerales (incluidas vitamina K y sulfato de cinc), agentes antiinflamatorios (como ibuprofeno), analgésicos, y medicamentos para otras enfermedades frecuentes en la población de pacientes, tales como agentes antipalúdicos (incluida la terapia combinada de arteméter y artesunato-lumefantrina), tifoidea (incluidos antibióticos quinolónicos, como ciprofloxacino, antibióticos macrólidos, como azitromicina, antibióticos cefalosporínicos, como ceftriaxona), , o aminopenicilinas, como ampicilina) o shigelosis.

También es posible combinar cualquier compuesto de la invención con uno o más agentes terapéuticos activos adicionales en una forma de dosificación unitaria para administración simultánea o secuencial a un paciente. El tratamiento de combinación puede administrarse en forma de un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones.

La coadministración de un compuesto de la invención con uno o más de otros agentes terapéuticos activos generalmente se refiere a la administración simultánea o secuencial de un compuesto de la invención y uno o más de otros agentes terapéuticos activos, de manera que cantidades terapéuticamente eficaces del compuesto de la invención y uno o más de otros agentes terapéuticos activos están ambos presentes en el cuerpo del paciente.

La coadministración incluye la administración de dosificaciones unitarias de los compuestos de la invención antes o después de la administración de dosificaciones unitarias de uno o más de otros agentes terapéuticos activos diferentes, por ejemplo, la administración de los compuestos de la invención en segundos, minutos u horas desde la administración de uno o más de otros agentes terapéuticos activos. Por ejemplo, una dosis unitaria de un compuesto de la invención se puede administrar primero, seguido en segundos o minutos por la administración de una dosis unitaria de uno o más de otros agentes terapéuticos activos. Como alternativo, una dosis unitaria de uno o más de otros agentes terapéuticos activos se puede administrar primero, seguido de la administración de una dosis unitaria de un compuesto de la invención en segundos o minutos. En algunos casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de un compuesto de la invención primero, seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de uno o más de otros agentes terapéuticos activos. En otros casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de uno o más de otros agentes terapéuticos activos primero, seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), de la administración de una dosis unitaria de un compuesto de la invención.

El tratamiento de combinación puede proporcionar "sinergia" y "efecto sinérgico", es decir el efecto alcanzado cuando los principios activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos que es el resultado del uso de los compuestos por separado. Un efecto sinérgico se puede conseguir cuando los principios activos se: (1) coformulan y administran o liberan de forma simultánea en una formulación combinada; (2) liberan mediante alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administra en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o liberan secuencialmente, por ejemplo en comprimidos, píldoras o cápsulas separadas, o mediante inyecciones diferentes en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosificación eficaz de cada principio activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en terapia de combinación, las dosificaciones eficaces de dos o más principios activos se administran juntas. Un efecto antiviral sinérgico denota un efecto antiviral que es mayor que los efectos puramente aditivos predichos de los compuestos individuales de la combinación.

En aún otra realización más, la presente solicitud proporciona métodos de inhibición de la polimerasa de *Filoviridae* en una célula, que comprende: poner en contacto una célula infectada con un Filovirus con una cantidad eficaz del compuesto de la invención, o una sal, solvato y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, mediante lo cual se inhibe la polimerasa de *Filoviridae*.

En aún otra realización más, la presente solicitud proporciona métodos de inhibición de la polimerasa de *Filoviridae* en una célula, que comprende: poner en contacto una célula infectada con un Filovirus con una cantidad eficaz del compuesto de la invención, o una sal, solvato y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un agente terapéutico activo adicional, mediante lo cual se inhibe la polimerasa de *Filoviridae*.

En aún otra realización más, la presente solicitud proporciona métodos de inhibición de la polimerasa de *Filoviridae* en una célula, que comprende: poner en contacto una célula infectada con un virus *Filoviridae* con una cantidad eficaz del compuesto de la invención, o una sal, solvato y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un agente terapéutico activo adicional seleccionado.

En aún otra realización más, la presente solicitud proporciona el compuesto de la invención para métodos de tratamiento de una infección por virus *Filoviridae* en un ser humano, que comprende: Administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En aún otra realización más, la presente solicitud proporciona el compuesto de la invención para su uso en métodos de tratamiento de una infección por virus *Filoviridae* en un ser humano, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un agente terapéutico activo adicional, mediante el cual se inhibe la polimerasa de *Filoviridae*.

En aún otra realización más, la presente solicitud proporciona el compuesto de la invención para su uso en métodos de tratamiento de una infección por virus *Filoviridae* en un ser humano, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un agente terapéutico activo adicional.

También se proporciona un kit que incluye un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Cada uno de los kits individuales descritos en el presente documento puede comprender un marcador y/o instrucciones para el uso del compuesto en el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que lo necesite. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una infección viral por *Filoviridae* humano, que incluye una infección por el virus ébola o una infección por el virus de Marburg. En otras realizaciones, cada kit por separado también puede contener instrucciones para el uso de agentes médicos adicionales en combinación con el compuesto de la invención en el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que lo necesite. En determinadas de estas realizaciones, la enfermedad o afección es una infección viral por *Filoviridae* humano, que incluye una infección por el virus ébola o una infección por el virus de Marburg. En cada uno de los kits del presente documento, hay una realización adicional en la que el kit comprende unidades de dosis individuales de un compuesto como se describe en el presente documento, o una sal, racemato, enantiómero, diastereómero, tautómero, polimorfo, pseudopolimorfo, forma amorfa, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos de unidades de dosificación individuales pueden incluir píldoras, comprimidos, cápsulas, jeringas precargadas o cartuchos de jeringa, bolsas IV, etc., comprendiendo cada una una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto en cuestión, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el kit puede contener una única unidad de dosificación y en otros están presentes varias unidades de dosificación, tal como el número de unidades de dosificación requeridas para un régimen o período específico.

También se proporcionan artículos de fabricación que incluyen un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un recipiente. En un aspecto, el artículo de fabricación comprende el compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un recipiente. En realizaciones separadas, el recipiente del artículo de fabricación puede ser un vial, tarro, ampolla, jeringa precargada, paquete de tipo blíster, estaño, lata, botella, caja o una bolsa intravenosa.

VI. MÉTODOS DE INHIBICIÓN DE UNA POLIMERASA DE *FILOVIRIDAE*

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto o composición de la invención para su uso en métodos de inhibición de la actividad polimerasa de *Filoviridae* que comprende la etapa de tratar una muestra sospechosa de contener *Filoviridae* con un compuesto o composición de la invención.

Filoviridae que pueden tratarse usando los compuestos de la presente invención son virus de ARN monocatenario de sentido negativo que típicamente infectan primates. Los filovirus se pueden multiplicar en prácticamente todos los tipos de células. Los antígenos y viriones de Filovirus se encuentran principalmente en fibroblastos e intersticio de un individuo infectado. Hay tres géneros identificados de filovirus: el virus del Ébola (EBOV, cinco especies); el virus de Marburg (MARV); y el Cuevavirus, también conocido como el virus de Llovio (LLOV). Los viriones (partículas virales) tienen una forma característica de partículas largas, cilíndricas y filamentosas que pueden ser rectas, curvadas, enrolladas o encontrarse en una configuración con forma de "6" o "U". Ocasionalmente están ramificadas y las partículas varían mucho en longitud, pero el diámetro (aproximadamente 80 nm) es constante. El genoma de los filovirus comprende siete genes que codifican 4 proteínas estructurales del virión (VP30, VP35, nucleoproteína (NP) y una proteína polimerasa (L-pol)) y 3 proteínas asociadas a la membrana (VP40, glicoproteína (GP) y VP24).

El género del virus Ebola incluye cinco especies conocidas: (1) *Bundibugyo ebolavirus*, también conocido como virus Bundibugyo (BDBV, anteriormente BEBOV); (2) *Reston ebolavirus*, también conocido como virus Reston o Ebola-Reston (RESTV, antes REBOV); (3) *Sudan ebolavirus*, también conocido como virus Sudán o Ébola-Sudán (SUDV,

antes SEBOV); (4) *Tai Forest ebolavirus*, también conocido como virus de Tai Forest o Ebola–Tai (TAFV, antes CIEBOV); y (5) *Zaire ebolavirus*, también conocido como virus ébola o ébola–Zaire (EBOV, antes ZEBOV).

5 El género del virus de Marburg incluye la especie *Marburg marburgvirus*, también conocido como virus de Marburg (MARV) o virus de Ravn (RAVV). El género Cuevavirus incluye la especie *Lloviu cuevavirus*, también conocido como el virus de Lloviu (LLOV).

10 Las composiciones de la invención pueden actuar como inhibidores de la polimerasa de *Filoviridae*, como intermedios para dichos inhibidores o tienen otras utilidades como se describe más adelante. Los inhibidores se unirán en localizaciones sobre la superficie o en una cavidad de la polimerasa de *Filoviridae* que tiene una geometría única de la polimerasa de *Filoviridae*. Las composiciones que se unen a la polimerasa de *Filoviridae* se pueden unir con varios grados de reversibilidad. Los compuestos que se unen de forma sustancialmente irreversible son candidatos ideales para usar en este procedimiento de la invención. Una vez marcadas, las composiciones que se unen de forma sustancialmente irreversible son útiles como sondas para la detección de la polimerasa de *Filoviridae*.
15 De acuerdo con esto, la divulgación se refiere a procedimientos de detección de la polimerasa de *Filoviridae* en una muestra o sujeto que se sospecha que contiene la polimerasa de *Filoviridae*, que comprende las etapas de: tratar dicha muestra que se sospecha que contiene la polimerasa de *Filoviridae* con una composición que comprende un compuesto de la invención unido a un marcador; y observar el efecto de la muestra sobre la actividad del marcador. Los marcadores adecuados son bien conocidos en el campo diagnóstico e incluyen radicales libres estables, fluoróforos, radioisótopos, enzimas, grupos quimioluminiscentes y cromógenos. Los compuestos de la presente memoria descriptiva están marcados de forma convencional usando grupos funcionales tales como hidroxilo, carboxilo, sulfhidrilo o amino.

25 Dentro del contexto de la invención, las muestras que se sospecha que contiene la polimerasa de *Filoviridae* incluyen materiales naturales o hechos por el hombre tales como organismos vivos; cultivos tisulares o celulares; muestras biológicas tales como muestras de material biológico (sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, esputo, saliva, muestras tisulares y similares); muestras de laboratorio; muestras de alimentos, agua o aire; muestras de biproductos tales como extractos de células, particularmente células recombinantes que sintetizan una glicoproteína deseada; y similares. Normalmente, se sospechará que la muestra contiene un organismo que induce la polimerasa de *Filoviridae*, con frecuencia un organismo patogénico tal como el virus *Filoviridae*. Las muestras pueden estar contenidas en cualquier medio que incluya agua y mezclas de disolvente orgánico/agua. Las muestras incluyen organismos vivos tales como seres humanos y materiales hechos por el hombre tales como cultivos celulares.

35 La etapa de tratamiento de la divulgación comprende añadir la composición de la invención a la muestra o comprende añadir un precursor de la composición a la muestra. La etapa de la adición comprende cualquier procedimiento de administración como se ha descrito con anterioridad.

40 Si lo desea, la actividad polimerasa de *Filoviridae* después de la aplicación de la composición se puede observar mediante cualquier método, incluidos los métodos directos e indirectos de detección de actividad polimerasa de *Filoviridae*. Se contemplan todos los procedimientos cuantitativos, cualitativos y semicuantitativos de determinación de la actividad de la polimerasa de *Filoviridae*. Normalmente se aplica uno de los procedimientos de selección descritos con anterioridad, no obstante también es aplicable cualquier procedimiento tal como la observación de las propiedades fisiológicas de un organismo vivo.

45 Organismos que contienen polimerasa de *Filoviridae* incluyen el virus *Filoviridae*. Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento o la profilaxis de infecciones producidas por *Filoviridae* en animales o en el hombre.

50 Sin embargo, en el cribado de compuestos capaces de inhibir virus *Filoviridae* humanos, se debe tener en cuenta que los resultados de los ensayos enzimáticos pueden no correlacionarse con los ensayos de cultivo celular. Por lo tanto, un ensayo basado en células debería ser la herramienta de cribado principal.

55 En otra realización más, la presente solicitud proporciona el compuesto de la invención para su uso en métodos de tratamiento de una infección por virus *Filoviridae* en un ser humano, que comprende: Administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula IV o una sal, solvato y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la infección producida por *Filoviridae* está causada por un virus *Filoviridae*. En algunas realizaciones, la infección producida por *Filoviridae* está causada por un virus del Ébola. En algunas realizaciones, la infección producida por *Filoviridae* está causada por *Ebolavirus de Bundibugyo*, *Ebolavirus Reston*, *Ebolavirus de Sudán*, *Ebolavirus de Tai Forest*, o *Ebolavirus Zairea*. En algunas realizaciones, la infección producida por *Filoviridae* está causada por un virus de *Marburg*. En algunas realizaciones, la infección producida por *Filoviridae* está causada por un virus de Lloviu. En algunas realizaciones, se inhibe una polimerasa de *Filoviridae*.

65 El compuesto de la presente invención se puede usar en el tratamiento de un ser humano que ya sufre una infección por *Filoviridae* o puede administrarse profilácticamente para reducir o prevenir la posibilidad de infección por *Filoviridae*. *Filoviridae* las infecciones pueden caracterizarse por fiebre hemorrágica, hematemesis, diarrea, dolor

abdominal retroesternal y postración. Las infecciones producidas por *Filoviridae* pueden caracterizarse por fiebre hemorrágica, hematemesis, diarrea, dolor abdominal retroesternal y postración. El período de incubación es de aproximadamente 21 días después del contacto con un ser humano que sufra una infección por *Filoviridae*. El resultado de la infección por *Filoviridae* es, típicamente, la muerte.

5

VII. DETECCIÓN SELECTIVA PARA INHIBIDORES DE LA POLIMERASA DE *FILOVIRIDAE*

Las composiciones de la invención se criban para detectar actividad inhibidora contra la polimerasa de *Filoviridae* mediante cualquiera de las técnicas convencionales para evaluar la actividad enzimática. Dentro del contexto de la invención, típicamente, las composiciones se criban primero para la inhibición de la polimerasa de *Filoviridae in vitro* y las composiciones que muestran actividad inhibidora se criban para detectar actividad *in vivo*. Las composiciones que tienen una K_i *in vitro* (constantes inhibitorias) de menos de aproximadamente 5×10^{-6} M y, preferiblemente, menos de aproximadamente 1×10^{-7} M se prefieren para su uso *in vivo*.

15 Las detecciones selectivas *in vitro* se han descrito con detalle y no se detallarán aquí. Sin embargo, los ejemplos describen ensayos *in vitro* adecuados.

VIII. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS

20 Ejemplos

Determinadas abreviaturas y siglas se utilizan en la descripción de los detalles experimentales. Aunque la mayoría de estos los entendería un experto en la técnica, la Tabla 1 contiene una lista de muchas de estas abreviaturas y acrónimos.

25

Tabla 1. Lista de abreviaturas y acrónimos.

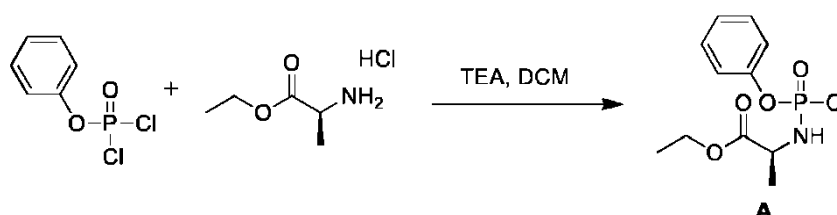
Abreviatura	Significado
AC ₂ O	anhídrido acético
AIBN	2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo)
Bn	bencilo
BnBr	Bromuro de bencilo
BSA	bis(trimetilsilil)acetamida
BzCl	Cloruro de benzoílo
CDI	carbonildiimidazol
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DBN	1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DBU	1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-5-eno
DCA	dicloroacetamida
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DME	1,2-dimetoxietano
DMTCI	Cloruro de dimetoxitritilo
DMSO	dimetilsulfóxido
DMTr	4, 4'-dimetoxitritilo
DMF	dimetilformamida
EtOAc	acetato de etilo
ESI	ionización por electropulverización
EtOAc	acetato de etilo
HMDS	hexametildisilazano
HPLC	Cromatografía de líquidos de presión alta

Abreviatura	Significado
LDA	Diisopropilamida de litio
EMBR	espectrometría de masas de baja resolución
MCPBA	ácido meta-cloroperbenzoico
MeCN	acetonitrilo
MeOH	Metanol
MMTc	Cloruro de monometoxitritilo
m/z o m/e	proporción masa-carga
MH ⁺	Masa más 1
MH ⁻	Masa menos 1
MsOH	Ácido metanosulfónico
EM o em	Espectro de masas
MTBE	Éter terc-butilmetílico
NBS	N-bromosuccinimida
Ph	fenilo
ta o t.a.	temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
THF	tetrahidrofurano
TMSCl	clorotrimetilsilano
TMSBr	bromotrimetilsilano
TMSI	yodotrimetilsilano
TMSOTf	(trimetilsilil)trifluorometilsulfonato
TEA	triethylamina
TBA	tributilamina
TBAP	Pirofosfato de tributilamonio
TBSCl	Cloruro de t-butildimetilsililo
TEAB	Bicarbonato de triethylamonio
TFA	ácido trifluoroacético
TLC o tlc	cromatografía en capa fina
Tr	Trifenilmetilo
Tol	4-metilbenzoilo
Turbo Grignard	Mezcla 1:1 de cloruro de isopropilmagnesio y cloruro de litio
δ	Partes por millón campo debajo de tetrametilsilano

A. Preparación de compuestos

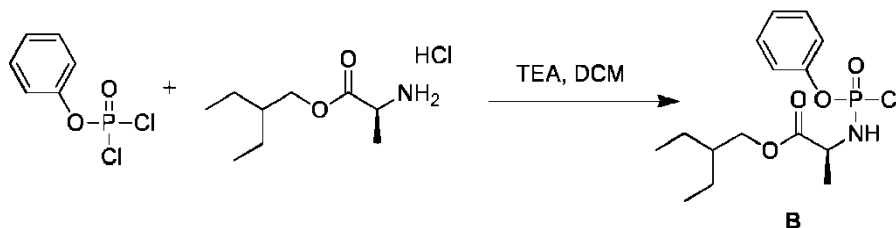
5 Los ejemplos 1, 3, 11, 13, 15, 18, 20, 24-34 y 35a son ejemplos de referencia. Los compuestos 1, 10, 15, 21-31 y el diastereómero (R) del compuesto 9 son compuestos de referencia.

Ejemplo 1. 2-(Cloro(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-etilo (Cloridato A)



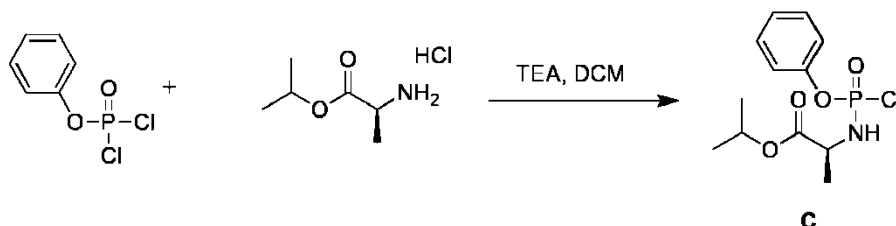
Se disolvió hidrocloreto de éster de etilalanina (1,69 g, 11 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 ml) y la mezcla se agitó con enfriamiento a 0°C en N_2 (g). Se añadió diclorofosfato de fenilo (1,49 ml, 10 mmol) seguido de la adición gota a gota de Et_3N durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se calentó lentamente a TA y se agitó durante aproximadamente 12 horas. Se añadió Et_2O anhidro (50 ml) y la mezcla se agitó durante aproximadamente 30 minutos. El sólido que se formó se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 0-50 % de EtOAc en hexanos para proporcionar un intermedio **A**. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,39–7,27 (m, 5H), 4,27 (m, 3H), 1,52 (m, 3H), 1,32 (m, 3H). RMN ^{31}P (121,4 MHz, CDCl_3) δ 8,2, 7,8.

10 **Ejemplo 2. 2-(Cloro(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-2-etilbutilo (Cloridato B)**



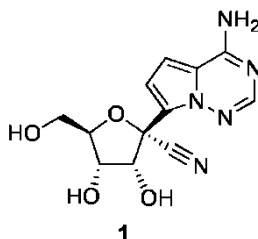
15 El éster clorofosforamidato de 2-etilbutilalanina **B** se preparó usando el mismo procedimiento que el cloridato **A** excepto que sustituye el éster de 2-etilbutilo por éster de etilalanina. El material se usa en bruto en la siguiente reacción. El tratamiento con metanol o etanol forma el producto desplazado con la señal de LCMS requerida.

Ejemplo 3. 2-(Cloro(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-isopropilo (Cloridato C)

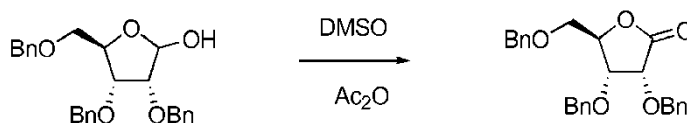


20 El éster clorofosforamidato de isopropilalanina **C** se preparó usando el mismo procedimiento que el cloridato **A** excepto que sustituye el éster de isopropilalanina por éster de etilalanina. El material se usa en bruto en la siguiente reacción. El tratamiento con metanol o etanol forma el producto desplazado con la señal de LCMS requerida.

25 **Ejemplo 4. (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (Compuesto 1)**



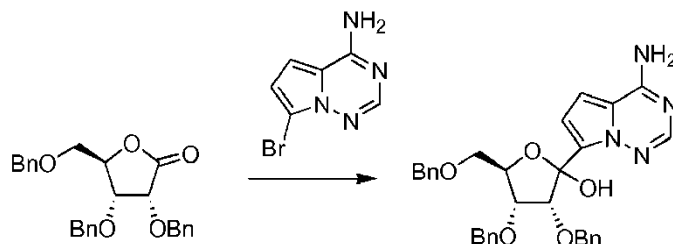
30 La preparación de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo se describe a continuación.



35 El lactol comercialmente disponible (10 g, 23.8 mmol) se disolvió en DMSO anhidro (30 ml) en N_2 (g). Se añadió Ac_2O (20 ml) y la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante aproximadamente 48 horas. La mezcla de reacción se vertió en H_2O en hielo (500 ml) y la mezcla se agitó durante 20 minutos. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron a continuación con H_2O (3 x 200 ml). El extracto orgánico se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 y se sometió a cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 25 % en hexanos para proporcionar la

40

lactona. RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 7,30–7,34 (m, 13H), 7,19–7,21 (m, 2H), 4,55–4,72 (m, 6H), 4,47 (s, 2H), 4,28 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 3,66 (m, 2H). LCMS m/z 436,1 [M+H $_2$ O], 435,2 [M+OH] $^-$ Tr = 2,82 min. HPLC Tr = 4,59 [2–98 % de ACN en H $_2$] durante 5 minutos a 2 un flujo de 2 ml/min.

