

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 167**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/173** (2006.01)

**A61K 31/7076** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2015 PCT/GB2015/053628**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16083830**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2015 E 15804216 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3224268**

54 Título: **Nuevos derivados éster 2' y/o 5' de fosforamido de aminoácidos de la 3'-desoxiadenosina como compuestos anticancerígenos**

30 Prioridad:

**28.11.2014 GB 201421211**  
**02.11.2015 GB 201519316**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GRIFFITH, HUGH;**  
**MCGUIGAN, CHRISTOPHER;**  
**FERRARI, VALENTINA;**  
**SERPI, MICHAELA y**  
**JIMENEZ ANTUNEZ, CARMEN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 742 167 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevos derivados éster 2' y/o 5' de fosforamido de aminoácidos de la 3'-desoxiadenosina como compuestos anticancerígenos

5 La presente invención se refiere a compuestos químicos, los compuestos para uso en un método de tratamiento, particularmente en un método de profilaxis o tratamiento para el cáncer, un proceso para la preparación de los compuestos y composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos.

Particularmente, aunque no exclusivamente, la presente invención se refiere a compuestos químicos para uso en el tratamiento de leucemia, linfoma y/o tumores sólidos en homo sapiens.

10 La cordicepina es 3'-desoxiadenosina (3'dA). Es un análogo de nucleósido de la adenosina que carece del grupo 3'-hidroxilo en la unidad estructural ribosa.

La cordicepina es una de las principales sustancias bioactivas producidas por *Cordyceps militaris*, un hongo parásito utilizado en la medicina tradicional china debido a su activador inmunológico, efectos antienvjecimiento y antitumorales. Se hace referencia a Tuli, H. S. et al 3 Biotech (2014) 4: 1-12.

15 La cordicepina puede producirse sintéticamente a partir de adenosina. Se hace referencia a tales procedimientos sintéticos a Robins, J. R. et al J. Org. Chem. 1995, 60, 7902-7908 and Aman, S. et al Organic Process Research & Development 2000, 4, 601-605.

Se ha estudiado la Cordicepina más ampliamente como un agente contra el cáncer.

Debido a su estructura, 3'dA y su forma de trifosfato podrían interferir potencialmente con cualquier proceso que requiera adenosina o adenosina trifosfato (ATP).

20 Después de la administración, 3'dA, sin embargo, se desamina rápidamente por la adenosina desaminasa (ADA), y se metaboliza rápidamente a un metabolito inactivo, 3'-desoxiinosina, en vivo. Se hace referencia a Tsai, Y-J et al J. Agri. Food Chem. 58 4638-43 (2010).

25 Como se describe en Glazer, R. et al Cancer Research 38, 2233-2238 (1978), se ha demostrado que la cordicepina exhibe una potencia anticancerosa cuando se usa en combinación con un inhibidor de la adenosina desaminasa, como pentostatina (2-desoxicoformicina, dCF) . También se han propuesto otros inhibidores de la ADA como cofármacos alternativos para administrar con cordicepina, pero es la combinación de 3'dA-dCF que se ha empleado en ensayos clínicos. Como se reconoce en Wehbe-Janek, H. et al Anticancer Research 27: 3143-3146 (2007), la 2-desoxicoformicina es, sin embargo, un fármaco relativamente tóxico.

30 También se sabe que la 2-fluorocordicepina (3'desoxi-2-fluoroadenosina) es citotóxica (véase, por ejemplo, Montgomery et al, J. Med. Chem., 1969, 12 (3), 498-504 y Dickinson et al, J. Med. Chem., 1967, 10 (6), 1165-1166).

La 2-clorocordicepina (3'desoxi-2-fluoroadenosina) ha sido evaluada por su actividad antiviral (Rosowsky et al. J. Med. Chem., 1989, 32, 1135-40).

El documento WO 2006/063149 divulga nucleósidos y composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos con actividad antiviral y anticancerígena.

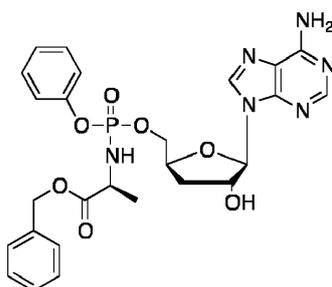
35 El documento WO 2012/040126 divulga análogos de nucleótidos de fosforoamido, métodos para sintetizar análogos de nucleótidos de fosforoamido y métodos para tratar enfermedades y/o condiciones tales como infecciones víricas, cáncer y/o enfermedades parasitarias con análogos de nucleótidos de fosforoamido.