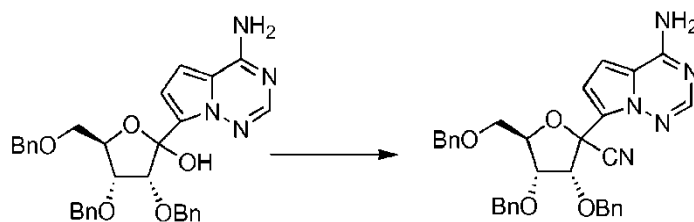


5

El bromopirazol (preparado según el documento WO2009/132135) (0,5 g, 2,4 mmol) se suspendió en THF anhidro (10 ml) en N $_2$ (g). La suspensión se agitó y se añadió TMSCl (0,67 ml, 5,28 mmol). La mezcla se agitó durante 20 minutos a TA y, después, se enfrió a aproximadamente -78 °C, después de lo cual se añadió lentamente una solución de n-BuLi (6 ml, 1,6 N en hexanos, 9,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a aproximadamente -78 °C y luego se añadió la lactona (1 g, 2,4 mmol) mediante jeringa. Cuando la reacción se completó según se midió mediante LCMS, se añadió AcOH para inactivar la reacción. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en una mezcla de CH $_2$ Cl $_2$ y H $_2$ O (100 ml, 1:1). La capa orgánica se separó y se lavó con H $_2$ O (50 ml). A continuación, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO $_4$, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0-50 % de EtOAc en hexanos, para proporcionar el producto como una mezcla 1:1 de anómeros. LCMS m/z 553 [M+H].

10

15

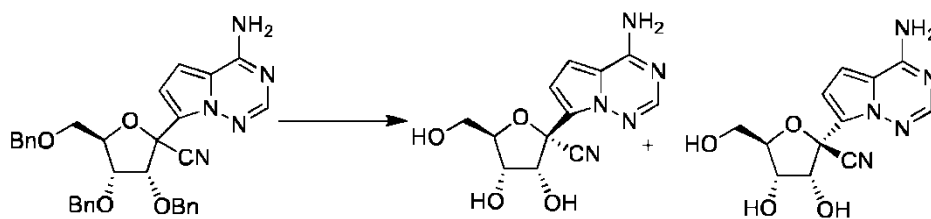


El hidroxinucleósido (1,1 g, 2,0 mmol) se disolvió en CH $_2$ Cl $_2$ anhidro (40 ml) y la solución se enfrió con agitación a aproximadamente -78 °C en N $_2$ (g). Se añadió TMSCN (0,931 ml, 7 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 minutos más. Se añadió lentamente TMSOTf (1,63 ml, 9,0 mmol) a la reacción y la mezcla se agitó durante 1 hora. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con CH $_2$ Cl $_2$ (120 ml) y NaHCO $_3$ acuoso (120 ml) para detener la reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos más y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con CH $_2$ Cl $_2$ (150 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO $_4$ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH $_2$ Cl $_2$ y se sometió a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-75 % de EtOAc y hexanos para proporcionar el nucleósido tribencilciano nucleósido como una mezcla de anómeros. RMN ^1H (300 MHz, CD $_3$ CN) δ 7,94 (s, 0,5H), 7,88 (s, 0,5H), 7,29–7,43 (m, 13H), 7,11–7,19 (m, 1H), 6,82–6,88 (m, 1H), 6,70–6,76 (m, 1H), 6,41 (sa, 2H), 5,10 (d, $J = 3,9$ Hz, 0,5H), 4,96 (d, $J = 5,1$ Hz, 0,5H), 4,31–4,85 (m, 7H), 4,09–4,18 (m, 2H), 3,61–3,90 (m, 2H). LCMS m/z 562 [M+H].

20

25

30



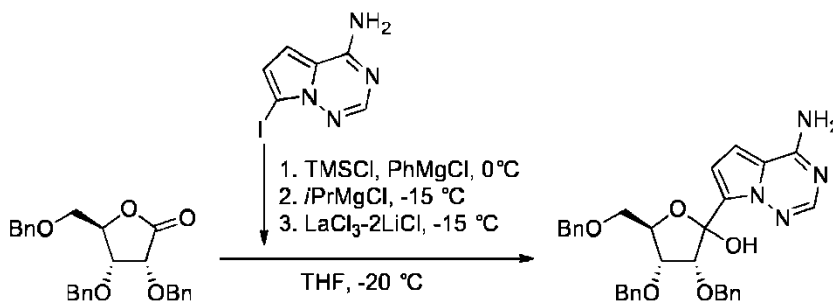
beta 1

El nucleósido de tribencilciano (70 mg, 0,124 mmol) se disolvió en CH $_2$ Cl $_2$ anhidro (2 ml) y se enfrió a aproximadamente -20 °C en N $_2$ (g). Se añadió una solución de BCl $_3$ (IN en CH $_2$ Cl $_2$, 0,506 ml, 0,506 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora -78 °C. Cuando la LC/MS indicó que la reacción se había completado, se añadió MeOH para inactivar la reacción. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se sometió a HPLC C18 de fase inversa, eluyendo durante 5 minutos con H $_2$ O (0,1 % de TFA), seguido de un gradiente de 0-70 % de MeCN en H $_2$ O (0,1 % de TFA) durante 35 minutos, para eluir el anómero α , y el anómero β 1. (anómero α) RMN ^1H (300 MHz, D $_2$ O) δ 7,96 (s, 1H), 7,20 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 4,97 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,56–4,62 (m, 1H), 4,08–4,14 (m, 1H), 3,90 (dd, $J = 12,9, 2,4$ Hz, 1H), 3,70 (dd, $J = 13,2, 4,5$ Hz, 1H). (anómero β) RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 7,91 (s, 1H), 7,80–8,00

40

(s a, 2H), 6,85–6,89 (m, 2H), 6,07 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 5,17 (s a, 1H), 4,90 (s a, 1H), 4,63 (t, $J = 3,9$ Hz, 1H), 4,02–4,06 (m, 1H), 3,94 (s a, 1H), 3,48–3,64 (m, 2H). LCMS m/z 292,2 [M+H], 290,0 [M-H]. Tr= 0,35 min. ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO), 156,0, 148,3, 124,3, 117,8, 117,0, 111,2, 101,3, 85,8, 79,0, 74,7, 70,5, 61,4. HPLC Tr = 1,32 min

5 Preparación de (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol usando $\text{LaCl}_3\text{-2LiCl}$



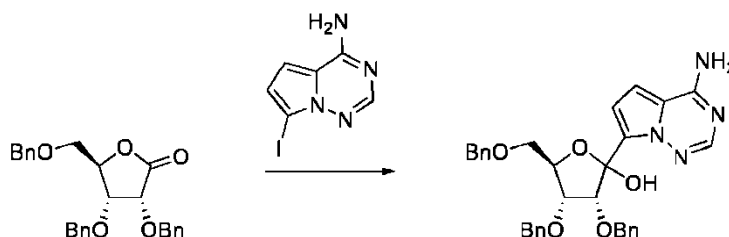
10 Se preparó una solución de 7-yodopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amina (7,5 g, 28,8 mmol, 1,0 eq.) en THF (67 ml). La solución se enfrió hasta aproximadamente 0 °C y se añadió TMSCl (3,3 ml, 30,3 mmol, 1,05 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 30 minutos y, a continuación, se añadió PhMgCl (2 M en THF; 28 ml, 56,8 mmol, 1,97 eq.) mientras se mantenía una temperatura interna por debajo de 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 35 minutos y, después, se enfrió a aproximadamente -15 °C. A continuación se añadió *i*PrMgCl (2 M en THF, 14 ml, 30,2 mmol, 1,05 eq.) mientras se mantenía una temperatura interna por debajo de aproximadamente -10 °C. Después de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente -15 °C, se añadió $\text{LaCl}_3\text{-2LiCl}$ (0,6 M en THF, 50 ml, 14,4 mmol, 0,5 eq.) mientras se mantenía una temperatura interna por debajo a aproximadamente -15 °C. La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 25 minutos a aproximadamente -20 °C.

20 En un matraz separado, una solución de (3R, 4R, 5R) -3,4-bis(benciloxi)5-((benciloxi)metil)dihidrofuran-2(3H)-ona (10,0 g, 23,9 mmol, 0,83 eq.) se preparó en THF (45 ml). La solución se enfrió a aproximadamente -20 °C, a continuación se transfirió a la solución de Grignard mientras se mantenía una temperatura interna inferior a aproximadamente -15 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a aproximadamente -20 °C durante aproximadamente 30 minutos.

25 La reacción se inactivó con HCl 2 M (53 ml) y la mezcla se calentó a aproximadamente 15 °C. Se añadió *i*PrOAc (38 ml) y las fases orgánica y acuosa se separaron. La capa acuosa inferior se descargó y la capa orgánica superior se lavó secuencialmente con 2,5 % en peso de NaHCO_3 (53 ml), 2,5 % en peso de NaHCO_3 (53 ml) y 10% en peso de NaCl (53 ml).

30 La fase orgánica se concentró a aproximadamente 45 ml y después se diluyó con *i*PrOAc (75 ml). La solución se concentró de nuevo a aproximadamente 45 ml y después se diluyó con *i*PrOAc (23 ml). La solución se concentró a aproximadamente 45 ml y, después, se filtró sobre una almohadilla de Celite. La solución filtrada se concentró a aproximadamente 26 ml y después se diluyó con MTBE (75 ml). Después de 2 horas, se añadió lentamente heptano (23 ml) y la suspensión espesa se agitó a aproximadamente 25 °C durante aproximadamente 2 horas y, después, se enfrió a aproximadamente -5 °C durante aproximadamente 8 horas. Se aislaron los sólidos mediante filtración y la torta del filtro se lavó con MTBE/heptano (4:1, 23 ml). Los sólidos se secaron en un horno de vacío a no más de aproximadamente 35 °C para proporcionar (3R, 4R, 5R) -2- (4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol.

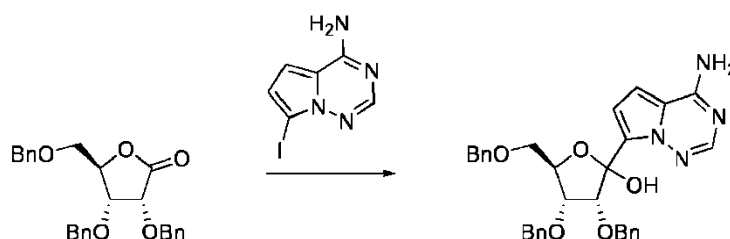
35 Preparación de (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol usando CeCl_3



45 El yodopirazol (5,02 g, 19,3 mmol) se disolvió en THF (45 g) y la solución se enfrió a aproximadamente 0 °C con agitación. Se añadió TMSCl (2,04 g, 18,7 mmol), y después de aproximadamente 1 hora se añadió cloruro de fenilmagnesio (2,0 M en THF, 19,9 g, 38,2 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente -20 °C y

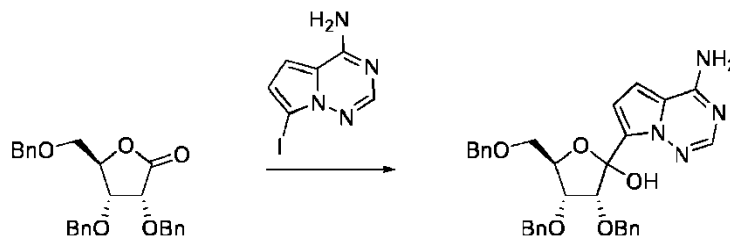
5 *lentamente se añadió* cloruro de isopropilmagnesio (2,0 M en THF, 9,99 g, 20,5 mmol). Después de aproximadamente 30 minutos, la mezcla de reacción se transfirió a una mezcla de cloruro de cerio anhidro (4,75 g, 19,3 mmol) en THF (22 g) a aproximadamente -20 °C. Después de aproximadamente 1,5 horas, se añadió lentamente una solución de lactona (6,73 g, 16,1 mmol) en THF (22 g) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante aproximadamente 1 hora. Se añadió HCl 2 M (41 g), la mezcla se calentó a aproximadamente 15 °C, y se añadió acetato de isopropilo (35 g). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ al 2,5 % (2 x 40 g), NaCl al 10 % (1 x 35 g) y se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. Se cargó acetato de isopropilo (44 g) y la solución se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. Se cargó acetato de isopropilo (43 g) y la solución se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. La solución se filtró y el filtrado se concentró a aproximadamente 18 ml de volumen. Se añadió éter de *tert*-butilmetilo (37 g), seguido de cristales de siembra del producto (10,7 mg). Después de aproximadamente 14 horas, se añadió *n*-heptano (10,5 g) y la mezcla se enfrió a aproximadamente -5 °C y se filtró. Los sólidos se lavaron con éter de *tert*-butilmetilo (9 g) a aproximadamente -5 °C y se secaron al vacío a aproximadamente 34 °C durante aproximadamente 15 horas para proporcionar el producto.

15 Preparación de (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol usando CeCl₃ e iPrMgCl-LiCl



20 El yodopirazol (5,03 g, 19,3 mmol) se disolvió en THF (45 g) y la solución se enfrió a aproximadamente 0 °C con agitación en N₂ (g). Se añadió TMSCl (2,06 g, 19,0 mmol), y después de aproximadamente 1 hora se añadió cloruro de fenilmagnesio (2,0 M en THF, 20,23 g, 38,8 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente -20 °C y lentamente se añadió complejo de cloruro de isopropilmagnesio-cloruro de litio (2,0 M en THF, 15,37 g, 21,0 mmol). Después de aproximadamente 1 hora, la mezcla de reacción se transfirió a una mezcla de cloruro de cerio anhidro (4,77 g, 19,4 mmol) en THF (22 g) a aproximadamente -20 °C. Después de aproximadamente 1 hora, se añadió lentamente una solución de lactona (6,75 g, 16,1 mmol) en THF (23 g) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante aproximadamente 1,5 horas. Se añadió HCl 2 M (40 g), la mezcla se calentó a aproximadamente 15 °C, y se añadió acetato de isopropilo (35 g). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ al 2,5 % (2 x 40 g), NaCl al 10 % (1 x 36 g) y se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. Se añadió acetato de isopropilo (44 g) y la solución se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. La solución se filtró y el filtrado se concentró a aproximadamente 18 ml de volumen. Se añadió éter de *tert*-butilmetilo (37 g), seguido de cristales de siembra del producto (10,5 mg). Después de aproximadamente 14 horas, se añadió *n*-heptano (11 g) y la mezcla se enfrió a aproximadamente -5 °C y se filtró. Los sólidos se lavaron con éter de *tert*-butilmetilo (9 g) a aproximadamente -5 °C y se secaron al vacío a aproximadamente 34 °C durante aproximadamente 15 horas para proporcionar el producto.

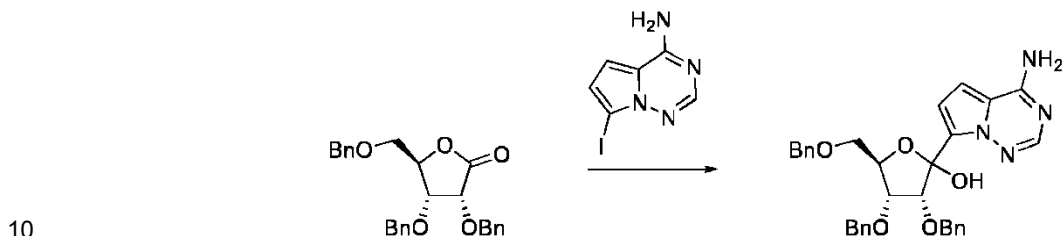
35 Preparación de (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol usando YCl₃



40 El yodopirazol (4,99 g, 19,2 mmol) se disolvió en THF (44 g) y la solución se enfrió a aproximadamente 0 °C con agitación. Se añadió TMSCl (2,45 ml, 19,4 mmol), y después de aproximadamente 30 minutos se añadió cloruro de fenilmagnesio (2,0 M en THF, 20,29 g, 39,0 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente -20 °C y *lentamente se añadió* cloruro de isopropilmagnesio (2,0 M en THF, 9,85 g, 20,1 mmol). Después de aproximadamente 30 minutos, la mezcla de reacción se transfirió a una mezcla de cloruro de itrio anhidro (3,76 g, 19,3 mmol) y lactona (6,68 g, 16,0 ml) en THF (24 g) a aproximadamente -20 °C. Después de aproximadamente 2,5 horas, se añadió HCl 2 M (30 g), la mezcla se calentó a aproximadamente 15 °C, y se añadió acetato de isopropilo (22 g). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ al 2,5 % (2 x 40 g), NaCl al 10 % (1 x 35 g) y se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. Se cargó acetato de isopropilo (44 g) y la solución se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. Se cargó acetato de isopropilo (45 g) y la solución se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. La solución se filtró y el filtrado se concentró a aproximadamente 18 ml de

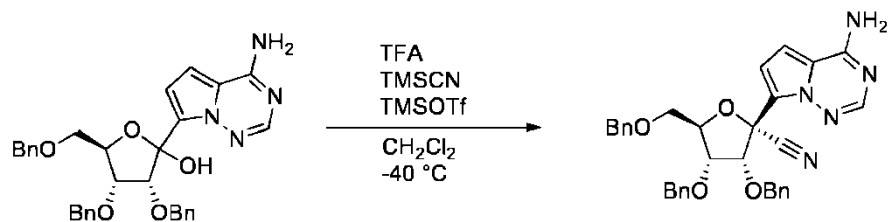
volumen. Se añadió éter de terc-butilmetilo (37 g), seguido de cristales de siembra del producto (11,5 mg). Después de aproximadamente 1 hora se añadió *n*-heptano (15 ml) y la mezcla se enfrió a aproximadamente -5 °C y se agitó durante aproximadamente 17 horas. La suspensión se filtró y los sólidos se lavaron con una mezcla de éter de terc-butilmetilo (8 g)/*n*-heptano (2 g) preenfriada a aproximadamente -5 °C. Los sólidos resultantes se secaron al vacío a aproximadamente 34 °C durante aproximadamente 22 horas, para proporcionar el producto.

Preparación de (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol usando NdCl₃



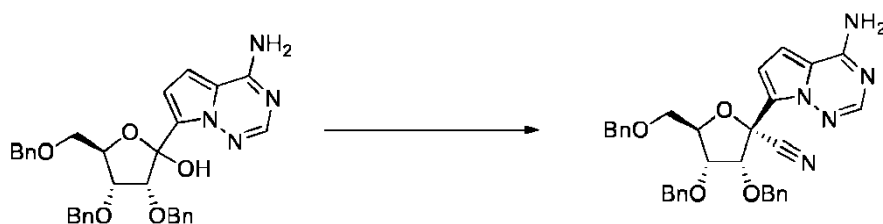
El yodopirazol (5,02 g, 19,3 mmol) se disolvió en THF (38 g) y la solución se enfrió a aproximadamente 0 °C con agitación en N₂ (g). Se añadió TMSCl (2,45 ml, 19,4 mmol), y después de aproximadamente 1 hora se añadió cloruro de fenilmagnesio (2,0 M en THF, 19,75 g, 38,0 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente -20 °C y lentamente se añadió cloruro de isopropilmagnesio (2,0 M en THF, 9,40 g, 19,2 mmol). Después de aproximadamente 1,5 horas, la mezcla de reacción se transfirió a una mezcla de cloruro de neodimio (III) anhidro (4,03 g, 16,1 mmol) y lactona (6,70 g, 16,0 mmol) en THF (22 g) a aproximadamente -20 °C. Después de aproximadamente 1,5 horas, la mezcla de reacción se calentó a -10 °C y, después de 2 horas adicionales, se añadió HCl 2 M (36 g). La mezcla se calentó a aproximadamente 15 °C y se añadió acetato de iso-propilo (23 g). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ al 2,5 % (2 x 44 g), NaCl al 10 % (1 x 41 g) y se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. Se cargó acetato de isopropilo (44 g) y la solución se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. Se cargó acetato de isopropilo (44 g) y la solución se concentró a aproximadamente 30 ml de volumen. La solución se filtró y el filtrado se concentró a aproximadamente 18 ml de volumen. Se añadió éter de terc-butilmetilo (37 g), seguido de cristales de siembra del producto (11,9 mg). Después de aproximadamente 1 hora se añadió *n*-heptano (15 ml) y la mezcla se enfrió a aproximadamente -5 °C y se agitó durante aproximadamente 15 horas. La suspensión se filtró y los sólidos se lavaron con una mezcla de éter de terc-butilmetilo (8 g)/*n*-heptano (11 g) preenfriada a aproximadamente -5 °C. Los sólidos resultantes se secaron al vacío a aproximadamente 34 °C durante aproximadamente 25 horas, para proporcionar el producto.

30 Preparación de (2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo



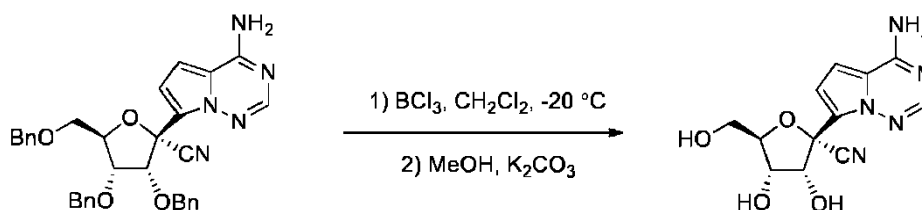
35 A una solución preenfriada (-40 °C) de (3R, 4R, 5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol (10,0 gramos, 18,1 mmol, 1,0 eq.) en DCM (100 ml) se cargó con ácido trifluoroacético (6,19 gramos, 54,3 milimoles, 3,0 eq.), seguido de una solución pre-enfriada (-30 °C) de TMSOTf (24,1 gramos, 108,6 mmoles, 6,0 eq.) y TMSCN (10,8 gramos, 108,6 mmoles, 6,0 eq.) en DCM (50 ml) mientras se mantiene la temperatura interna por debajo de aproximadamente -25 °C. La mezcla de reacción se agitó a una temperatura inferior a aproximadamente -30 °C durante no menos de 10 minutos y se inactivó en una solución preenfriada (aproximadamente -10 °C) de KOH ac. al 20 % en peso (120 ml). La mezcla bifásica se calentó a temperatura ambiente. La capa orgánica se separó y se lavó con NaCl ac. al 10 % en peso (3 X 50 ml). La fase orgánica se filtró, se concentró al vacío hasta aproximadamente 50 ml, se volvió a diluir con tolueno (200 ml) y se concentró al vacío hasta 140 ml a aproximadamente 50 °C. La solución se sembró con (2R, 3R, 4R, 5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo a aproximadamente 55 °C. Se agitó a aproximadamente 55 °C durante aproximadamente una hora y se enfrió a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 6 horas. Los sólidos se aislaron por filtración y la torta del filtro se lavó con tolueno (30 ml). Los sólidos se secaron al vacío a aproximadamente 50 °C.

50 Preparación de (2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo mediante química de flujo



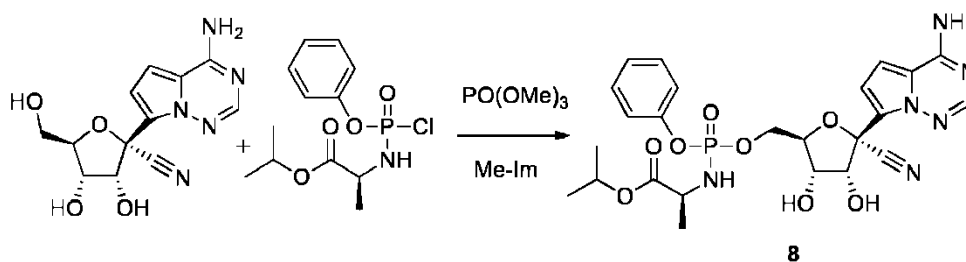
Se bombearon secuencialmente soluciones de (3R, 4R, 5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil) tetrahidrofuran-2-ol (23,0 g en 460,07 g de DCM), TMSOTf (55,81 g en 138,07 g de DCM) y TMSCN (25,03 g en 138,10 g de DCM) en un reactor tubular a aproximadamente -40 °C. La mezcla de reacción se recogió en un matraz, se mantuvo en un baño de hielo, que contenía una solución acuosa de KOH al 20 % (46,91 g de KOH y 210 g de agua). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó secuencialmente con solución acuosa de KOH al 10 % (10 g de KOH y 90 ml de agua) y con salmuera al 10 % (2 x 100 g). La fase orgánica se concentró al vacío hasta aproximadamente 4 volúmenes, se cargó alcohol isopropílico (162,89 g) y la mezcla se concentró al vacío hasta aproximadamente 10 volúmenes. El contenido se calentó a aproximadamente 60 °C, luego se ajustó a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 6, 5 horas y se agitó a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 15,5 horas. La suspensión espesa resultante se filtró, los sólidos se aclararon con alcohol isopropílico (61,79 g) y luego se secaron a aproximadamente 5 0°C a presión reducida durante la noche para proporcionar el producto.

Preparación de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-((hidroxi)metil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo



El nucleósido de tribencilciano (48,8 g, 86,9 mmol, 1,0 eq.) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (244 ml) y se enfrió a aproximadamente -20 °C. Gota a gota se añadió una solución de BCl₃ (1M en CH₂Cl₂, 295 ml, 295 mmol, 3,4 eq.), manteniendo la temperatura interna por debajo de aproximadamente -15 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a aproximadamente -20 °C. Se añadió MeOH (340 ml) gota a gota, manteniendo la temperatura interna por debajo de -15 °C. La solución resultante se destiló a aproximadamente 250 ml, luego se rellenó con aproximadamente 250 ml de MeOH. La solución resultante se destiló de nuevo a aproximadamente 250 ml, después se rellenó con aproximadamente 250 ml de MeOH y, finalmente, se destiló a aproximadamente 125 ml. Se añadió agua (125 ml), seguido de una solución de K₂CO₃ (20 % en peso en agua, 125 ml). Se comprobó el pH y se encontró que era ~ 3. Se añadió una solución K₂CO₃ (20 % en peso en agua, 50 ml), y se encontró que el pH era ~ 8. La suspensión espesa resultante se agitó durante la noche, después se filtró y se lavó con agua (50 ml) y MeOH (50 ml). La torta del producto húmedo se secó durante la noche a aproximadamente 4 0°C durante la noche. RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 7,96 (s, 1H), 7,20 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,97 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,56–4,62 (m, 1H), 4,08–4,14 (m, 1H), 3,90 (dd, J = 12,9, 2,4 Hz, 1H), 3,70 (dd, J = 13,2, 4,5 Hz, 1H).

Ejemplo 11. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino) propanoato de (2S)-2-isopropilo (Compuesto 8)



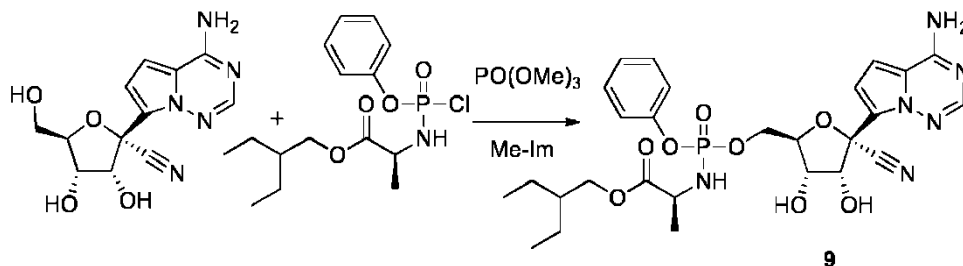
El nucleósido **1** (45 mg, 0,15 mmol) se disolvió en fosfato de trimetilo anhidro (0,5 ml) y la solución se agitó en N₂ (g) a aproximadamente 0 °C. A la solución se añadió metilimidazol (36 µl, 0,45 mmol). Se disolvió clorofosforamidato **C** (69 mg, 0,225 mmol) en THF anhidro (0,25 ml) y se añadió gota a gota a la mezcla de nucleósidos. Cuando la LCMS indicó que la reacción se había completado, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con solución de NaHCO₃ acuoso saturado, NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida.

El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 0-5 % de MeOH en CH₂Cl₂ seguido de HPLC preparativa para dar el producto. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7,95 (m, 1H), 7,31–6,97 (m, 7H), 4,94 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 4,43 (m, 3H), 4,20 (m, 1H), 3,80 (d, 1H), 1,30–1,18 (m, 9H). RMN ³¹P (121,4 MHz, CD₃OD) δ 3,8. LCMS *m/z* 561,0 [M+H], 559,0 [M–H].

5 **Ejemplo 12.** **2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino) propanoato de (2S)-2-etilbutilo (Compuesto 9)**

El compuesto 9 puede prepararse por varios métodos descritos a continuación.

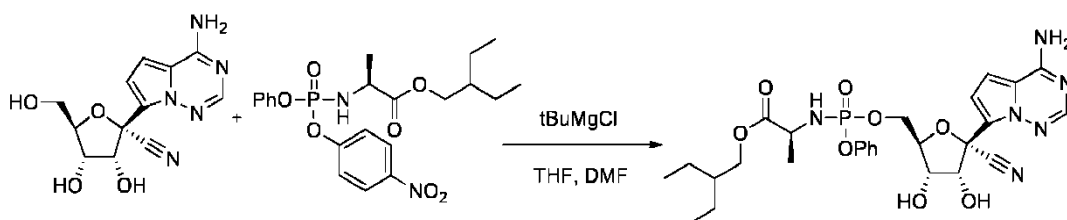
10 Procedimiento 1



9

15 Se preparó a partir del compuesto 1 y cloridato B de acuerdo con el mismo método que para la preparación del compuesto 8. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7,87 (m, 1 H), 7,31 - 7,16 (m, 5 H), 6,92 - 6,89 (m, 2 H), 4,78 (m, 1 H), 4,50 - 3,80 (m, 7 H), 1,45 - 1,24 (m, 8H), 0,95-0,84 (m, 6H). RMN ³¹P (121,4 MHz, CD₃OD) δ 3,7. LCMS *m/z* 603,1 [M+H], 601,0 [M–H].

20 Procedimiento 2



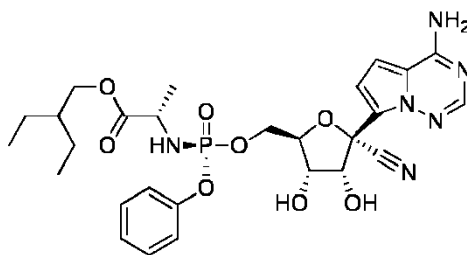
25 **2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-2-etilbutilo.** Se disolvió 2-(((4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-2-ethylbutilo (1,08 g, 2,4 mmol) en DMF anhidro (9 ml) y se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahydrofuran-2-carbonitrilo (350 mg, 1,2 mmol) a la mezcla de reacción en una porción. A continuación, se añadió cloruro de t-butilmagnesio en THF (1 M, 1,8 ml, 1,8 mmol) gota a gota a la reacción durante aproximadamente 10 minutos. La reacción se agitó durante aproximadamente 2 horas, punto en el cual la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (3 x 15 ml), seguido de una solución acuosa saturada de cloruro sódico (15 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El aceite resultante se purificó con cromatografía en columna de gel de sílice (0-10 % de MeOH en DCM) para proporcionar 2-(((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il) metoxi) (fenoxi) fosforil) amino) propanoato de (2S)-2-etilbutilo (311 mg, 43 %, mezcla diastereomérica 1:0,4 en fósforo) como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,85 (m, 1H), 7,34 - 7,23 (m, 2H), 7,21 - 7,09 (m, 3H), 6,94 - 6,84 (m, 2H), 4,78 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 4,46 - 4,33 (m, 2H), 4,33 - 4,24 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 4,05 - 3,80 (m, 3H), 1,52 - 1,39 (m, 1H), 1,38 - 1,20 (m, 7H), 0,85 (m, 6H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 3,71, 3,65. LCMS *m/z* 603,1 [M+H], 600,9 [M–H]. HPLC (gradiente de 2–98 % de MeCN–H₂O con 0,1 % de modificador de TFA durante 8,5 min, 1,5ml/min, Columna: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 um 100 Å, 4,6 x 100 mm) *t_R* = 5,544 min, 5,601 min

Separación de los diastereómeros (S) y (R)

45 Se disolvió 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-2-etilbutilo en acetonitrilo. La solución resultante se cargó en una columna quiral Lux Cellulose-2, se equilibró en acetonitrilo y se eluyó con acetonitrilo/metanol isocrático (95:5 vol/vol). El primer diastereómero de elución tenía un tiempo de retención de 17,4 minutos y el segundo diastereómero de elución tenía un tiempo de retención de 25,0 minutos.

50

El diaestereómero que eluyó primero es 2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo:



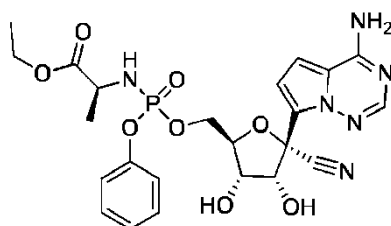
5
 10
 RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,05 (s, 1H), 7,36 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,29 (t a, J = 7,8 Hz, 2H), 7,19 – 7,13 (m, 3H), 7,11 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,73 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 4,48 – 4,38 (m, 2H), 4,37 – 4,28 (m, 1H), 4,17 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,08 – 3,94 (m, 2H), 3,94 – 3,80 (m, 1H), 1,48 (sep, J = 12,0, 6,1 Hz, 1H), 1,34 (p, J = 7,3 Hz, 4H), 1,29 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,87 (t, J = 7,4 Hz, 6H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 3,71 (s). HPLC (gradiente de 2–98 % de MeCN–H₂O con 0,1 % de modificador de TFA durante 8,5 min, 1,5ml/min, Columna: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 um 100 Å, 4,6 x 100 mm) t_R = 5,544 min.

El diaestereómero que eluyó en segundo lugar es 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo:

15
 20
 25

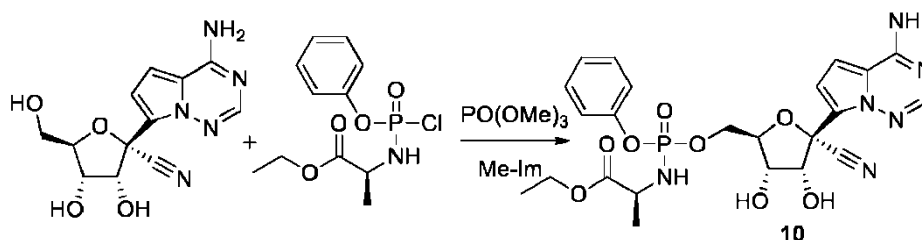
 RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,08 (s, 1H), 7,36 – 7,28 (m, 3H), 7,23 – 7,14 (m, 3H), 7,08 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,71 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 4,45 – 4,34 (m, 2H), 4,32 – 4,24 (m, 1H), 4,14 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 4,08 – 3,94 (m, 2H), 3,93 – 3,85 (m, 1H), 1,47 (sep, J = 6,2 Hz, 1H), 1,38 – 1,26 (m, 7H), 0,87 (t, J = 7,5 Hz, 6H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 3,73 (s). HPLC (gradiente de 2–98 % de MeCN–H₂O con 0,1 % de modificador de TFA durante 8,5 min, 1,5ml/min, Columna: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 um 100 Å, 4,6 x 100 mm) t_R = 5,629 min.

Ejemplo 13. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino) propanoato de (2S)-etilo (Compuesto 10)



30 La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-etilo se describe a continuación.

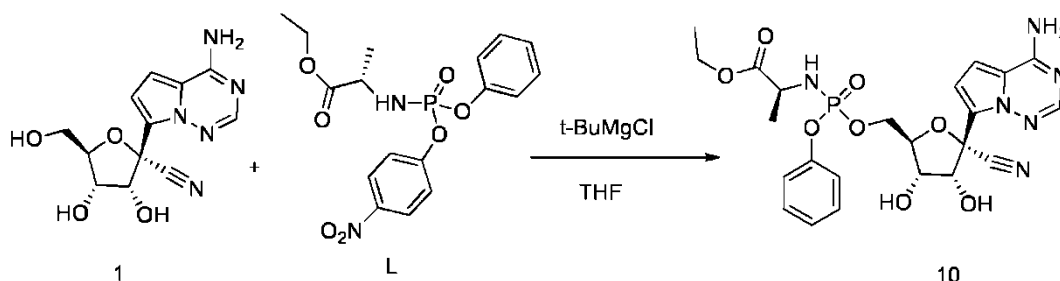
Procedimiento 1. Preparación mediante cloridato A



35

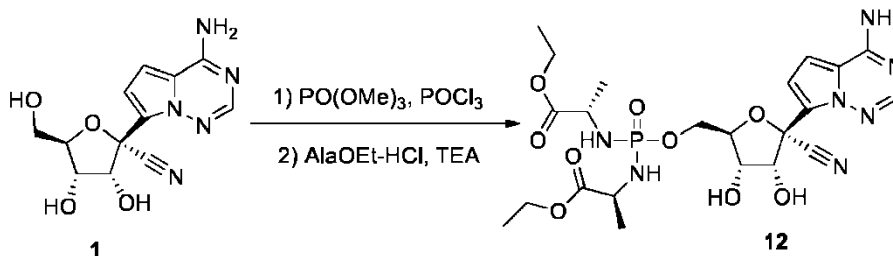
Se preparó a partir del compuesto **1** y cloridato **A** usando el mismo método que para la preparación de compuesto **8**. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7,95 (m, 1 H), 7,32 - 6,97 (m, 7 H), 4,78 (m, 1 H), 4,43 - 4,08 (m, 6 H), 3,83 (m, 1 H), 1,31 - 1,18 (m, 6 H). RMN ³¹P (121,4 MHz, CD₃OD) δ 3,7. LCMS *m/z* 547,0 [M+H], 545,0 [M-H].

5 Procedimiento 2. Preparación a través del compuesto de nitro-benceno L



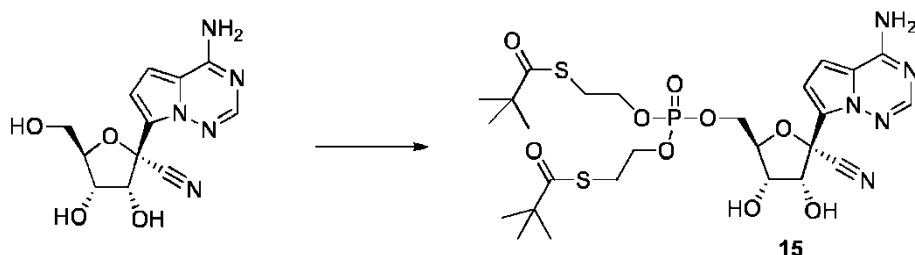
10 El compuesto **1** (50 mg, 0,17 mmol) se disolvió en NMP-THF (1:1 ml) y se enfrió con un baño de hielo. A continuación se añadió tBuMgCl (0,257 ml, 0,257 mmol) durante aproximadamente 5 minutos. La mezcla resultante se dejó calentar a TA y se agitó durante aproximadamente 30 minutos. Después, se añadió una solución de compuesto **L** (preparado según el documento US20120009147, 74,6 mg, 0,189 mmol) en THF (2 ml). Después de aproximadamente 30 minutos, la mezcla de reacción se purificó por HPLC (acetonitrilo 10 a 80 % en agua) para dar el compuesto **29** como un sólido amarillo. El sólido se purificó adicionalmente con cromatografía sobre gel de sílice (MeOH de 0 a 20 % de DCM) para proporcionar el compuesto **29**. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,76 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 7,25 - 7,14 (m, 2H), 7,11 - 6,99 (m, 3H), 6,87 - 6,72 (m, 2H), 4,70 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,39 - 4,24 (m, 2H), 4,20 (dddd, *J* = 9,7, 7,9, 5,1, 2,8 Hz, 1H), 4,10 (dt, *J* = 12,8, 5,5 Hz, 1H), 4,06 - 3,91 (m, 2H), 3,72 (ddq, *J* = 14,3, 9,3, 7,1 Hz, 1H), 1,17 (dd, *J* = 7,1, 1,0 Hz, 1H), 1,14 - 1,06 (m, 5H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 3,73, 3,68. MS *m/z* = 547 (M+1)⁺.

20 Ejemplo 15. 2,2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S,2'S)-dietilo (Compuesto 12)



25 El nucleósido **1** (14,6 mg, 0,05 mmol) se disolvió en fosfato de trimetilo anhidro (0,5 ml) y se agitó en N₂ (g) a TA. Se añadió POCl₃ (9,2 μl, 0,1 mmol) y la mezcla se agitó durante aproximadamente 60 minutos. Se añadió hidrocloreto de éster de etilalanina (61 mg, 0,4 mmol) y después Et₃N (70 μl, 0,5 mmol). La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 15 minutos y después se añadió Et₃N adicional (70 μl, 0,5 mmol) para dar un pH de solución de 9-10. La mezcla se agitó durante aproximadamente 2 horas y luego se diluyó con EtOAc, se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, seguida de una solución acuosa saturada de NaCl. La capa orgánica se secó sobre Na₂SC₄, anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a HPLC preparativa (columna C₁₈) para producir el producto **12**. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,13 (s, 1H), 7,41 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 7,18 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,78 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,25-4,08 (m, 7H), 3,83 (m, 2H), 1,33-1,23 (m, 12H). RMN ³¹P (121,4 MHz, CD₃OD) δ 13,8. LCMS *m/z* 570,0 [M+H], 568,0 [M-H].

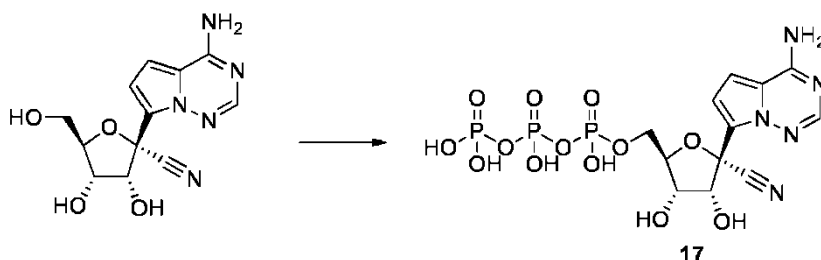
40 Ejemplo 18. Bis(2,2-dimetilpropanoato) de S,S'-2,2'-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)fosforil)bis(oxi)bis(etano-2,1-diilo) (Compuesto 15)



15

El nucleósido **1** (0,028 g, 0,096 mmol) se disolvió en fosfato de trimetilo (1 ml). La reacción se agitó en N₂(g) y después se trató con 1H-tetrazol (0,021 g, 0,29 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió fosfano (Nucleoside Nucleotides, Nucleic acids; 14; 3-5; 1995; 763 - 766. Lefebvre, Isabelle; Pompon, Alain; Perigaud, Christian; Girardet, Jean-Luc; Gosselin, Gilles; et al.) (87 mg, 0,192 mmol). La reacción se agitó durante 2 horas y después se inactivó con 30 % de peróxido de hidrógeno (0,120 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se trató con tiosulfato sódico acuoso saturado (1 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos y después se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a HPLC preparativa para aislar el producto del título **15**. RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN) δ 7,98 (s, 1H), 6,92 (d, 1H), 6,81 (d, 1H), 6,44 (sa, 2H), 4,82 (m, 2H), 4,47 (m, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,00 (m, 4H), 3,80 (sa, 1H), 3,11 (m, 4H), 1,24 (s, 9H). RMN ³¹P (121,4 MHz, CDCl₃) δ -1,85, 7,8. LCMS *m/z* 661 [M+H].

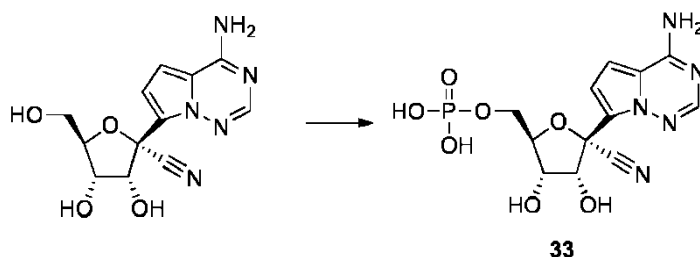
Ejemplo 20. Tetrahidrógeno trifosfato de ((2R, 3S, 4R, 5R)-2-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il)metilo (Compuesto 17)



17

El compuesto **17** se preparó a partir de compuesto **1** usando un procedimiento similar al descrito previamente (documento WO2012012776). El producto se aisló como la sal de sodio. RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 7,76 (s, 1H), 6,88 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,86 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 4,43 (m, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,94 (m, 1H). RMN ³¹P (121,4 MHz, D₂O) δ -5,4 (d, 1P), -10,8 (d, 1P), -21,1 (t, 1P). LCMS *m/z* 530 [M-H], 531,9 [M+H] Tr = 0,22 min. HPLC de intercambio iónico Tr=9,95 min.