40 La presente invención tiene como su objeto una solución al problema de mejorar la potencia de un 3'-desoxinucleósido a base de purina, como se ejemplifica con cordicepina (3'-desoxiadenosina), en un método de profilaxis o tratamiento, particularmente, aunque no exclusivamente, en quimioterapia contra el cáncer, incluida la quimioterapia para tratar la leucemia, el linfoma y/o los tumores sólidos.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una solución al problema de los 3'-desoxinucleósidos a base de purina, como se ejemplifica con cordicepina (3'-desoxiadenosina), en la administración que se desaminó mediante ADA y luego se metaboliza rápidamente a un metabolito inactivo.

45 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una solución al problema de los 3'-desoxinucleósidos a base de purina, como se ejemplifica con cordicepina (3'-desoxiadenosina), en la administración que se desaminó mediante ADA y luego se metaboliza rápidamente a un metabolito inactivo, para obviar por completo, o reducir al menos en cierta medida, la necesidad de coadministrar un inhibidor de la ADA cuando se emplea un 3'-desoxinucleósido a base de purina en un método de profilaxis o tratamiento, en particular, aunque no exclusivamente, en quimioterapia contra el cáncer, incluida la quimioterapia para tratar la leucemia, el linfoma y/o los tumores sólidos.

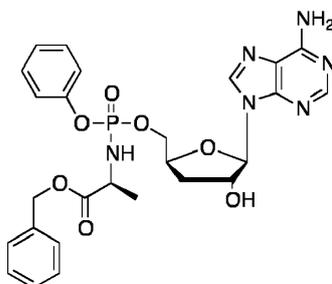
De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona 3'-desoxiadenosina-5'-O-[fenil(benciloxi-L-alaninil)] fosfato



o una sal, éster, sal de un éster o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto del mismo.

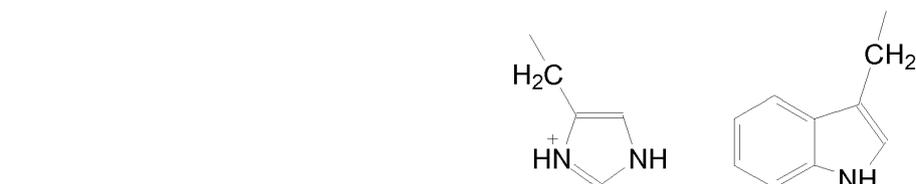
- 5 Los compuestos de la presente invención son 3'-desoxinucleósidos a base de purina en los que cada una de las posiciones del sustituyente 3' en la unidad estructural de azúcar del nucleósido está ocupada por H.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona 3'-desoxiadenosina-5'-O-[fenil(benciloxi-L-alaninil)]fosfato



- 10 Las siguientes afirmaciones se aplican a los compuestos del primer y/o segundo aspecto. Estas declaraciones son independientes e intercambiables. En otras palabras, cualquiera de las características descritas en una cualquiera de las siguientes afirmaciones puede (donde se permita químicamente) combinarse con las características descritas en una o más de las siguientes afirmaciones a continuación. En particular, cuando un compuesto se ejemplifica o ilustra en esta especificación, cualquiera de las dos o más de las declaraciones a continuación que describen una característica de ese compuesto, expresada en cualquier nivel de generalidad, pueden combinarse para representar el asunto que se contempla como formando parte de la divulgación de esta invención en esta especificación.

- 15 En la presente especificación, el término "aminoácido alfa de origen natural" significa un aminoácido, que puede tener estereoquímica L o D, seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, cisteína y metionina. En la presente especificación, una cadena lateral de un aminoácido alfa de origen natural es, por lo tanto, un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH<sub>2</sub>Ph, -CH<sub>2</sub>Ph-OH, -CH<sub>2</sub>SH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>3</sub>)(OH), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>C(O)O<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)O<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>,



- 25 El compuesto de la invención es:

3'- desoxiadenosina- 5'- O-[fenil(benciloxi-L-alaninil)]fosfato;

y sales, ésteres, sales de un éster o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En ciertas realizaciones, el compuesto de la invención no es: (2S)-isopropil-2-((((((2S, 4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-il)-4- hidroxitetrahidrofuran-2-il) metoxi) (fenoxi) fosforil) amino) propanoato.

- 30 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de la presente invención para uso como un medicamento. El compuesto puede ser para uso en la profilaxis o tratamiento del cáncer.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de la presente invención para uso en la profilaxis o el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de la presente invención para uso en el tratamiento de células madre cancerosas en el tratamiento del cáncer.