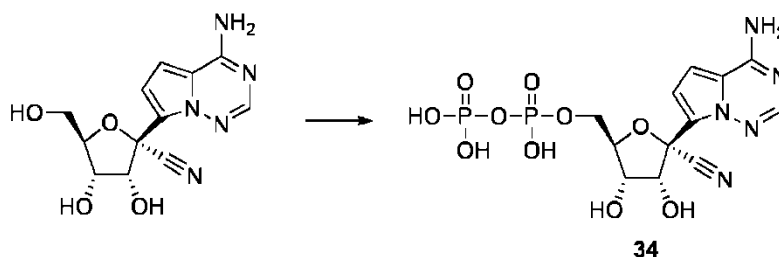
Ejemplo 20-a. Fosfato de ((2R,3S,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il)metilo (Compuesto 33)



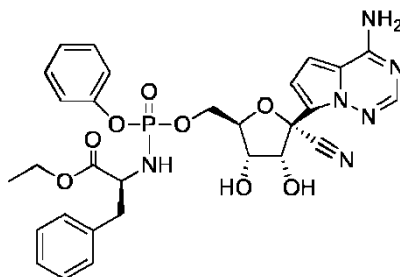
33

Una mezcla de aproximadamente 0,05 mmol del compuesto **1** y aproximadamente 0,5 ml de fosfato de trimetilo se sellaron en un recipiente durante aproximadamente una a aproximadamente 48 horas. La mezcla se enfrió a aproximadamente -10 a aproximadamente 10 °C y se añadieron aproximadamente 0,075 mmoles de oxiclورو de fósforo. Después de aproximadamente una a aproximadamente 24 horas, la reacción se inactivó con aproximadamente 0,5 ml de bicarbonato de tetraetilamonio 1 M y las fracciones deseadas se aislaron mediante cromatografía de intercambio aniónico para proporcionar el compuesto del título.

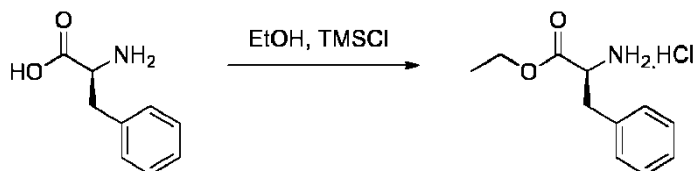
El compuesto **33** se preparó como la sal de bis-trietilamonio del compuesto **1** como se ha descrito previamente (documento WO2011150288). RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 7,82 (s, 1H), 6,91 - 6,88 (m, 1H), 6,81 - 6,78 (m, 1H), 4,87 - 4,84 (m, 1H), 4,40 - 4,30 (m, 2H), 3,95 - 3,77 (m, 2H), 3,10 - 3,00 (m, 6H), 1,20 - 1,10 (m, 9H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 2,33. MS *m/z* 371.

Ejemplo 20-b. Trihidrógenodifosfato de ((2R,3S,4R,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il)metilo (Compuesto 34)

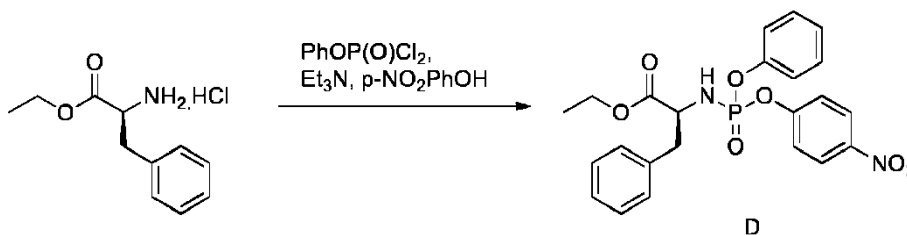
5 El compuesto **34** se preparó como la sal de tri-litio del compuesto 1 como se ha descrito previamente (documento WO2002057425). RMN de ^{31}P (162 MHz, D_2O) δ -5,34 (d), -9,75 (d). MS m/z 451.

Ejemplo 24. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-fenilpropanoato de (2S)-etilo (21)

15 La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-fenilpropanoato de (2S)-etilo se describe a continuación.

Preparación de Clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanoato de (S)-etilo.

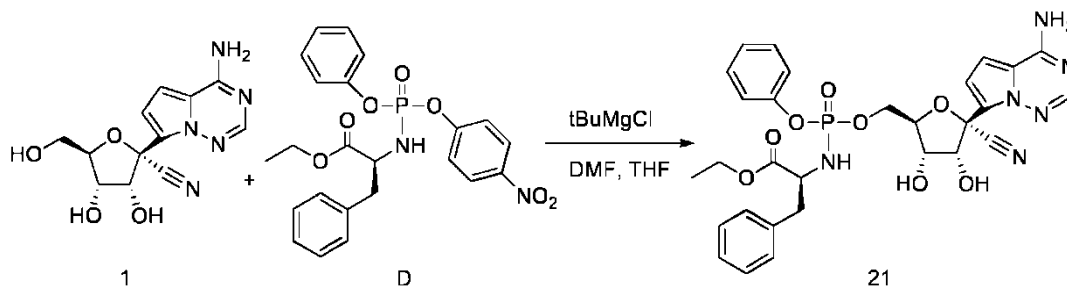
20 Se suspendió L-fenilalanina (5 g, 30 mmol) en EtOH (30 ml). Se añadió TMSCl (6,915 ml, 54 mmol) a la reacción a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se equipó con un condensador de reflujo y la reacción se colocó en un baño a 80 °C. La reacción se agitó durante la noche. Al día siguiente, la reacción se enfrió a TA, se concentró a presión reducida y el residuo resultante se suspendió en Et_2O . La suspensión espesa resultante se filtró y los sólidos aislados se lavaron adicionalmente con Et_2O . Los sólidos lavados se colocaron en alto vacío para producir clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanoato de (S)-etilo de ejemplo. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,52 (s, 3H), 7,30 (m, 5H), 4,24 (ABX, $J_{\text{AX}} = 7,8$ Hz, $J_{\text{BX}} = 6,2$ Hz, 1H), 4,11 (m, 2H), 3,17, 3,05 (ABX, $J_{\text{AB}} = -14$ Hz, $J_{\text{BX}} = 5,8$ Hz, $J_{\text{AX}} = 7,6$ Hz, 2H), 1,09 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H).

Preparación de 2-(((4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-fenilpropanoato de (2S)-etilo (Compuesto D)

35 Se disolvió clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanoato de (S)-etilo (1,01 g, 4,41 mmol) en DCM (50 ml). Esta solución se enfrió a aproximadamente 0 °C y se añadió PhOP(O)Cl_2 (0,656 ml, 4,41 mmol), seguido de la adición lenta de

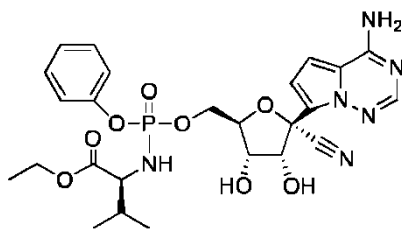
Et₃N (1,62 ml, 11,5 mmol) durante 5 minutos. Se retiró El baño frío y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante un período de 80 minutos. Se añadió *p*-NO₂PhOH (0,583 g, 4,19 mmol) seguido de más Et₃N (0,3 ml, 2,1 mmol). El progreso de la reacción se controló mediante LC/MS. Una vez completada la reacción, se diluyó con Et₂O, y los sólidos resultantes se eliminaron por filtración. El filtrado estaba concentrado y compuesto **D** se aisló mediante cromatografía en columna de gel de sílice (25 g de cartucho de carga seca, columna de 120 g; eluyente: 100 % de hexanos aumentando a 55 % de EtOAc en hexanos). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,17 (m, 2H), 7,33 (m, 2H), 7,09–7,25 (m, 10H), 4,17 (m, 1H), 4,07 (m, 2H), 3,08 (m, 1H), 2,84 (m, 1H), 1,14 (m, 3H). RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ -1,479 (s), -1,719 (s). MS *m/z* = 471,01 [M+1].

10 Preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-fenilpropanoato de (2S)-etilo (Compuesto 21)



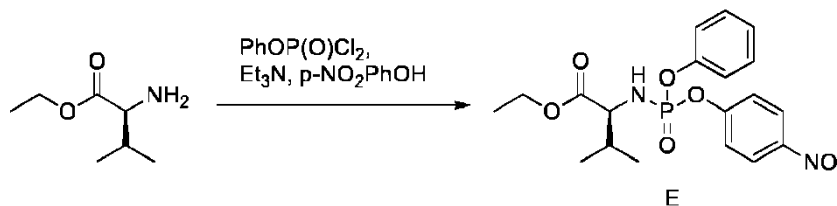
15 Se disolvió el compuesto **1** (0,030 g, 0,103 mmol) en DMF (1 ml) y después se añadió THF (0,5 ml). Se añadió *t*-BuMgCl (1M/THF, 154,5 μl, 0,154 μmol) a la reacción gota a gota con agitación energética. La suspensión espesa blanca resultante se agitó a TA durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió una solución de compuesto **D** (0,058 g, 0,124 mmoles) en THF (1 ml) gota a gota a la reacción a TA. El progreso de la reacción se controló mediante LC/MS. Cuando la reacción progresó a una conversión del 50 %, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó con ácido acético glacial (70 μl). Se concentró la reacción y se aisló el compuesto **21** del residuo mediante HPLC de fase inversa. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,91 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 7,90 (s a, 2H), 7,09–7,30 (m, 8H), 7,01 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,89 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 6,82 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 6,27 (m, 1H), 6,14 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 4,62 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,78–4,01 (m, 6H), 2,92 (m, 1H), 2,78 (m, 1H), 1,04 (m, 3H). RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,69 (s), 3,34 (s). MS *m/z* = 623,0 [M+H].

25 Ejemplo 25. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-metilbutanoato de (2S)-etilo (22)



30 La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-metilbutanoato de (2S)-etilo se describe a continuación.

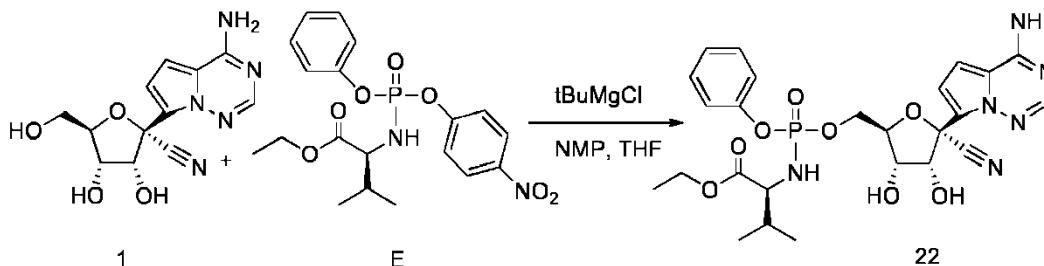
35 Preparación de 3-metil-2-(((4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)butanoato de (2S)-etilo (Compuesto E)



40 Se disolvió 2-amino-3-metilbutanoato de (S)-etilo (0,351 g, 1,932 mmol) en DCM (17 ml). Esta solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió PhOP(O)Cl₂ (0,287 ml, 1,932 mmol), seguido de la lenta adición de Et₃N (1,62 ml, 11,4 mmol) durante aproximadamente 5 minutos. Se retiró el baño frío y la reacción se dejó calentar a TA y se agitó durante un período de 1 hora. Se añadió *p*-NO₂PhOH (0,255 g, 1,836 mmol) y se controló el progreso de la reacción mediante LC/MS. Una vez completada la reacción, la mezcla se diluyó con Et₂O, y los sólidos resultantes se

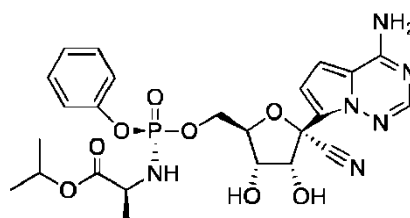
eliminaron por filtración. El filtrado estaba concentrado y compuesto **E** se aisló mediante cromatografía en columna de gel de sílice (12 g de cartucho de carga seca, columna de 80 g; eluyente: 100 % de hexanos aumentando a 55 % de EtOAc en hexanos). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,30 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,48 (t, $J = 9,6$ Hz, 2H), 7,40 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,20–7,27 (m, 3H), 6,60 (cuart, $J = 11,6$ Hz, 1H), 4,01 (m, 2H), 3,61 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,11 (m, 3H), 0,79 (m, 6H). RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) δ -0,342 (s), -0,578 (s). MS $m/z = 422,9$ [M+H].

Preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-metilbutanoato de (2S)-etilo (Compuesto 22)

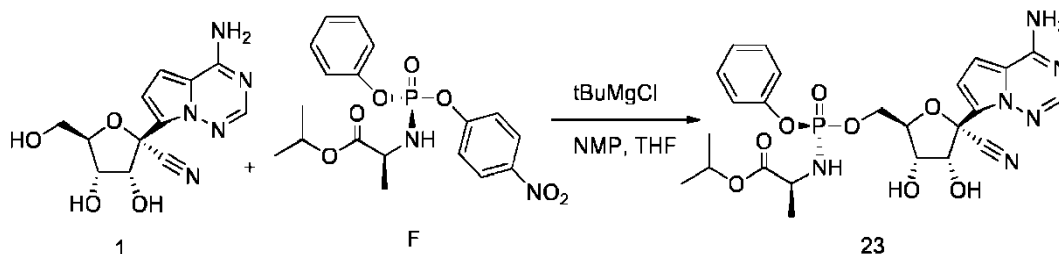


El compuesto **1** (0,040 g, 0,137 mmol) se disolvió en NMP (1,5 ml) y después se añadió THF (0,25 ml). Esta solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió *t*-BuMgCl (1M/THF, 425,7 μl , 0,426 μmol) gota a gota con agitación enérgica. Se retiró el baño de hielo y la suspensión espesa blanca resultante se agitó a TA durante aproximadamente 15 minutos. Se añadió una solución de compuesto **E** (0,081 g, 0,192 mmoles) en THF (0,5 ml) gota a gota a la reacción a TA. El progreso de la reacción se controló mediante LC/MS. Cuando la reacción progresó a una conversión del 50 %, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó con ácido acético glacial (70 μl). Se concentró la reacción y el compuesto **22** se semipurificó del residuo mediante HPLC de fase inversa. El material semipuro se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice (12 g de cartucho de carga seca, columna de 40 g; eluyente: 100 % de EtOAc aumentando a 10 % de MeOH en EtOAc) para producir compuesto **22**. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,91 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,88 (s a, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,15 (m, 3H), 6,90 (t, $J = 4,2$ Hz, 1H), 6,84 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 6,26 (dd, $J = 13,4, 6,2$ Hz, 1H), 5,87 (cuart. $J = 11,2$ Hz, 1H), 5,35 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,25 (m, 2H), 3,93–4,15 (m, 4H), 3,45 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,09–1,16 (m, 3H), 0,70–0,83 (m, 6H). RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) δ 4,59 (s), 4,47 (s). MS $m/z = 575,02$ [M+H].

Ejemplo 26. 2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-isopropilo (**23**).



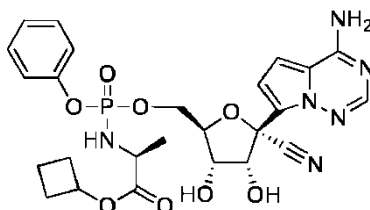
La preparación de 2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo se describe a continuación.



El compuesto **F** (60,0 mg, 206 μmol) se disolvió en NMP (0,28 ml). Se añadió THF (0,2 ml), seguido de cloruro de terc-butilmagnesio (solución 1,0 M en tetrahydrofurano, 0,309 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Después de 20 minutos, se añadió una solución de compuesto **F** (preparado según Cho, A. y col. J. Med. Chem. 2014, 57, 1812-1825., 81 mg, 206 μmol) en THF (0,2 ml) y la mezcla resultante se calentó a aproximadamente 50 $^{\circ}\text{C}$. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se dejó enfriar a TA y se purificó directamente mediante HPLC preparativa (columna Phenomenex Synergi 4u Hydro-RR 80Å 150 x 30 mm, gradiente 5–100 % de acetonitrilo/agua), para dar el compuesto **23**. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,34 – 7,26 (m, 2H), 7,21 – 7,12 (m, 3H), 6,91

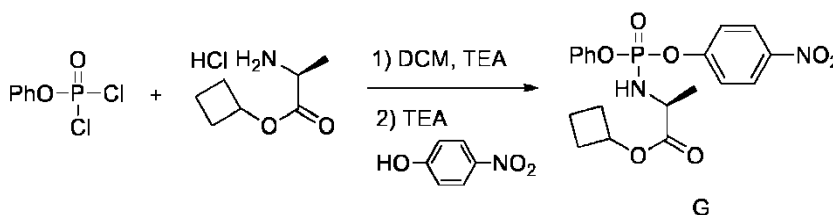
(d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 4,92 (sept, $J = 6,3$ Hz, 1H), 4,80 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,43 – 4,34 (m, 1H), 4,33 – 4,24 (m, 1H), 4,18 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,82 (dc, $J = 9,7, 7,1$ Hz, 2H), 1,27 (dd, $J = 7,1, 1,0$ Hz, 3H), 1,18 (dd, $J = 6,3, 4,8$ Hz, 6H). RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ 3,72 (s). LC/MS: $t_{\text{R}} = 1,39$ min, MS $m/z = 561,11$ [M+H]; sistema de LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; sistema MS: Thermo LCQ Fleet; Columna: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6 mm; disolventes: ACN con ácido acético al 0,1 %, agua con ácido acético al 0,1 %; Gradiente: 0 min–2,0 min 2–100 % de ACN, 2,0 min–3,05 min 100 % de ACN, 3,05 min–3,2 min 100 %–2 % de ACN, 3,2 min–3,5 min 2 % de ACN a 2 μ l/min. HPLC: $t_{\text{R}} = 2,523$ min; sistema HPLC: Agilent 1100 series.; Columna: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6 mm; disolventes: ACN con 0,1 % de TFA, agua con 0,1 % de TFA; Gradiente: 0 min–5,0 min 2–98 % de ACN, 5,0 min–6,0 min 98 % de ACN a 2 ml/min.

Ejemplo 27. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-ciclobutilo (24)



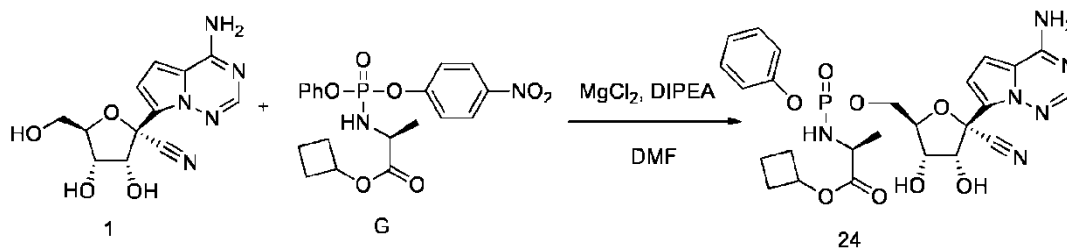
La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-ciclobutilo se describe a continuación.

Preparación de 2-(((4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-ciclobutilo (Compuesto G)



Se disolvió diclorofosfato de fenilo (1,49 ml, 10 mmol) en 10 ml de DCM anhidro y se agitó en atmósfera de nitrógeno en un baño de hielo. Se añadió clorhidrato de de éster isobutílico de L-alanina (0,9 g, 5 mmol) en una porción. A continuación, gota a gota se añadió trietilamina (765 μ L, 5,5 mmol). La reacción se agitó durante aproximadamente 1 hora. Gota a gota se añadió más trietilamina (765 μ l, 5,5 mmol) y la reacción se agitó durante aproximadamente 45 minutos. Se añadió *p*-nitrofenol (1,25 g, 9 mmol) en una porción y se agitó durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió trietilamina (765 μ l, 5,5 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 2 horas. A continuación se añadieron *p*-nitrofenol (1,25 g, 9 mmol) y trietilamina (765 μ l, 5,5 mmol) adicionales y la reacción se agitó durante otras aproximadamente 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El producto bruto resultante se diluyó con EtOAc y se lavó dos veces con una solución acuosa de ácido cítrico al 5 %, seguido de una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. A continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó con columna de gel de sílice (0-20-50 % de EtOAc en hexanos) para dar el compuesto **G**. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 8,33 – 8,23 (m, 2H), 7,52 – 7,33 (m, 4H), 7,33 – 7,17 (m, 3H), 4,96 – 4,85 (m, 1H), 4,07 – 3,96 (m, 1H), 2,27 (m, 2H), 2,07 – 1,91 (m, 2H), 1,83 – 1,70 (m, 1H), 1,70 – 1,55 (m, 1H), 1,32 (m, 3H). RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ -1,36, -1,59. MS $m/z = 420,9$ [M+H].

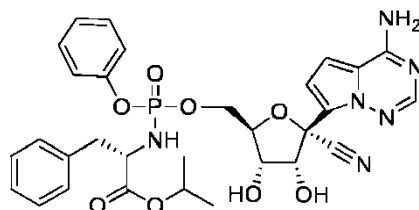
Preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-ciclobutilo (Compuesto 24)



El compuesto 1 (58 mg, 0,2 mmol) se mezcló con el compuesto G (101 mg, 0,24 mmol) en 2 ml de DMF anhidra. Se añadió cloruro de magnesio (42 mg, 0,44 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se calentó a aproximadamente 50 °C. Se añadió DIPEA (87 μ l, 0,5 mmol) y la reacción se agitó durante aproximadamente 2

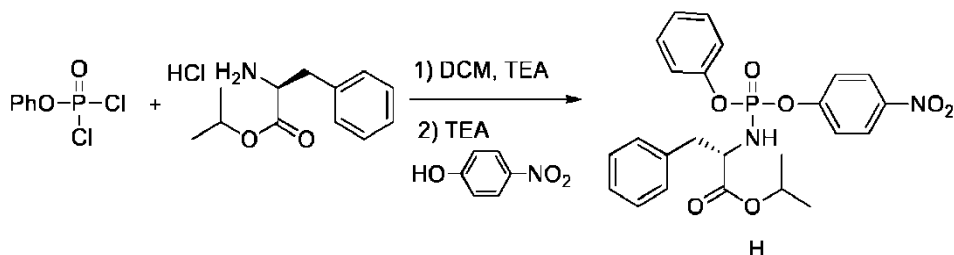
horas a aproximadamente 50 °C. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc y se lavó con solución de ácido cítrico acuoso al 5 %, seguido de solución acuosa saturada de cloruro de sodio. A continuación, la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó con columna de gel de sílice (0-2-5 % de MeOH en DCM) para dar el compuesto **24**. RMN ¹H (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ 7,85 (m, 1H), 7,34 – 7,22 (m, 2H), 7,22 – 7,08 (m, 3H), 6,94 – 6,84 (m, 2H), 4,95 – 4,85 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 4,46 – 4,34 (m, 2H), 4,34 – 4,24 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 2,27 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 1,84 – 1,68 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 1,30 – 1,16 (m, 3H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 3,70, 3,65. MS *m/z* = 573,0 [M+H].

Ejemplo 28. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)-3-fenilpropanoato de (2S)-isopropilo (25)



La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-fenilpropanoato de (2S)-isopropilo se describe a continuación.

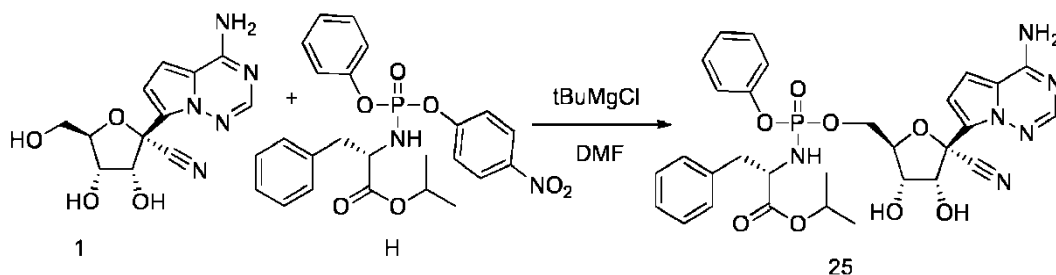
Preparación de 2-(((4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-fenilpropanoato de (2S)-isopropilo (Compuesto H)



Se disolvió diclorofosfato de fenilo (718 µl, 4,8 mmol) en 10 ml de DCM anhidro y se agitó en atmósfera de nitrógeno en un baño de hielo. Se añadió clorhidrato de de éster isopropílico de L-fenilalanina (1 g, 4,1 mmol) en una porción. Se añadieron otros 10 ml de DCM anhidro. Se añadió trietilamina (736 µl, 5,3 mmol) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 30 minutos. A continuación se añadió más trietilamina (736 µl, 5,3 mmol) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Después se añadió trietilamina (736 µl, 5,3 mmol) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 15 minutos. A continuación se añadió p-nitrofenol (600 mg, 4,32 mmol). Después, se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante aproximadamente 2 horas. Se añadieron más p-nitrofenol (50 mg) y trietilamina (736 µl, 5,3 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 1 hora.

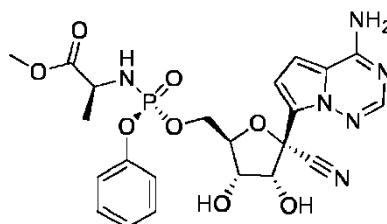
La mezcla de reacción se concentró después a presión reducida y se diluyó con EtOAc, y se lavó dos veces con una solución acuosa de ácido cítrico al 5 %, seguido de una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó con columna de gel de sílice (0-15 % de EtOAc en hexanos) para dar el compuesto **H**. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,17 (m, 2H), 7,38 – 7,13 (m, 10H), 7,13 – 7,02 (m, 2H), 4,95 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 3,02 (dd, *J* = 6,1, 1,8 Hz, 2H), 1,21 – 1,08 (m, 6H). RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) δ -2,96, -2,98. MS *m/z* = 485,0 [M+H].

Preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-3-fenilpropanoato de (2S)-isopropilo (Compuesto 25)

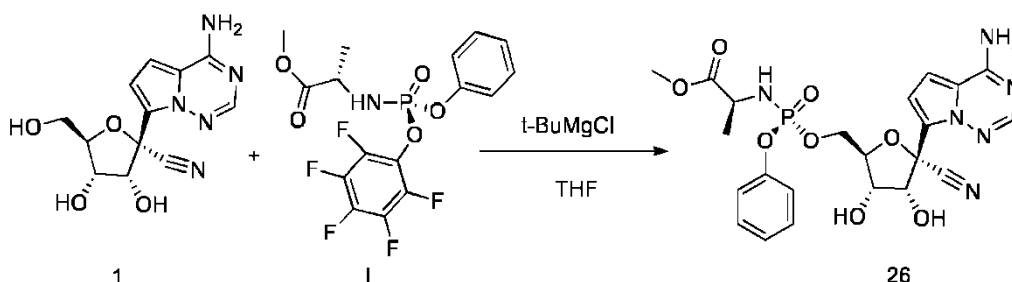


El compuesto **1** (58 mg, 0,2 mmol) y el compuesto **H** (116 mg, 0,24 mmol) se mezclaron y se añadieron 2 ml de DMF anhidro. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió tBuMgCl 1M en THF (300 μ l, 0,3 mmol) gota a gota durante 3 minutos y la mezcla de reacción se agitó luego durante aproximadamente 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con una solución acuosa al 5 % de ácido cítrico, una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y luego una solución acuosa saturada de cloruro sódico. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó con columna de gel de sílice (MeOH al 0-5 % en DCM) para dar el compuesto **25**. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,84 (m, 1H), 7,27 – 7,08 (m, 8H), 7,08 – 6,97 (m, 2H), 6,88 (m, 2H), 4,91 – 4,84 (m, 1H), 4,74 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,19 – 4,04 (m, 2H), 4,04 – 3,91 (m, 2H), 2,97 (m, 1H), 2,82 (m, 1H), 1,14 (m, 3H), 1,06 (m, 3H). RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ 3,63, 3,25. MS m/z = 637,0 [M+H].

Ejemplo 29. 2-(((R)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-metilo (26).

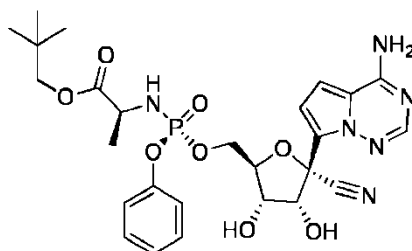


La preparación de 2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-metilo se describe a continuación.

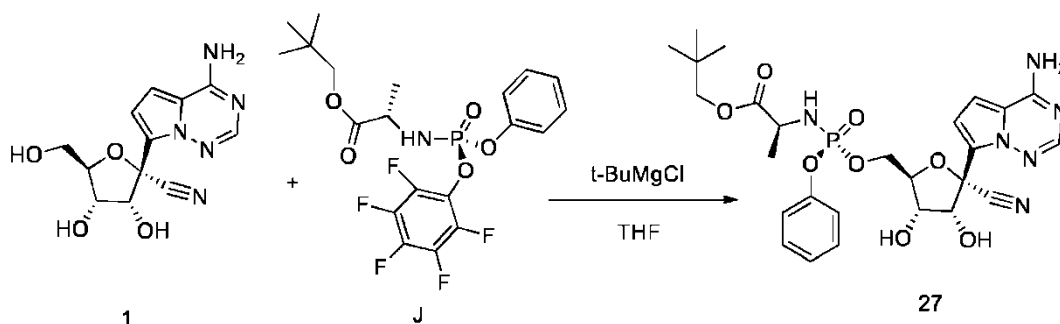


Se disolvió el compuesto **1** (100 mg, 0,34 mmol) en THF (2 ml) y se enfrió con un baño de agua helada. Luego se añadió t-BuMgCl 1M (0,52 ml, 0,77 mmol) gota a gota lentamente. La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el compuesto **I** (preparado según el documento WO 2012142085, 219 mg, 0,52 mmol) en THF (2 ml) durante 5 minutos y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. A continuación se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc, se enfrió bajo un baño de agua con hielo, se lavó con NaHCO_3 acuoso (2 ml), se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío. La mezcla resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH 0 a 20 % en DCM) y HPLC preparativa (acetonitrilo 10 a 80 % en agua) para dar el compuesto **26**. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,29 (dd, J = 8,6, 7,2 Hz, 2H), 7,21 – 7,09 (m, 3H), 6,94 – 6,81 (m, 2H), 4,79 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 4,38 (ddq, J = 10,8, 5,3, 2,7 Hz, 2H), 4,33 – 4,23 (m, 1H), 4,18 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 3,86 (cd, J = 9,9, 7,1 Hz, 1H), 3,62 (s, 3H), 1,27 (dd, J = 7,2, 1,1 Hz, 3H). MS m/z = 533 (M+1) $^+$.

Ejemplo 30. 2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-neopentilo (27).

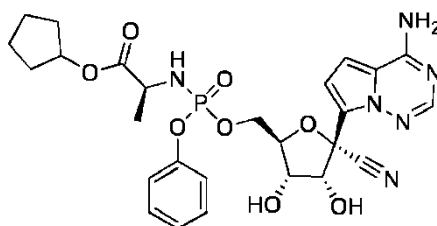


La preparación de 2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-neopentilo se describe a continuación.

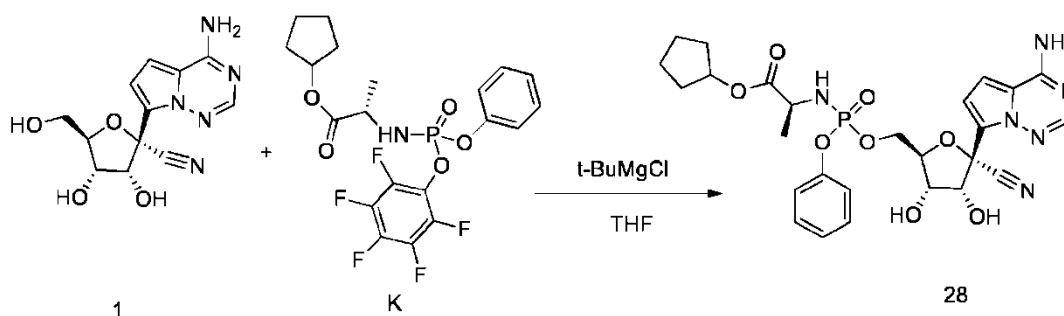


Se disolvió el compuesto **1** (100 mg, 0,34 mmol) en THF (2 ml) y se enfrió con un baño de agua helada. Luego se añadió t-BuMgCl 1M (0,52 ml, 0,77 mmol) gota a gota lentamente. La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el compuesto **J** (preparado según el documento WO2012075140, 248 mg, 0,52 mmol) durante aproximadamente 5 minutos y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc, se enfrió en un baño de agua y hielo, se trató con NaHCO₃ acuoso (2 ml), se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío. La mezcla resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH 0 a 20 % en DCM) y HPLC preparativa (acetonitrilo 10 a 80 % en agua) para dar el compuesto **27**. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,36 – 7,24 (m, 2H), 7,23 – 7,10 (m, 3H), 6,96 – 6,85 (m, 2H), 4,78 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,38 (tdd, *J* = 10,0, 4,9, 2,5 Hz, 2H), 4,32 – 4,24 (m, 1H), 4,17 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 3,91 (dq, *J* = 9,8, 7,1 Hz, 1H), 3,81 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 3,69 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 1,31 (dd, *J* = 7,2, 1,1 Hz, 3H), 0,89 (s, 9H). MS *m/z* = 589 (M+1)⁺.

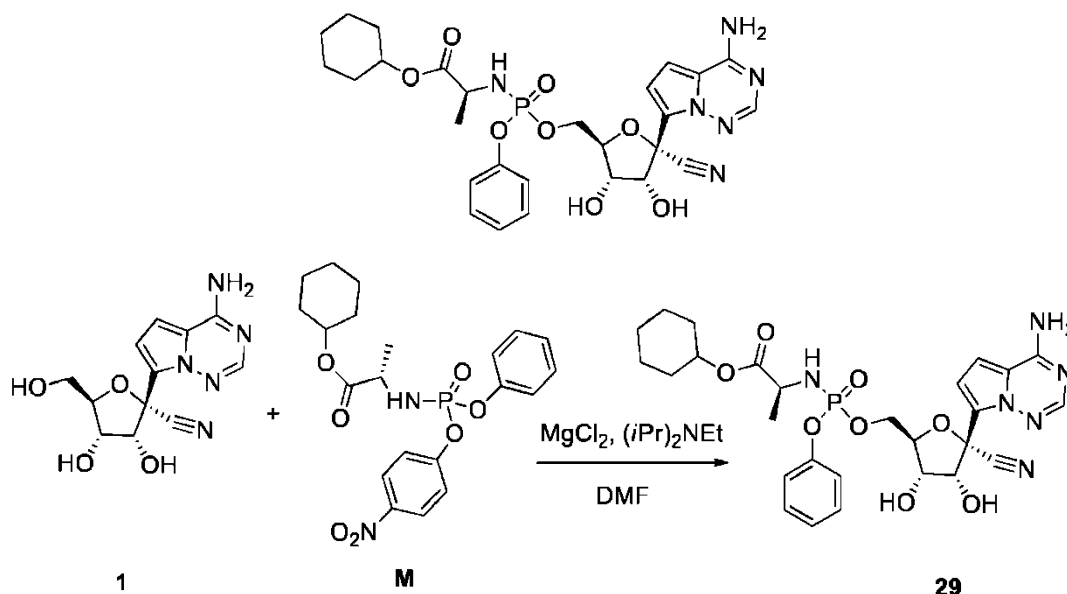
Ejemplo 31. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-ciclopentilo (28)



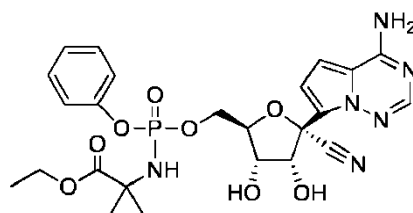
La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-ciclopentilo se describe a continuación.



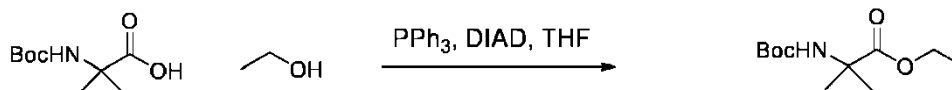
Se disolvió el compuesto **1** (100 mg, 0,34 mmol) en THF (2 ml) y se enfrió con un baño de agua helada. Luego se añadió t-BuMgCl 1M (0,52 ml, 0,77 mmol) gota a gota lentamente. La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el compuesto **K** (preparado según el documento WO2012075140, 247 mg, 0,52 mmol) en THF (2 ml) durante aproximadamente 5 minutos y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc, se enfrió en un baño de agua y hielo, se trató con NaHCO₃ acuoso (2 ml), se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío. La mezcla resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH del 0 al 20 % en DCM) y HPLC preparativa (acetonitrilo del 10 al 80 % en agua) para proporcionar el ejemplo **28**. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,85 (s, 1H), 7,33 – 7,22 (m, 2H), 7,14 (tdd, *J* = 7,6, 2,1, 1,1 Hz, 3H), 6,95 – 6,87 (m, 2H), 5,13 – 5,00 (m, 1H), 4,78 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,48 – 4,35 (m, 2H), 4,30 (ddd, *J* = 10,6, 5,7, 3,6 Hz, 1H), 4,19 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 3,78 (dq, *J* = 9,2, 7,1 Hz, 1H), 1,81 (dtd, *J* = 12,5, 5,9, 2,4 Hz, 2H), 1,74 – 1,49 (m, 6H), 1,21 (dd, *J* = 7,1, 1,2 Hz, 3H). MS *m/z* = 587 (M+1)⁺.

Ejemplo 32. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-ciclohexilo (29)

A una mezcla del compuesto **1** (50 mg, 0,343 mmol), compuesto **M** (preparado según el documento US20130143835, 93 mg, 0,209 mmol) y MgCl_2 (24.5 mg, 0,257 mmol) en DMF (1 ml) se añadió diisopropiletilamina (0,075 ml, 0,43 mmol) gota a gota durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 0°C. La mezcla resultante se agitó a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a continuación con un baño de agua con hielo, se trató con ácido cítrico 1 M (0,5 ml) y se purificó directamente por HPLC preparativa (0 a 70 % de ACN en agua) para proporcionar el compuesto **29**. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,84 (s, 1H), 7,32 – 7,23 (m, 2H), 7,18–7,10 (m, 3H), 6,93 – 6,87 (m, 2H), 4,78 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,67 (td, $J = 8,7, 4,2$ Hz, 1H), 4,48 – 4,35 (m, 2H), 4,30 (ddd, $J = 10,8, 5,7, 3,7$ Hz, 1H), 4,20 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 3,88 – 3,71 (m, 1H), 1,83 – 1,63 (m, 4H), 1,58 – 1,46 (m, 1H), 1,46 – 1,24 (m, 5H), 1,24 (s, 3H). RMN ^{31}P (162 MHz, CD_3OD) δ 3,75. MS $m/z = 601$ ($\text{M}+1$) $^+$.

Ejemplo 33. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-2-metilpropanoato de etilo (30)

La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-2-metilpropanoato de etilo se describe a continuación.

Preparación de 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metilpropanoato de etilo

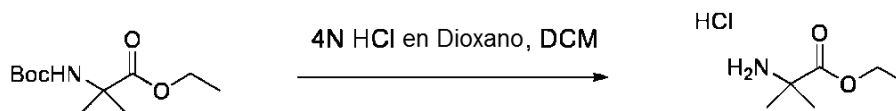
Suspender trifetilfosfina (6,18 g, 25,00 mmol) en THF (30 ml). Después, cargar DIAD (4,92 ml, 25,00 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Disolver ácido 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metilpropanoico (5,08 g, 25,00 mmol) en THF (20 ml) y añadir a la mezcla de reacción seguido de la adición de etanol (2,19 ml, 37,49 mmol). Permitir que la reacción se agite a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el producto en bruto se suspendió en Et_2O :hexanos a 1:1 (120 ml). La óxido de trifetilfosfina sólido se retiró por filtración y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto bruto se suspendió en CH_2Cl_2 mínimo y se purificó por cromatografía en gel de sílice 0-50 % de EtOAc /Hex para producir 2-

35

((terc-butoxicarbonil) amino)-2-metilpropanoato de etilo. RMN ^1H (400 MHz, cloroformo- d) δ 4,18 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,49 (s, 6H), 1,43 (s, 9H), 1,27 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

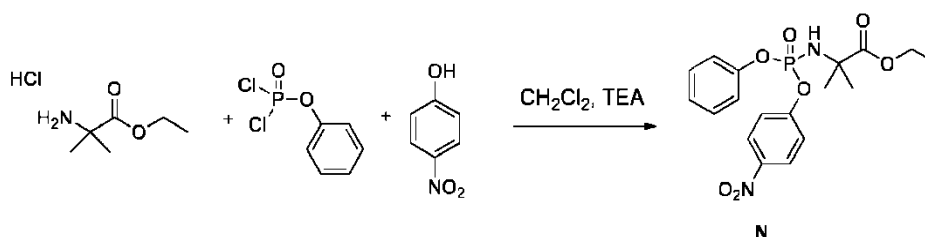
Preparación de Clorhidrato de 2-amino-2-metilpropanoato de etilo

5



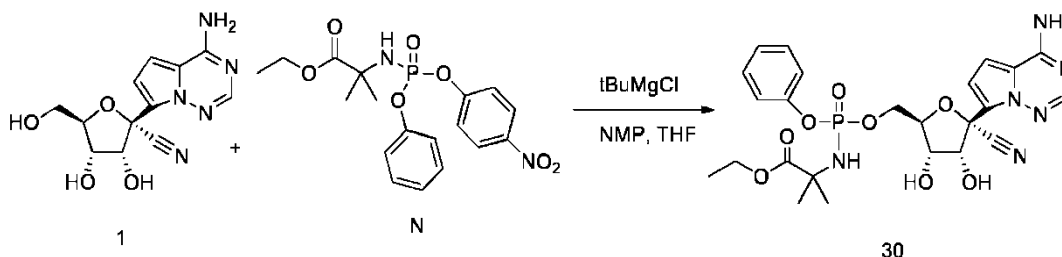
Suspender 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metilpropanoato de etilo (2,71 g, 11,72 mmol) en CH_2Cl_2 (25 ml) y agregar lentamente HCl 4N en dioxano (25 mmol) y agitar a temperatura ambiente. A 1 h, se determinó que la reacción se había completado mediante TLC. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el producto bruto se coevaporó con Et_2O dos veces, después se colocó en alto vacío para proporcionar clorhidrato de 2-amino-2-metilpropanoato de etilo. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,70 (s, 3H), 4,18 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,46 (s, 6H), 1,21 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

15 Preparación de 2-metil-2-(((4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de etilo (Compuesto N)



Suspender el diclorofosfato de fenilo (0,97 ml, 6,50 mmol) y clorhidrato de 2-amino-2-metilpropanoato de etilo (1,09 g, 6,50 mmol) en CH_2Cl_2 (50 ml). Enfriar la mezcla de reacción a aproximadamente 0°C y agregar lentamente TEA (1,75 ml, 12,45 mmol). Retirar el baño frío y permitir que la mezcla de reacción se agite a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 2 horas, se determinó que la adición del aminoácido se había completado mediante RMN ^{31}P . Cargar p-nitrofenol (0,860 g, 6,17 mmol), seguido de la adición de TEA (0,87 g, 7,69 mmol). Dejar que la reacción se agite a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 2 horas, se determinó que la reacción se había completado mediante LCMS. La reacción se diluyó con Et_2O y las sales de $\text{TEA} \cdot \text{HCl}$ se retiraron por filtración. El producto en bruto se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice (0-50 % de EtOAc/Hex) para proporcionar el compuesto **N**. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,37 – 8,21 (m, 2H), 7,55 – 7,44 (m, 2H), 7,43 – 7,33 (m, 2H), 7,30 – 7,09 (m, 3H), 6,57 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 3,99 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,39 (s, 6H), 1,08 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -2,87. LC/MS: $t_R = 1,65$ min, MS $m/z = 408,97$ $[M+1]$; sistema LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; sistema MS: Thermo LCQ Fleet; Columna: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00 mm; disolventes: acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %, agua con ácido fórmico al 0,1 %; Gradiente: 0 min-2,4 min 2-100 % de ACN, 2,4 min-2,80 min 100 % de ACN, 2,8 min-2,85 min 100 %-2 % de ACN, 2,85 min-3,0 min 2 % de ACN a 1,8 ml/min.

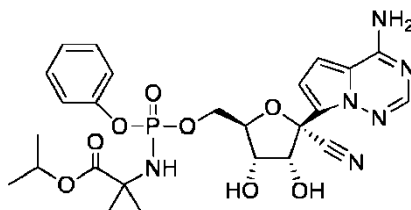
35 Preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-2-metilpropanoato de etilo (Compuesto 30)



Suspender el compuesto **1** (66 mg, 0,23 mmol) en NMP (2,0 ml). Enfriar la mezcla a aproximadamente 0°C y añadir lentamente tBuMgCl (1,0 M en THF, 0,34 ml, 0,34 mmol). Dejar que la reacción se agite a aproximadamente 0°C durante aproximadamente 30 minutos, a continuación añadir una solución de compuesto **N** (139mg, 0,34 mmol) disuelto en THF (1,0 ml). Retire el baño frío y coloque la reacción en un baño de aceite precalentado a

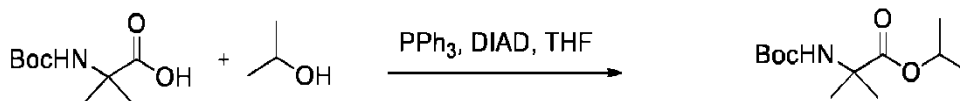
aproximadamente 50 °C. Después de aproximadamente 2 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con ácido acético y metanol. El producto en bruto se concentró y se purificó por HPLC de fase inversa sin modificador para proporcionar el compuesto **30** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,89 (m, 3H), 7,31 (c, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,22 – 7,05 (m, 3H), 6,87 (d, *J* = 4,5, 1H), 6,80 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 6,27 (d, *J* = 11,7, 1H), 5,81 (d, *J* = 9,7, 1H), 5,35 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,64 (dt, *J* = 9,0, 5,6 Hz, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 4,04–3,90 (m, 3H), 1,39 – 1,23 (m, 6H), 1,10 (t, *J* = 7,1, 3H). RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,45, 2,41. LC/MS: t_R = 1,03 min, MS *m/z* = 561,03 [M+1]; sistema LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; sistema MS: Thermo LCQ Fleet; Columna: Kinetex 2,6μ XB-C18 100A, 50 x 3,00 mm; disolventes: acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %, agua con ácido fórmico al 0,1 %; Gradiente: 0 min-2,4 min 2–100 % de ACN, 2,4 min-2,80 min 100 % de ACN, 2,8 min-2,85 min 100 %–2 % de ACN, 2,85 min-3,0 min 2 % de ACN a 1,8 ml/min.

Ejemplo 34. 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-2-metilpropanoato de isopropilo (31**)**



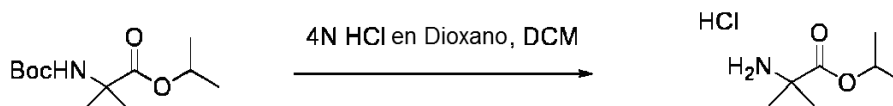
La preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-2-metilpropanoato de isopropilo se describe a continuación.

Preparación de 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metilpropanoato de isopropilo



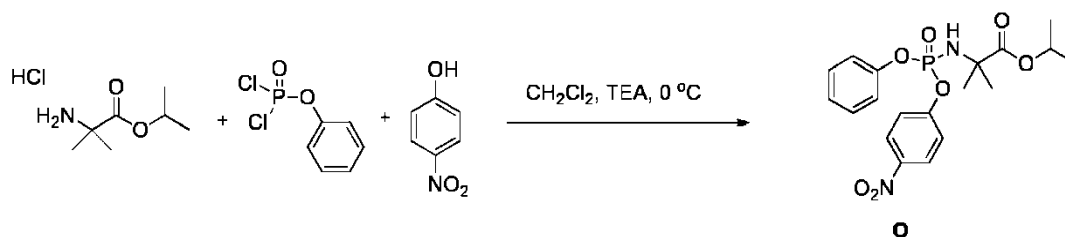
Suspender trifetilfosfina (6,17 g, 25,00 mmol) en THF (30 ml). Después, cargar DIAD (4,92 ml, 25,00 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Disolver ácido 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metilpropanoico (5,07 g, 25,00 mmol) disuelto en THF (20ml) y añadir a la mezcla de reacción seguido de la adición de isopropanol (1,91 ml, 25,00 mmol). Dejar que la reacción se agite a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el producto en bruto se suspendió en Et₂O:hexanos a 1:1 (120 ml). La óxido de trifetilfosfina sólido se retiró por filtración y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto bruto se suspendió en CH₂Cl₂ mínimo y se purificó por cromatografía en gel de sílice (0-50 % de EtOAc/Hex) para producir 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metilpropanoato de isopropilo. RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 5,03 (p, *J* = 6,2 Hz, 1H), 1,48 (s, 6H), 1,40 (d, *J* = 6,2 Hz, 9H), 1,24 (d, *J* = 6,3 Hz, 6H).

Preparación de Clorhidrato de 2-amino-2-metilpropanoato de isopropilo



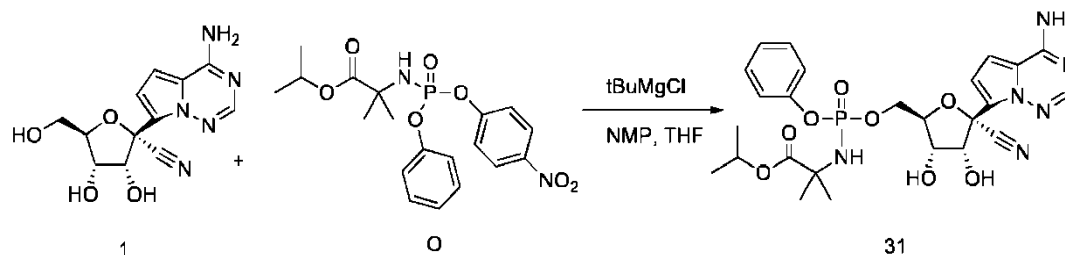
Suspender 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metilpropanoato de isopropilo (4,09 g, 16,67 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) y agregar lentamente HCl 4N en dioxano (50 mmol) y agitar a temperatura ambiente. A aproximadamente 1 hora, se determinó que la reacción se había completado mediante TLC. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el producto bruto se coevaporó con Et₂O dos veces, después se colocó en alto vacío para proporcionar clorhidrato de 2-amino-2-metilpropanoato de isopropilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,61 (s, 3H), 4,96 (p, *J* = 6,2 Hz, 1H), 1,44 (s, 6H), 1,22 (d, *J* = 6,2 Hz, 6H).

Preparación de 2-metil-2-(((4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de isopropilo (Compuesto O)



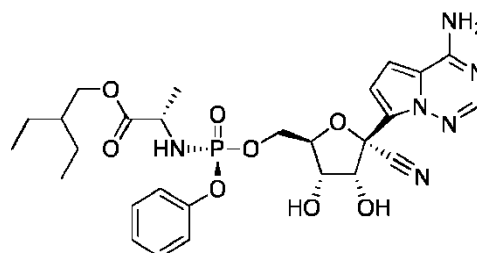
Suspender el diclorofosfato de fenilo (0,83 ml, 5,58 mmol) y clorhidrato de 2-amino-2-metilpropanoato de isopropilo (1,01 g, 5,58 mmol) en CH_2Cl_2 (50 ml). Enfríar la mezcla de reacción a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y agregar lentamente TEA (1,61 ml, 11,45 mmol). Retirar el baño frío y permitir que la mezcla de reacción se agite a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 2 horas, se determinó que la adición del aminoácido se había completado mediante RMN ^{31}P . Cargar p-nitrofenol (0,74 g, 5,30 mmol), seguido de la adición de TEA (0,81, 5,84 mmol). Dejar que la reacción se agite a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 2 horas, se determinó que la reacción se había completado mediante LCMS. La reacción se diluyó con Et_2O y las sales de TEA \cdot HCl se retiraron por filtración. El producto en bruto se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice (0-50 % de EtOAc/Hex) para proporcionar el compuesto **O**. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,42 – 8,19 (m, 2H), 7,55 – 7,43 (m, 2H), 7,39 (dd, J = 8,6, 7,2 Hz, 2H), 7,30 – 7,12 (m, 3H), 6,53 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 4,82 (hept, J = 6,3 Hz, 1H), 1,38 (s, 6H), 1,09 (d, J = 6,3, 6H). RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -2,84. LC/MS: t_{R} = 1,73 min, MS m/z = 422,92 $[\text{M}+1]$; sistema LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; sistema MS: Thermo LCQ Fleet; Columna: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00 mm; disolventes: acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %, agua con ácido fórmico al 0,1 %; Gradiente: 0 min-2,4 min 2-100 % de ACN, 2,4 min-2,80 min 100 % de ACN, 2,8 min-2,85 min 100 %-2 % de ACN, 2,85 min-3,0 min 2 % de ACN a 1,8 ml/min.

Preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)-2-metilpropanoato de isopropilo (Compuesto 31)



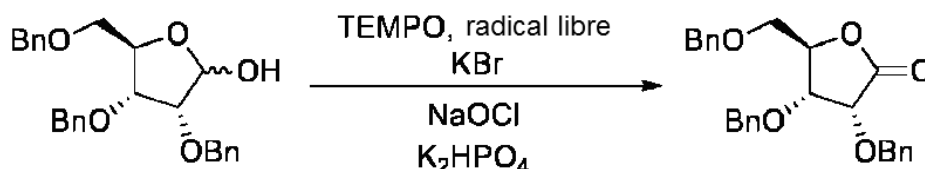
Suspender el compuesto **1** (66 mg, 0,23 mmol) en NMP (2,0 ml). Enfríar la mezcla a aproximadamente $0\text{ }^\circ\text{C}$ y añadir lentamente $t\text{BuMgCl}$ (1,0 M en THF, 0,57ml, 0,57mmol). Dejar que la reacción se agite a aproximadamente $0,34\text{ }^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 30 minutos, a continuación añadir una solución de compuesto **O** (143 mg, 0,34 mmol) disuelto en THF (1,0 ml). Retire el baño frío y coloque la reacción en un baño de aceite precalentado a aproximadamente $50\text{ }^\circ\text{C}$. Después de aproximadamente 2 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con ácido acético y metanol. El producto en bruto se concentró y se purificó por HPLC de fase inversa sin modificador para proporcionar el compuesto **31**. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,88 (m, 3H), 7,30 (td, J = 8,5, 7,0 Hz, 2H), 7,20 – 7,04 (m, 3H), 6,87 (d, J = 4,5, 1H), 6,80 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 6,27 (d, 6,1 Hz, 1H), 5,75 (t, J = 9,1 Hz, 1H), 5,34 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 4,81 (p, J = 6,3 Hz, 1H), 4,71 – 4,50 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 4,03 – 3,83 (m, 1H), 1,37 – 1,23 (m, 6H), 1,18 – 1,04 (m, 6H). RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO) δ 2,47, 2,43. LC/MS: t_{R} = 1,08 min, MS m/z = 575,06 $[\text{M}+1]$; sistema LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; sistema MS: Thermo LCQ Fleet; Columna: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00 mm; disolventes: acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %, agua con ácido fórmico al 0,1 %; Gradiente: 0 min-2,4 min 2-100 % de ACN, 2,4 min-2,80 min 100 % de ACN, 2,8 min-2,85 min 100 %-2 % de ACN, 2,85 min-3,0 min 2 % de ACN a 1,8 ml/min.

Ejemplo 35. 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (32).



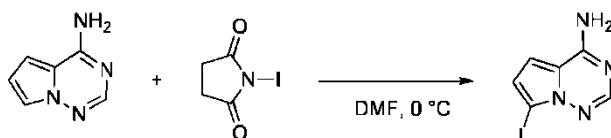
La preparación de 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo se describe a continuación.

5 Preparación de (3R, 4R, 5R)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi) metil) dihidrofuran-2 (3H)-ona



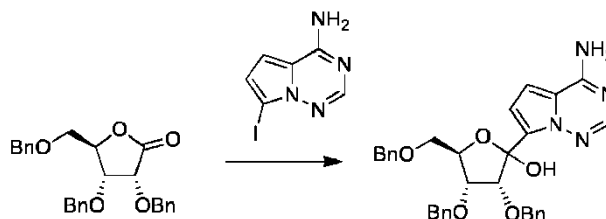
10 Se combinó (3R,4R,5R)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol (15,0 g) con MTBE (60,0 ml), KBr (424,5 mg), solución acuosa de K_2HPO_4 (2,5M, 14,3 ml) y TEMPO (56 mg). Esta mezcla se enfrió a aproximadamente 1 °C. La solución acuosa de blanqueo (7,9 % en peso) se cargó lentamente en porciones hasta el consumo completo del material de partida como se indica mediante una prueba de almidón/yoduro. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con TBME. La fase orgánica combinada se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a presión reducida para producir el producto como un sólido.

15 Preparación (4-amino-7-yodopirroló[2,1-f][1,2,4]triazina)



20 A una solución fría de 4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazina (10,03 g; 74,8 mmol) en N, N-dimetilformamida (70,27 g), N-yodosuccinimida (17,01 g; 75,6 mmol) se cargó en porciones, mientras se mantenían los contenidos a aproximadamente 0 °C. Tras la finalización de la reacción (aproximadamente 3 horas a aproximadamente 0 °C), la mezcla de reacción se transfirió a una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M (11 g de NaOH y 276 ml de agua) manteniendo los contenidos a aproximadamente 20-30 °C. La suspensión espesa resultante se agitó a aproximadamente 22 °C durante 1,5 horas y, a continuación, se filtró. Los sólidos se aclaran con agua (50 ml) y se secan a aproximadamente 50 °C al vacío para producir 4-amino-7-yodopirroló[2,1-f][1,2,4]triazina como un sólido. RMN 1H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,90 (s, 1H), 7,78 (s a, 2H), 6,98 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 4,4 Hz, 1H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d₆) δ 155,7, 149,1, 118,8, 118,1, 104,4, 71,9. MS m/z = 260,97 [M+H].

30 Preparación de (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(benciloxi)-5-((benciloxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol mediante (4-amino-7-iodopirroló[2,1-f][1,2,4]triazina)

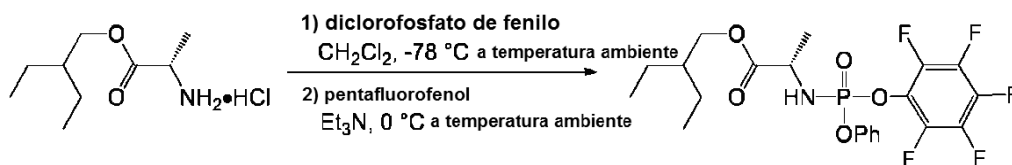


35 A un reactor bajo una atmósfera de nitrógeno se le cargó yodobase **2** (81 g) y THF (1,6 l). La solución resultante se enfrió a aproximadamente 5 °C, y se cargó TMSCl (68 g). A continuación, se cargó $PhMgCl$ (345 ml, 1,8 M en THF) lentamente mientras se mantenía una temperatura interna a aproximadamente ≤ 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 0°C durante 30 minutos y, a continuación, se enfrió a aproximadamente -15°C. Se cargó $iPrMgCl-LiCl$ (311 ml, 1,1 M en THF) lentamente mientras se mantenía una temperatura interna por debajo de aproximadamente -12 °C. Después de aproximadamente 10 minutos de agitación a aproximadamente -15 °C, la mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente -20 °C y se cargó una solución de lactona **1** (130 g) en THF (400 ml). La mezcla de reacción se agitó a continuación a aproximadamente -20 °C durante aproximadamente 1 hora y se inactivó con AcOH (57 ml). La mezcla de reacción se calentó a aproximadamente 0 °C y se ajustó a pH 7-8 con $NaHCO_3$ acuoso (5 % en peso, 1300 ml). La mezcla de reacción se diluyó a continuación con EtOAc (1300 ml) y las capas orgánica y acuosa se separaron. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (1300 ml), $NaHCO_3$ acuoso (5 % en peso, 1300 ml) y salmuera (1300 ml), y a continuación se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad. La

purificación por cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente que consiste en una mezcla de MeOH y EtOAc proporcionó el producto.

Preparación de 2-(((perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de ((2S)-2-etilbutilo (mezcla) de Sp y Rp):

5



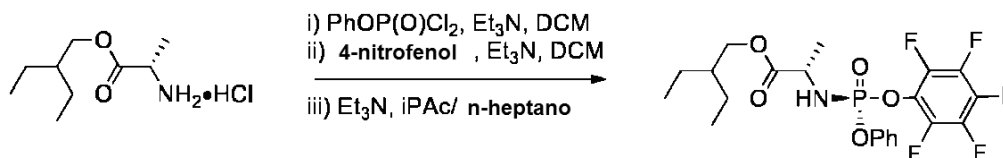
Se combinó clorhidrato de éster de 2-etilbutil-L-alanina (5,0 g, 23,84 mmol) con cloruro de metileno (40 ml), se enfrió a aproximadamente $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió diclorofosfato de fenilo (3,65 ml, 23,84 mmol). Se añadió trietilamina (6,6 ml, 47,68 mmol) durante aproximadamente 60 minutos a aproximadamente $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió pentafluorofenol (4,4 g, 23,84 mmol). Se añadió trietilamina (3,3 ml, 23,84 mmol) durante aproximadamente 60 minutos. La mezcla se agitó durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc, se lavó varias veces con una solución acuosa de carbonato de sodio y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de EtOAc y hexanos (0 a 30 %). Las fracciones que contenían el producto se concentraron a presión reducida para dar 2-(((perfluorofenoxi) (fenoxi) fosforil) amino) propanoato de (2S)-2-etilbutilo como un sólido. RMN ^1H (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,41 – 7,32 (m, 4H), 7,30 – 7,17 (m, 6H), 4,24 – 4,16 (m, 1H), 4,13 – 4,03 (m, 4H), 4,01 – 3,89 (m, 1H), 1,59 – 1,42 (m, 8H), 1,40 – 1,31 (m, 8H), 0,88 (t, J = 7,5 Hz, 12H). RMN ^{31}P (162 MHz, Cloroformo-d) δ -1,52. RMN ^{19}F (377 MHz, Cloroformo-d) δ -153,63, -153,93 (m), -160,05 (td, J = 21,9, 3,6 Hz), -162,65 (cd, J = 22,4, 20,5, 4,5 Hz). MS m/z = 496 [M+H].

10

15

20

Preparación de 2-(((perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de ((2S)-2-etilbutilo):



25

Se disolvió clorhidrato de L-alanina-2-etilbutiléster (40,10 g, 0,191 mmol) en diclorometano (533 g) y la solución se enfrió con agitación a aproximadamente $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en $\text{N}_2(\text{g})$. Se añadió diclorofosfato de fenilo (40,32 g, 0,191 mol) seguido de la adición lenta de trietilamina (41,58 g, 0,411 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a aproximadamente $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 1,5 horas. Se añadió pentafluorofenol (35,14 g, 0,191 mol), seguido de trietilamina (19,23 g, 0,190 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 2 horas. La mezcla de reacción se calentó a aproximadamente $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió HCl 0,5 M (279,19 g). La mezcla se calentó a aproximadamente $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la capa orgánica se separó y se lavó con una solución acuosa de KHCO_3 al 5 % (281 g), a continuación agua (281 g). Se concentró una alícuota de la capa orgánica (453,10 g de la solución de 604,30 g) a aproximadamente 120 ml de volumen, se añadió acetato de isopropilo (157 g) y la solución se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en acetato de isotropilo (158 g). La solución resultante se concentró a aproximadamente 120 ml de volumen y la temperatura se ajustó a aproximadamente $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añadió n-heptano (165 g) y la mezcla se enfrió a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 1 hora. Se añadió n-heptano (167 g) y la mezcla se enfrió a aproximadamente $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añadió trietilamina (2,90 g, 0,0287 mol) y la mezcla se agitó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 17 horas. La mezcla se filtró, los sólidos se aclararon con n-heptano (145 g) y los sólidos se secaron al vacío a aproximadamente $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 15 horas, para proporcionar ((S)-(pentafluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato de 2-etilbutilo.

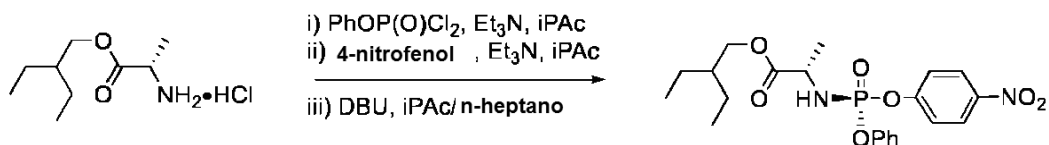
30

35

40

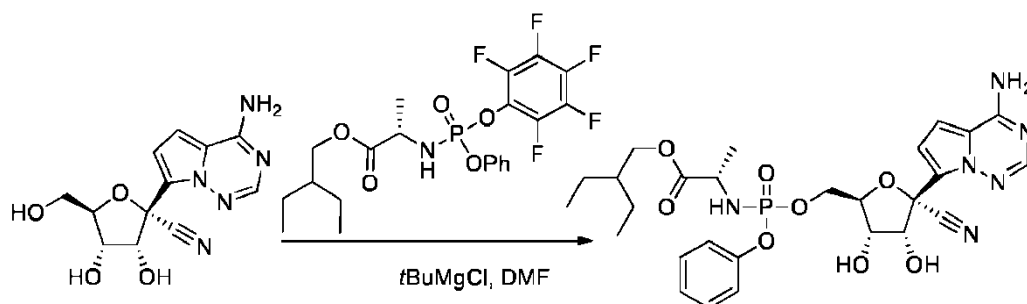
Preparación de ((S)-(4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato de 2-etilbutilo

45



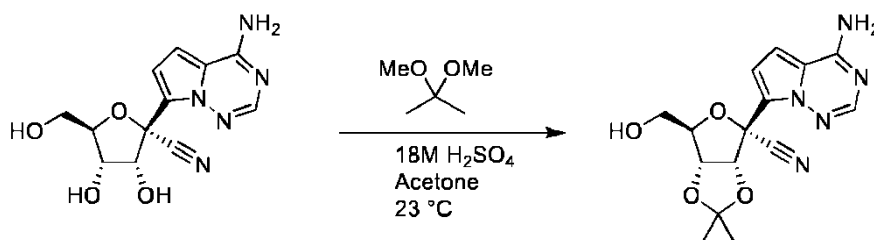
Se enfrió una suspensión espesa de clorhidrato de L-alanina-2-etil-butiléster (20,08 g, 95,8 mmol) y acetato de isopropilo (174 g) con agitación a aproximadamente -20°C . Se añadió diclorofosfato de fenilo (20,37 g, 96,5 mmol) seguido de la adición lenta de trietilamina (20,97 g, 207,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a aproximadamente -20°C durante aproximadamente 1 hora. Se añadió 4-nitrofenol (13,23 g, 95,1 mmol), seguido de la adición lenta de trietilamina (10,01 g, 98,8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 1,5 horas. La mezcla de reacción se calentó a aproximadamente 0°C y se añadió HCl 0,5 M (140 g). La capa orgánica se separó y se lavó con 5 % de Na_2CO_3 (2 x 100 g) y 10 % de NaCl (2 x 100 g). A continuación, la capa orgánica se concentró hasta aproximadamente 80 ml de volumen y se añadió acetato de isopropilo (4 g), seguido de n-heptano (110 g). Se añadieron cristales de siembra del producto (0,100 g), seguido de una segunda porción de n-heptano (110 g) y la mezcla se enfrió a aproximadamente 0°C . Se añadió 1,8-diazabicycloundec-7-eno (1,49 g, 9,79 mmol) y la mezcla se agitó a aproximadamente 0°C durante aproximadamente 21 horas. Los sólidos resultantes se filtraron y se lavaron primero con n-heptano (61 g) y después con H_2O (2 x 100 g). Los sólidos se agitaron con H_2O (200 g) durante aproximadamente 1,5 horas, se filtraron y se aclararon con H_2O (3 x 100 g), a continuación n-heptano (61 g). Los sólidos obtenidos se secaron al vacío a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 19 horas para proporcionar ((S)-(4-nitrofenoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato de 2-etilbutilo.

Preparación del compuesto del título (mezcla de Sp y Rp):



El nucleósido (29 mg, 0,1 mmol) y la fosfonamida (60 mg, 0,12 mmol) y N, N-dimetilformamida (2 ml) se combinaron a temperatura ambiente. Lentamente se añadió cloruro de terc-butilmagnesio (1 M en THF, 0,15 ml). Después de aproximadamente 1 h, la reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con una solución acuosa de ácido cítrico (5 % en peso), solución de NaHCO_3 saturado acuoso y solución saturada de salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol and CH_2Cl_2 (0 a 5 %). Las fracciones que contenían el producto se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto

Preparación de (3aR,4R,6R,6aR)-4-(4aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-carbonitrilo

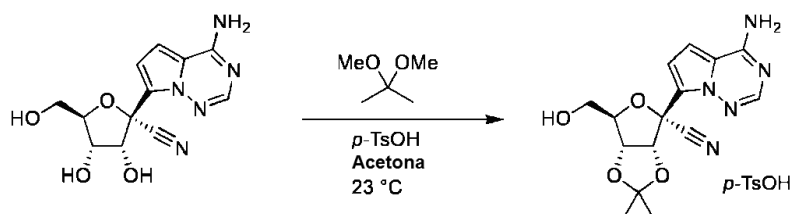


A una mezcla de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (5,8 g, 0,02 mol), 2,2-dimetoxipropano (11,59 ml, 0,09 mol) y acetona (145 ml) a temperatura ambiente se añadió ácido sulfúrico (18 M, 1,44 ml). La mezcla se calentó a aproximadamente 45°C . Después de aproximadamente 30 minutos, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron bicarbonato sódico (5,8 g) y agua 5,8 ml). Tras 15 minutos, la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se suspendió en acetato de etilo (150 ml) y agua (50 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). La fase

orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para dar (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,84 (s, 1H), 6,93 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,40 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 5,00 (dd, J = 6,7, 3,3 Hz, 1H), 4,48 – 4,40 (m, 1H), 3,81 – 3,72 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,40 (s, 3H). MS m/z = 332,23 [M+1].

5

Preparación de la sal de TsOH de (3aR,4R,6R,6aR)-4-(4aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-carbonitrilo



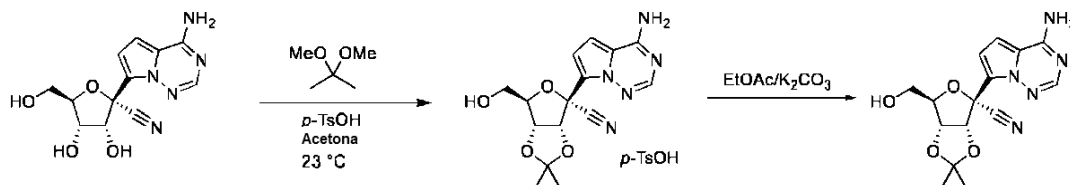
10

A una mezcla de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (5,0 g, 17,2 mol, 1,0 eq.), 2,2-dimetoxipropano (10,5 ml, 86 mol, 5,0 eq.) y acetona (25 ml) a temperatura ambiente se añadió ácido p-tolilsulfónico (3,59 g, 1,1 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 30 minutos, se añadió acetato de isopropilo (25 ml) durante aproximadamente una hora. La suspensión espesa resultante se filtró y aclaró con 2:1 de heptano:acetato de isopropilo (25 ml). El producto se secó al vacío a aproximadamente 40 °C.

15

Preparación de (3aR,4R,6R,6aR)-4-(4aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-carbonitrilo

20



25

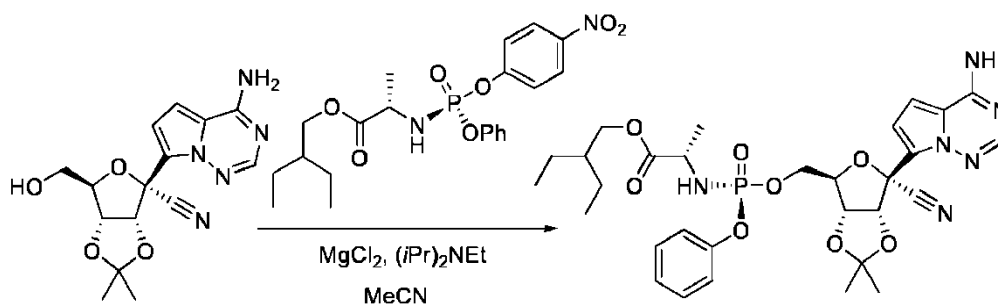
A una mezcla de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (5 g, 17,2 mol, 1,0 eq.), 2,2-dimetoxipropano (10,5 ml, 86 mol, 5,0 eq.) y acetona (25 ml) a temperatura ambiente se añadió ácido p-tolilsulfónico (3,59 g, 1,1 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió acetato de isopropilo (25 ml) durante una hora. La suspensión espesa resultante se filtró y aclaró con 2:1 de heptano:acetato de isopropilo (25 ml). El producto se secó al vacío a 40 °C. El sólido aislado se añadió a un reactor y se añadió una solución de K₂CO₃ al 5 % (50 ml) y acetato de etilo (50 ml). Se separaron las capas y la capa acuosa se lavó con acetato de etilo (25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (25 ml), a continuación se concentraron hasta aproximadamente 25 ml. El reactor se rellenó con acetato de isopropilo (25 ml) y se concentró a aproximadamente 25 ml. El reactor se rellenó de nuevo con acetato de isopropilo (25 ml) y se concentró a 25 ml. La solución resultante se sembró, produciendo una suspensión espesa. A esto se añadió heptano (25 ml) durante una hora. La suspensión espesa resultante se filtró y aclaró con 2:1 de heptano:acetato de isopropilo (25 ml). El producto se secó al vacío a 40 °C. (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,84 (s, 1H), 6,93 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,40 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 5,00 (dd, J = 6,7, 3,3 Hz, 1H), 4,48 – 4,40 (m, 1H), 3,81 – 3,72 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,40 (s, 3H). MS m/z = 332,23 [M+1].

30

35

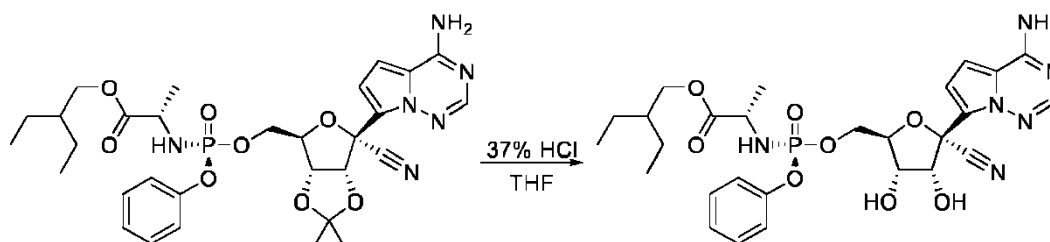
40

Preparación de 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2S)-2-etilbutilo:



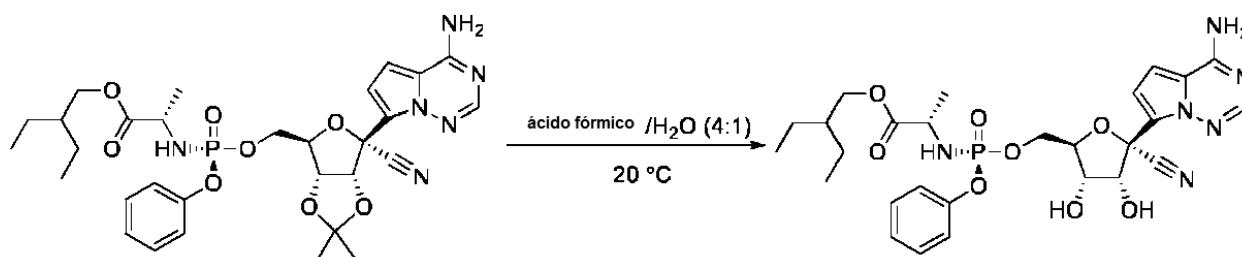
Se combinó acetonitrilo (100 ml) con 2-(((4-nitrofenoxi) (fenoxi) fosforil)-amino) propanoato de (2S)-2-etilbutilo (9,6 g, 21,31 mmol), el alcohol del sustrato (6,6 g, 0,02 mol), cloruro de magnesio (1,9 g, 19,91 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante aproximadamente 15 minutos y se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (8,67 ml, 49,78 mmol). Después de aproximadamente 4 horas, la reacción se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se enfrió a aproximadamente 0 °C y se combinó con una solución acuosa de ácido cítrico (5 % en peso, 100 ml). La fase orgánica se lavó con solución acuosa de ácido cítrico (5 % en peso, 100 ml) y solución acuosa saturada de cloruro de amonio (40 ml), solución acuosa de carbonato de potasio (10 % en peso, 2 x 100 ml) y solución acuosa saturada de salmuera (100 ml). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,31 – 7,22 (m, 2H), 7,17 – 7,09 (m, 3H), 6,93 – 6,84 (m, 2H), 5,34 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,98 (dd, *J* = 6,6, 3,5 Hz, 1H), 4,59 – 4,50 (m, 1H), 4,36 – 4,22 (m, 2H), 4,02 (dd, *J* = 10,9, 5,7 Hz, 1H), 3,91 (dd, *J* = 10,9, 5,7 Hz, 1H), 3,83 (dq, *J* = 9,7, 7,1 Hz, 1H), 1,70 (s, 3H), 1,50 – 1,41 (m, 1H), 1,39 (s, 3H), 1,36 – 1,21 (m, 7H), 0,86 (t, *J* = 7,4 Hz, 6H). MS *m/z* = 643,21 [*M*+1].

Preparación de 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (Compuesto 32).



El acetónido bruto (12,85 g) se combinó con tetrahidrofurano (50 ml) y se concentró a presión reducida. El residuo se suspendió en tetrahidrofurano (100 ml), se enfrió a aproximadamente 0 °C y se añadió lentamente HCl concentrado (20 ml). La mezcla se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. Después de consumir el acetónido de partida indicado por análisis de HPLC, se añadió agua (100 ml) seguido de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (200 ml). La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml), la capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol y acetato de etilo (de 0 a 20 %). Las fracciones que contenían el producto se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto

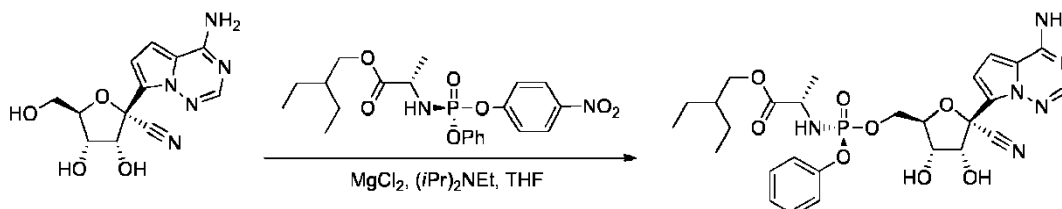
Preparación de 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (Compuesto 32).



A un vial que contiene 2-(((S)-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-6-ciano-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (30 mg, 0,05

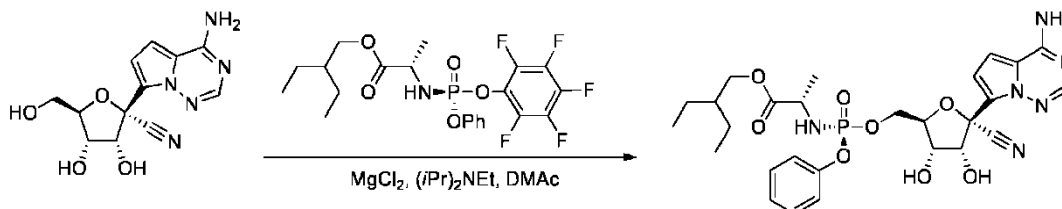
mmol) se añadió una solución de ácido fórmico acuoso al 80 % (1,5 ml). Después de 18 horas a aproximadamente 20 °C, la conversión completa se confirmó por HPLC y LC-MS. MS (m/z) = 603 (M+1)⁺.

- 5 Preparación de 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (Compuesto 32) mediante acoplamiento directo



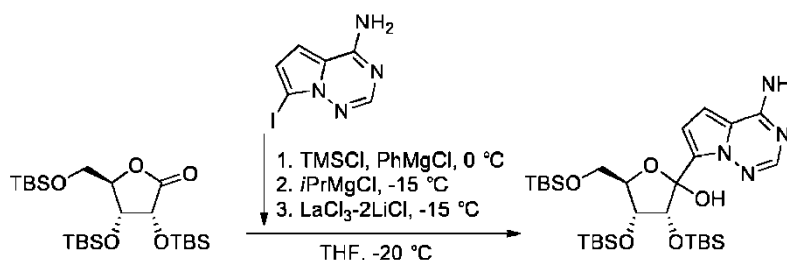
- 10 A una mezcla de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (0,5 g, 2 mmol.), 4-dimetoxipropano (0,9 g, 2 mol, 2 eq.) y acetona (0,2 g) a temperatura ambiente se añadió ácido p-tolilsulfónico (10 ml, 1,1 eq.) se cargó N,N-dimetilacetamida (10 ml). La mezcla resultante se calentó a aproximadamente 30 °C con agitación constante. A continuación se añadió N,N-diisopropiletilamina (0,7 ml, 4 mmol) lentamente la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 6 horas.
- 15 Se cargó agua (10 ml) H₂O, seguido de 2-MeTHF (10 ml), y las fases orgánicas e inorgánicas se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer con 2-MeTHF (10 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución de ácido cítrico al 10 % en peso (10 ml), seguido de de solución de K₂CO₃ al 10 % en peso (10 ml) y H₂O (10 ml). Se añadió una pequeña cantidad de salmuera para resolver las emulsiones en el lavado con agua antes de separar las capas. La capa orgánica se evaporó a sequedad para proporcionar 0,65 g de una espuma. A continuación se añadió iPrOAc (2,6 ml) y la mezcla se calentó a aproximadamente 40 °C para lograr la disolución. La solución se enfrió a aproximadamente 20 °C y la mezcla se agitó durante aproximadamente 3 días. Los sólidos se aislaron por filtración y la torta del filtro se lavó con una pequeña cantidad de iPrOAc. Los sólidos se secaron para proporcionar 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo.

25



- 30 A una mezcla de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (0,2 g, 0,7 mmol), 2-(((S)-((perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (0,3 g, 0,7 mmol), y MgCl₂ (0,1 g, 1 mmol) se cargó N,N-dimetilacetamida (4 ml). La mezcla resultante se calentó a aproximadamente 30 °C con agitación constante. A continuación, se añadió N, N-diisopropiletilamina (0,3 ml, 2 mmol) lentamente y la mezcla de reacción se agitó durante 5 horas. La conversión al producto se confirmó mediante análisis UPLC.

- 35 Preparación de (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis(terc-butildimetilsilil)oxi)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol



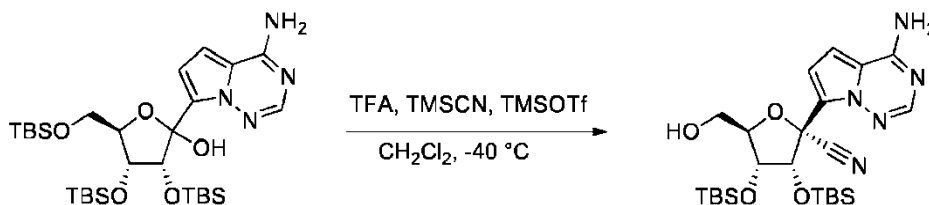
- 40 Se preparó una solución de 7-yodopirrolol[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amina (13,9 g, 53,5 mmol) en THF (280 ml). La solución se enfrió hasta aproximadamente 0°C y se añadió TMSCl (13,6 ml, 107 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 20 minutos y, a continuación, se añadió PhMgCl (2 M en THF; 53,5 ml, 56,8 mmol) mientras se mantenía una temperatura interna por debajo de aproximadamente 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 0°C durante aproximadamente 30 minutos, y a continuación se enfrió a aproximadamente -20 °C.
- 45 A continuación se añadió iPrMgCl-LiCl (1,3 M en THF, 43,1 ml, 56 mmol) mientras se mantenía una temperatura

interna por debajo de aproximadamente $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 En un matraz separado, una solución de (3R, 4R, 5R)-3,4-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)dihidrofuran-2(3H)-ona (25,0 g, 50,9 mmol, 0,83 eq.) se preparó en $\text{LaCl}_3\text{-2LiCl}$ (0,6 M en THF, 85 ml, 50,9 mmol). La solución se transfirió a continuación a la solución de Grignard mientras se mantenía una temperatura interna inferior a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción resultante se agitó a aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 4 horas.

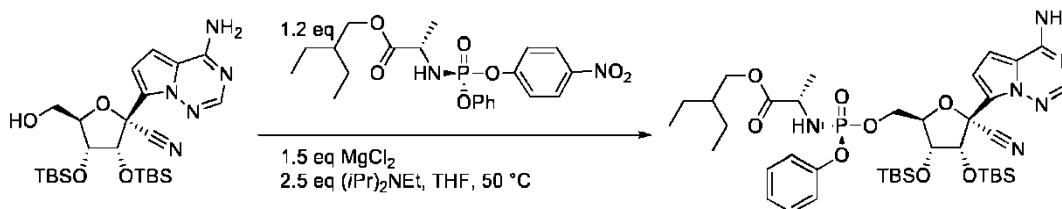
10 La reacción se inactivó con HCl 1 M (140 ml) y la mezcla se calentó a temperatura ambiente. Se añadió EtOAc (140 ml) y las fases orgánica y acuosa se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (200 ml). Las capas de EtOAc combinadas se extrajeron secuencialmente con NaHCO_3 acuoso saturado (2 x 200 ml), agua (200 ml) y salmuera (200 ml). La capa orgánica se concentró, y a continuación se purificó por cromatografía en gel de sílice (30 % de EtOAc/hexano) para proporcionar (3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrol-2-yl)-1,2,4-triazin-7-yl-3,4-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8,15 – 7,88 (m, 1H), 7,51 (d, $J = 4,8\text{ Hz}$, 0,5H), 7,02 – 6,92 (m, 0,5H), 6,65 – 6,57 (m, 1H), 5,66 – 5,24 (m, 3H), 4,49 – 3,50 (m, 4H), 0,97 – 0,78 (26H), 0,65 (s, 1,5H), 0,19 – 0,00 (m, 15,5H), $-0,22$ (s, 1H), $-0,55$ (s, 1H). MS $m/z = 626$ (M+H).

20 Preparación de (2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrol-2-yl)-1,2,4-triazin-7-yl-3,4-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-((hidroximetil)tetrahidrofuran-2-carbonitrilo)



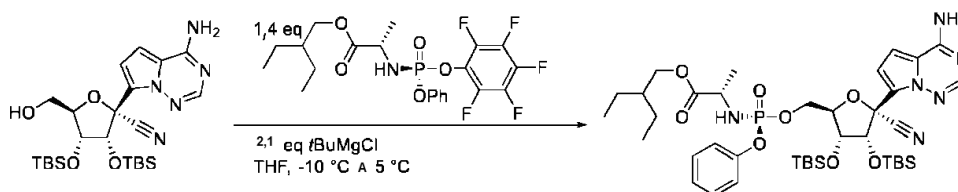
25 Una solución de (3R, 4R, 5R)-2-(4-aminopirrol-2-yl)-1,2,4-triazin-7-yl-3,4-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol (1,50 g, 2,40 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml) se enfrió a aproximadamente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añadió ácido trifluoroacético (0,555 ml, 7,20 mmol) manteniendo la temperatura por debajo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En un matraz separado, se añadió trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (2,60 ml, 14,4 mmol) a 5 ml de CH_2Cl_2 (5 ml) a aproximadamente $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de cianuro de trimetilsililo (1,92 ml, 14,4 mmol), y la solución se enfrió a aproximadamente $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. La solución enfriada se añadió a la solución de (3R, 4R, 5R)-2-(4-aminopirrol-2-yl)-1,2,4-triazin-7-yl-3,4-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidrofuran-2-ol manteniendo la temperatura por debajo de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a aproximadamente $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reacción se inactivó con trietilamina (3,34 ml, 24,0 mmol) y la mezcla se calentó a aproximadamente $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añadió agua (50 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de aproximadamente $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando se completó la adición, la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó secuencialmente con KOH (20 ml), agua (20 ml) y salmuera (20 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró, y a continuación se purificó por cromatografía en gel de sílice (30 % de EtOAc/hexano) para proporcionar el producto como una mezcla 3,8:1 de diastereómeros. La mezcla se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa (0 a 95 % de ACN en agua) para proporcionar el producto como un diastereómero único. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,14–7,92 (m, 2H), 7,89 (s, 1H), 6,95 (d, $J = 4,8\text{ Hz}$, 1H), 6,88 (d, $J = 4,4\text{ Hz}$, 1H), 5,27 (d, $J = 4,6\text{ Hz}$, 1H), 5,10 (dd, $J = 7,7, 4,6\text{ Hz}$, 1H), 4,31 (dd, $J = 4,7, 1,4\text{ Hz}$, 1H), 4,12 (ddd, $J = 5,9, 4,1, 1,4\text{ Hz}$, 1H), 3,80 – 3,69 (m, 1H), 3,56 (td, $J = 7,8, 3,9\text{ Hz}$, 1H), 0,93 (s, 9H), 0,75 (s, 9H), 0,11 (s, 3H), 0,09 (s, 3H), $-0,15$ (s, 3H), $-0,62$ (s, 3H). MS $m/z = 520$ (M+H).

45 Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-aminopirrol-2-yl)-1,2,4-triazin-7-yl)-5-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-cianotetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo



50 A una mezcla de 2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirrol-2-yl)-1,2,4-triazin-7-yl-3,4-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-((hidroximetil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (16 mg, 0,03 mmol), 2-(((S)-((perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (17 mg, 0,04 mmol), y MgCl_2 (4 mg, 0,05 mmol) se cargó THF (0,3 ml). La mezcla resultante se calentó a aproximadamente $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación constante. A

continuación, se añadió N, N-diisopropiletilamina (0,013 ml, 0,08 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 21 horas. La conversión al producto se confirmó mediante análisis UPLC y LC-MS. MS m/z = 831 (M+H).



5

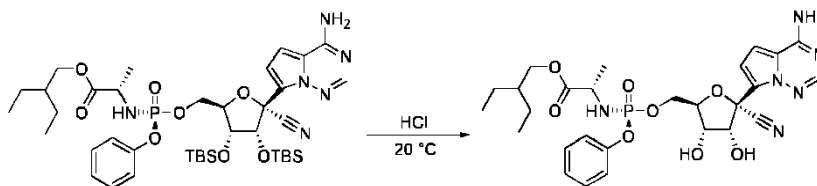
Una solución de (2R,3R,4R,5R)-2-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-carbonitrilo (16 mg, 0,03 mmol) en THF (0,3 ml) se enfrió a -10 °C. Se añadió tBuMgCl gota a gota (0,07 ml, 0,07 mmol), seguido de una solución de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo (22 mg, 0,04 mmol) en THF (0,15 ml). La mezcla de reacción se calentó a 5 °C y se agitó durante 16 horas. La reacción se inactivó con MeOH, se concentró y a continuación se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc/hexanos) para proporcionar el producto. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,97 (s, 1H), 7,38 – 7,29 (m, 2H), 7,25 – 7,21 (m, 2H), 7,21 – 7,13 (m, 1H), 7,11 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,65 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,88 (s a, 2H), 5,35 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,49 – 4,41 (m, 1H), 4,41 – 4,35 (m, 1H), 4,32 – 4,26 (m, 1H), 4,24 (dd, J = 4,5, 1,7 Hz, 1H), 4,10 – 3,99 (m, 2H), 3,96 (dd, J = 10,9, 5,7 Hz, 1H), 3,80 – 3,72 (m, 1H), 1,48 (h, J = 6,2 Hz, 1H), 1,39 – 1,28 (m, 7H), 0,96 (s, 9H), 0,85 (t, J = 7,5 Hz, 6H), 0,80 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H), -0,13 (s, 3H), -0,56 (s, 3H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 2,74 (s). MS m/z = 831 (M+H).

10

15

Preparación de 2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo

20



Una solución bruta de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)-5-cianotetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-2-etilbutilo se enfrió a aproximadamente 0 °C y se añadió lentamente HCl concentrado (0,05 ml, 0,62 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 72 horas a aproximadamente 20 °C. La conversión al producto se confirmó mediante análisis UPLC y LC-MS. MS m/z = 603 (M+H).

25

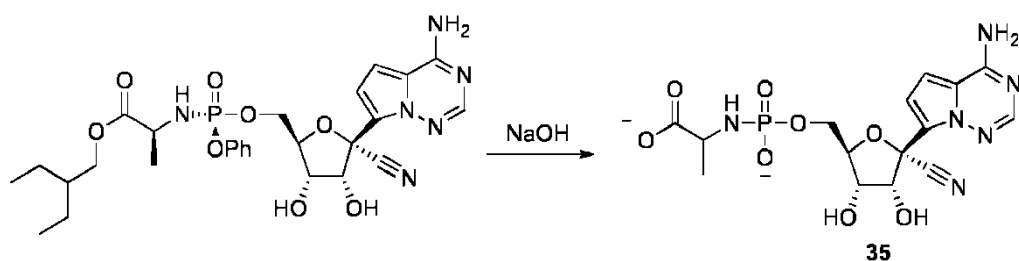


30

Una solución de 2-(((S)-(((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-3,4-bis((terc-butildimetilsilil) oxil)-5-cianotetrahidrofuran-2-il) metoxi) (fenoxi) fosforil) amino) propanoato de (S)-2-etilbutilo en un fluoruro o ácido puede desproteger a una solución 2-(((S)-(((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7 -il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il) metoxi) (fenoxi) fosforil) amino) propanoato de de (S)-2-etilbutilo. Los fluoruros representativos incluyen, pero sin limitación, TBAF, KF, hidrófluoruro de piridinio, hidrófluoruro de trietilamonio, fluoruro de hidrógeno, ácido clorhídrico, ácido toluenosulfónico o cualquier otra fuente de fluoruro adecuada. Los ácidos representativos incluyen, pero no se limitan a los encontrados en T. W.; Wuts, P. G. M. Protective Groups In Organic Synthesis, 4th Ed., John Wiley & Sons: New York, 2006.

35

40 **Ejemplo 35-a. (((2R,3S,4R,5R)-2-(4-aminopirroló[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il)metoxi)oxidofosforil)alaninato (Compuesto 35)**



Se disolvió ((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-il)-5-ciano-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato de 2-etilbutilo (130 mg, 0,216 mmol) en una mezcla de acetonitrilo (6 ml) y agua (2 ml). Se añadió una solución acuosa de hidróxido sódico (2 N, 0,5 ml) gota a gota durante 5 minutos a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó. Después de 2 h, la mezcla resultante se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC en una columna C18 eluyendo con agua para proporcionar el producto deseado como la sal de bis-sodio. RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 7,79 (s, 1H), 6,86 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 6,80 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 4,86 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,40 – 4,34 (m, 1H), 4,30 (dd, *J* = 5,3, 3,0 Hz, 1H), 3,75 (cdd, *J* = 11,6, 4,5, 3,1 Hz, 2H), 3,20 (dq, *J* = 8,6, 7,1 Hz, 1H), 0,86 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H). RMN ³¹P (162 MHz, CD₃OD) δ 7,30. LCMS *m/z* 442,95 [M+H]. HPLC (gradiente de 2–98 % de MeCN–H₂O con 0,1 % de modificador de TFA durante 8,5 min, 1,5ml/min, Columna: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 μ m 100 Å, 4,6 x 100 mm) *t_R* = 2,694 min.

B. Actividad antiviral

Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos de inhibición de las infecciones virales, que comprenden la etapa de tratar una muestra o sujeto que se sospecha que necesita dicha inhibición con una composición de la invención.

Dentro del contexto de la invención, las muestras que se sospecha que contienen un virus incluyen materiales naturales o hechos por el hombre tales como organismos vivos; cultivos tisulares o celulares; muestras biológicas tales como muestras de material biológico (sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, esputo, saliva, muestras tisulares y similares); muestras de laboratorio; muestras de alimentos, agua o aire; muestras de biproductos tales como extractos de células, particularmente células recombinantes que sintetizan una glicoproteína deseada; y similares. Normalmente, se sospechará que la muestra contiene un organismo que induce una infección viral, con frecuencia un organismo patogénico tal como un virus tumoral. Las muestras pueden estar contenidas en cualquier medio que incluya agua y mezclas de disolvente orgánico/agua. Las muestras incluyen organismos vivos tales como seres humanos y materiales hechos por el hombre tales como cultivos celulares.

Si se desea, la actividad antiviral de un compuesto de la invención tras la aplicación de la composición se puede observar mediante cualquier procedimiento que incluya procedimientos directos e indirectos de detección de dicha actividad. Se contemplan todos los procedimientos cuantitativos, cualitativos y semicuantitativos de determinación de dicha actividad. Normalmente se aplica uno de los procedimientos de selección descritos con anterioridad, no obstante también es aplicable cualquier procedimiento tal como la observación de las propiedades fisiológicas de un organismo vivo.

La actividad antiviral de un compuesto de la invención puede medirse usando protocolos de exploración estándar que son conocidos. Por ejemplo, la actividad antiviral de un compuesto se puede medir usando los siguientes protocolos generales.

Virus	Línea celular	Formato de placa	Número de células	MOI (ufp/célula)	Incubación (Días)	Lectura	Valores
EBOV (Zaire)	Hela	384	4000	0,5	2	HCS	EC50
EBOV (Zaire)	HFF-1			2		HCS	
EBOV-GFP	Huh-7	96	10000	0,1	4	GFP	
EBOV-GFP	HMVEC-TERT					GFP	
EBOV-LUC	Huh-7					LUC	
MARV-GFP	Huh-7					GFP	
NiV	Hela					CPE	

NiV-GFP	HMVEC-TERT					GFP	
NiV-LUC	HMVEC-TERT					LUC	

EBOV:	Virus Zaire de la cepa del virus de ébola
EBOV-GFP:	Virus indicador de ébola que expresa proteína verde fluorescente
EBOV-LUC:	Virus indicador del Ébola que expresa luciferasa
5 MARV-GFP:	Virus de Marburg que expresa la proteína verde fluorescente
NiV:	Virus Nipah
NiV-GFP:	Virus indicador de Nipah que expresa proteína verde fluorescente
NiV-LUC:	Virus indicador del Nipah que expresa luciferasa
HCS:	Imágenes de alto contenido (inmunotinción de proteína GP de ebolavirus)
10 GFP:	Proteína fluorescente verde
LUC:	Luciferasa
CPE	Efectos citopáticos medidas con el reactivo para algo de título celular (CTG)
Hela:	Células epiteliales HeLa (carcinoma vertical).
HFF-1:	Fibroblasto de prepucio humano
15 Huh-7:	Hepatocito
HVMEC-TERT:	Células endoteliales microvasculares humanas inmortalizadas con la proteína catalítica de telomerasa

Ejemplo 36. Actividad antiviral del virus del Ébola y ensayos de citotoxicidad

La actividad antiviral del Compuesto 1 y el Compuesto 9 se midió contra el virus del Ebola (EBOV), el virus de Marburg (MARV) (Tabla 2) y el virus Nipah (NiV) (Tabla 3) utilizando virus indicadores completamente replicantes que expresan luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP) (Uebelhoer, LS, 2014. AVR; Hoenen, T., 2013. AVR). Se midió la actividad antiviral adicional del Compuesto 1 y el Compuesto 9 contra el virus del ébola (EBOV), el virus de Marburg (MARV) (Tabla 2-a), utilizando virus indicadores completamente replicantes que expresan luciferasa o proteína fluorescente verde (GFP) (Uebelhoer, LS, 2014 AVR; Hoenen, T., 2013. AVR). Todos los estudios se realizaron en contención de bioseguridad de nivel 4 (BSL-4) en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Los ensayos antivirales del virus del ébola se realizaron en células endoteliales microvasculares humanas primarias inmortalizadas con la proteína catalítica de la telomerasa (HMVEC-TERT) y en células Huh-7 (Shao, R., 2004, BBRC). La actividad antiviral del virus Nipah se midió en células HMVEC-TERT y Hela.

Los ensayos antivirales se realizaron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas que contenían monocapas de células presembradas. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, se midió la replicación del virus en un lector de placas Envision mediante fluorescencia directa para virus indicadores de GFP o después de la posterior adición de sustrato de luciferasa para virus indicadores de luciferasa. Para los ensayos de producción de virus, se eliminaron los medios de las células infectadas y se utilizó una porción para cuantificar el ARN viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-PCR). El medio restante se diluyó en serie y se midió la cantidad de virus infeccioso utilizando los medios diluidos para infectar monocapas de células frescas para determinar la dosis infecciosa de cultivo tisular que causó 50 % de efectos citopáticos (DICT50) usando reactivo Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI). Para los ensayos del efecto citopático del virus (CPE), se midió la viabilidad de las células infectadas usando el reactivo Cell TiterGlo.

El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE₅₀ para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 37. Células EBOV-GFP HMVEC-TERT

Las células HMVEC-TERT se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas de 96 pocillos que contenían monocapas de HMVEC-TERT. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus EBOV-GFP, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que

contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, la replicación del virus se midió en un lector de placas
 5 Envision mediante fluorescencia directa para medir la expresión de GFP del virus indicador. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

10 **Ejemplo 38. Células EBOV-GFP Huh-7**

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas de 96 pocillos que contenían monocapas de Huh-7 . Las placas se transfirieron a
 15 contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus EBOV-GFP, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo
 20 tisular. Después de la incubación, la replicación del virus se midió en un lector de placas Envision mediante fluorescencia directa para medir la expresión de GFP del virus indicador. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

25

Ejemplo 39. Células EBOV-Luc Huh-7

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada
 30 dilución por triplicado sobre placas que contenían monocapas de células presembradas. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus EBOV-Luc, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo
 35 tisular. Después de la incubación, se midió la replicación del virus en un lector de placas Envision después de la posterior adición de sustrato de luciferasa. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un
 40 50 %.

40

Ejemplo 40. Células Huh-7, MARV-GFP

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada
 45 dilución por triplicado sobre placas de 96 pocillos que contenían monocapas de Huh-7 . Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus MARV-GFP, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo
 50 tisular. Después de la incubación, la replicación del virus se midió en un lector de placas Envision mediante fluorescencia directa para medir la expresión de GFP del virus indicador. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que
 55 inhibía la replicación del virus en un 50 %.

55

Ejemplo 41. Ebola Huh-7 (ARN)

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada
 60 dilución por triplicado sobre placas que contenían monocapas de células presembradas Huh-7. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus EBOV, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células
 65 y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente.

65

Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Tras la incubación, posteriormente se eliminaron los medios de las células infectadas y se utilizó una porción para cuantificar el ARN viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-PCR). El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 42. Ebola Huh-7 (Rendimiento)

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas que contenían monocapas de células presembradas Huh-7. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus EBOV, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, se eliminaron los medios de las células infectadas y se diluyeron en diluciones en serie de 10 veces. La cantidad de virus infeccioso utilizando los medios diluidos para infectar monocapas de células frescas para determinar la dosis infecciosa de cultivo tisular que causó 50 % de efectos citopáticos (DICT50) usando reactivo Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI). El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 43. Células Ebola HeLa

La actividad antiviral de los compuestos seleccionados se midió frente a la cepa Zaire de ebolavirus (EBOV) realizada en contención de bioseguridad de nivel 4 (BSL-4) en el Instituto de Investigación Médica del Ejército de EE. UU. Para Enfermedades Infecciosas (USAMRIID). Se sembraron células HeLa en placas de 384 pocillos a 5000 células/pocillo. La actividad antiviral de cada compuesto se midió por cuadruplicado. Se añadieron ocho a diez concentraciones de compuesto directamente a los cultivos celulares usando el dispensador digital HP300 en incrementos de dilución en serie de 3 veces 2 h antes de la infección. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante 2 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, las células se fijaron en solución de formalina y la replicación del virus se midió mediante la cuantificación de los niveles de la glucoproteína del ébola después de inmunotinción e imagen de alto contenido utilizando el instrumento de microscopia confocal Perkin Elmer Opera. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 44. Cultivos de macrófagos de ébola

La actividad antiviral de los compuestos seleccionados se midió frente a la cepa Zaire de ebolavirus (EBOV) realizada en contención de bioseguridad de nivel 4 (BSL-4) en el Instituto de Investigación Médica del Ejército de EE. UU. Para Enfermedades Infecciosas (USAMRIID). Los cultivos de macrófagos se aislaron a partir de PBMC humanas frescas y se diferenciaron en presencia de 5 ng/ml de GM-CSF y 50 μ M de β -mercaptoetanol. Los medios se cambiaron cada 2 días y las células que se adherían a la placa de cultivo tisular después de 7 días se eliminaron con EDTA 0,5M en 1x PBS, se concentraron por centrifugación a 200 xg durante 10 minutos y se sembraron en placas de ensayo de 384 pocillos a 40.000 células/pocillo. La actividad antiviral de cada compuesto se midió por cuadruplicado. Se añadieron ocho a diez concentraciones de compuesto directamente a los cultivos celulares usando el dispensador digital HP300 en incrementos de dilución en serie de 3 veces 2 h antes de la infección. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante 2 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, las células se fijaron en solución de formalina y la replicación del virus se midió mediante la cuantificación de los niveles de la glucoproteína del ébola después de inmunotinción e imagen de alto contenido utilizando el instrumento de microscopia confocal Perkin Elmer Opera. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para

cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 45. Células Nipah-GFP HMVEC-TERT

5 Las células HMVEC-TERT se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas de 96 pocillos que contenían monocapas de HMVEC-TERT. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus NiV-GFP , determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, la replicación del virus se midió en un lector de placas Envision mediante fluorescencia directa para medir la expresión de GFP del virus indicador. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE₅₀ para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 46. NiV-Luc HMVEC-TERT

20 Las células HMVEC-TERT se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas que contenían monocapas de células presembradas. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus Niv-Luc , determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, se midió la replicación del virus en un lector de placas Envision después de la posterior adición de sustrato de luciferasa. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE₅₀ para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 47. NiV Hela (rendimiento)

35 Las células Hela se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas que contenían monocapas de células Hela presembradas. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus Niv, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Después de la incubación, se eliminaron los medios de las células infectadas y se diluyeron en diluciones en serie de 10 veces. La cantidad de virus infeccioso utilizando los medios diluidos para infectar monocapas de células frescas para determinar la dosis infecciosa de cultivo tisular que causó 50 % de efectos citopáticos (DICT50) usando reactivo Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI). El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE₅₀ para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Ejemplo 48. Niv Hela (ARN)

55 Las células Huh-7 se sembraron en placas de 96 pocillos. Se diluyeron de ocho a diez concentraciones del compuesto en incrementos de dilución en serie de 3 veces en medios y se transfirieron 100 ul/pocillo de cada dilución por triplicado sobre placas que contenían monocapas de células Hela presembradas. Las placas se transfirieron a contención de BSL-4 y se añadió la dilución apropiada de la reserva de virus Niv, determinada previamente mediante titulación y preparada en medios de cultivo celular, a placas de ensayo que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluía tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que servían como control de la inhibición del virus al 0 % y al 100 %, respectivamente. Después de la infección, las placas de ensayo se incubaron durante de 3 a 4 días en una incubadora de cultivo tisular. Tras la incubación, posteriormente se eliminaron los medios de las células infectadas y se utilizó una porción para cuantificar el ARN viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-PCR). El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de

inhibición al 0 % y 100 % y el valor de la CE_{50} para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como la concentración efectiva del compuesto que inhibía la replicación del virus en un 50 %.

Tabla 2: ensayos antivirales del virus del Ébola y Marburg

Ensayo	CE ₅₀ (nM)							
	Virus indicador				ARN	Rendimiento	Expresión de antígeno (imágenes de alto contenido)	
Virus	EBOV-GFP		EVOV-Luc	MARV-GFP	Ébola			
Línea celular	HMVEC-TERT	Huh-7	Huh-7	Huh-7	Huh-7		Hela	Macrófago
Compuesto 1	771	1492	3126	1726	ND	ND	>20.000	>20.000
Compuesto 9	121	90	ND	ND	1	1029	290	501
(R)-Diastereómero del Compuesto 9	62	70	ND	ND	ND	ND		
(S)-Diastereómero de Compuesto 9 (Compuesto 32)	40	81	ND	ND	ND	ND		
Compuesto 10								
Compuesto 15	630	271	ND	ND	ND	ND		
Compuesto 21	905							270
Compuesto 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Compuesto 23	458						1650	243.350
Compuesto 24								
Compuesto 25								
Compuesto 26	283						970.118 0	1180
Compuesto 27	82						182	
Compuesto 28	102						975	120
Compuesto 29								
Compuesto 30								
Compuesto 31	11061						>20.000	1230

- 5 EBOV-GFP: Virus del Ébola que expresa el gen indicador de GFP
 EBOV-Luc: Virus del Ébola que expresa el gen indicador de la luciferasa
 MARV-GFP: Virus de Marburg que expresa el gen indicador de GFP
 Ébola: Cepa 2014 de ebolavirus

Tabla 2-a: ensayos antivirales del virus del Ébola y Marburg

Ensayo	CE ₅₀ (nM)							
	Virus indicador				ARN	Rendimiento	Expresión de antígeno (imágenes de alto contenido)	
Virus	EBOV-GFP		EVOV-Luc	MARV-GFP	Ébola			
Línea celular	HMVEC-TERT	Huh-7	Huh-7	Huh-7	Huh-7		Hela	Macrófago
Compuesto 1	771	1492	3126	1726	ND	ND	>20.000	>20.000
Compuesto 9	121	90	ND	ND	1	1029	290, 270	501, 70
(R)-Diastereómero del Compuesto 9	62	70	ND	ND	ND	ND	210	112
(S)-Diastereómero de Compuesto 9 (Compuesto 32)	40	81	ND	ND	ND	ND	100	87
Compuesto 10							3200	
Compuesto 15	630	271	ND	ND	ND	ND	520	501
Compuesto 21	905, 473							270
Compuesto 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11570	
Compuesto 23	458						1650, 1845	243, 350, 297
Compuesto 24							785	
Compuesto 25							6720	
Compuesto 26	283						970, 1180, 1103	1180, 1290
Compuesto 27	82						182	
Compuesto 28	102						975.682	120
Compuesto 29							275	
Compuesto 30	11061						>20000	1230
Compuesto 31							>20.000 , >10000	

- 5 EBOV-GFP: Virus del Ébola que expresa el gen indicador de GFP
EBOV-Luc: Virus del Ébola que expresa el gen indicador de la luciferasa
MARV-GFP: Virus de Marburg que expresa el gen indicador de GFP
Ébola: Cepa 2014 de ebolavirus

Tabla 3: Ensayos antivirales del virus Nipah y Hendra

	CE ₅₀ (nM)			
Ensayo	Virus indicador		CPE	Rendimiento
Virus	NiV GFP	NiV Luc	NiV	
Línea celular	HMVEC-TERT		Hela	
Compuesto 1	13420	3500	1484	1000
Compuesto 9	60	30	ND	ND

5 NiV GFP: Virus de Nipah que expresa el gen indicador de GFP
 NiV-Luc: Virus de Nipah que expresa el gen indicador de la luciferasa
 NiV: Virus Nipah

10 La invención se ha descrito con referencia a varias realizaciones y técnicas específicas y preferidas. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones sin dejar de estar dentro del alcance de la invención.

15

20

25

30

35

40

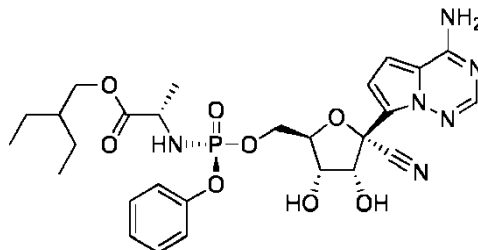
45

50

55

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos.

4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el otro agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ribavirina, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV (RespiGam®), MEDI-557, A-60444, MDT-637, BMS-433771, amiodarona, dronedarona, verapamilo, plasma de convaleciente de ébola (ECP), TKM-100201, BCX4430 ((2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol), favipiravir (también conocido como T-705 o Avigan), T-705 monofosfato, T-705 difosfato, T-705 trifosfato, FGI-106 (1-N,7-N-bis[3-(dimetilamino)propil]-3,9-dimetilquinolino[8,7-h]quinolon-1,7-diamina), JK-05, TKM-Ebola, ZMapp, rNAPc2, VRC-EBOADC076-00-VP, OS-2966, MVA-BN filo, brincidofovir, vacuna del ébola basada en el vector 5 del adenovirus de Vaxart, Ad26-ZEBOV, vacuna FiloVax, GOVX-E301, GOVX-E302, inhibidores de la entrada del virus del ébola (inhibidores de NPC1) y rVSV-EBOV, y mezclas de los mismos.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el otro agente terapéutico es ZMapp.

6. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para tratar una infección por *Filoviridae* en un ser humano.

7. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la infección producida por *Filoviridae* es una infección por el virus del ébola.

8. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la infección producida por *Filoviridae* es una infección por el virus de Marburg.