5 Con respecto a cada uno de los aspectos tercero, cuarto y quinto de la presente invención, las realizaciones de la invención comprenden un cáncer seleccionado entre tumores hematológicos y sólidos. En particular, el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en leucemia, mieloma múltiple, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, neuroblastoma, carcinoma de tiroides, cáncer de piel (incluido el melanoma), carcinoma oral de células escamosas, cáncer de vejiga urinaria, tumor de células de Leydig, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (células no pequeñas y células pequeñas), cáncer biliar, cáncer de páncreas, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer del sistema nervioso central, sarcoma de Ewing, colangiocarcinoma y cánceres ginecológicos, incluido el cáncer de ovario, cáncer uterino y cáncer de cuello uterino, incluido el epitelio carcinoma de cuello uterino. En realizaciones preferidas, el cáncer es leucemia o linfoma, por ejemplo un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia monoblástica, leucemia de células pilosas, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. En realizaciones adicionales preferidas, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda.

20 Cada uno de los aspectos tercero, cuarto y quinto de la invención puede comprender realizaciones para tratar el cáncer empleado en combinación con otra terapia contra el cáncer. Ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen radioterapia y/u otra quimioterapia. Sin estar limitado por la teoría o el mecanismo, se ha informado (por ejemplo, Robertson, JB et al Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 1978 34 (5): 417-29, Hiraoka, W. et al Radiat. Res. (1988) 114 (2): 231-9 y Hiraoka, W. et al. J. Radiat. Res. (Tokyo) (1990) 31 (2): 156-61) que la 3'-desoxiadenosina inhibe la reparación del daño en el ADN inducido por rayos X. En ciertas realizaciones preferidas de cada uno de los aspectos tercero, cuarto y quinto de la presente invención, los compuestos de la invención son para uso en, o se usan en, un método de tratamiento del cáncer que comprende la administración a un paciente que necesita tal tratamiento un compuesto de la presente invención en conjunción con radioterapia.

Con respecto a cada uno de los aspectos tercero, cuarto y quinto de la presente invención, realizaciones adicionales de la invención comprenden compuestos de la invención para uso en, o se usan en, un método de profilaxis o tratamiento del síndrome mielodisplásico.

30 Sin estar limitado por la teoría o el mecanismo: Tuli et al (supra) informaron que la cordicepina, además de tener actividad antitumoral y apoptótica, también muestra actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antimetabólicas, antifúngicas, inmunomoduladores, anti-diabético/hipoglucémicas, esteroidogénesis y anti-envejecimiento; Vodnala, S. K. et al J. Med. Chem. 2013, 56, 9861-9873 informaron que cada uno de cordicepina y 2-fluorocordicepina muestran actividad antiparasitaria; Ahn, Y. J. et al., J. Agric. Food Chem. 2000 48 (7) 2744-8 informaron que la cordicepina muestra actividad antibacteriana y de Julian-Ortiz J. V. et al J. Med. Chem. 1999 42 (17) 3308-14 informaron que la cordicepina muestra actividad antiviral; Sugar et al, Antimicrob. Agents. Chemoter 1998 42 (6) 1424-7, mostró que la cordicepina tiene actividad antifúngica. Con respecto a cada uno de los aspectos tercero, cuarto y quinto de la presente invención, las realizaciones de la invención comprenden compuestos de la invención para uso en, o se usan en, un método de profilaxis o tratamiento de un paciente con una enfermedad o condición en necesidad de al menos un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antipalúdicos, antifúngicos, inmunomoduladores, antidiabéticos/hipoglucemiantes, esteroidogénesis, anti-envejecimiento, antiparasitarios, antibacterianos y antiviral

45 Con respecto a cada uno de los aspectos tercero, cuarto y quinto de la invención, las realizaciones de la invención comprenden compuestos de la presente invención para uso en, o se usan en, un método de profilaxis o tratamiento en el que el método no emplea la administración de un co-fármaco que es un inhibidor de la adenosina desaminasa. A diferencia del compuesto original, la cordicepina, que típicamente necesita ser coadministrada con un inhibidor de la ADA, para ser efectiva, puede ser que los compuestos de la invención no requieran tal coadministración.

50 Sin embargo, un inhibidor de ADA puede emplearse como un co-fármaco, si se desea, con respecto a cada uno de los aspectos tercero, cuarto y quinto de la invención. Un inhibidor de ADA adecuado para la coadministración con un compuesto que incorpora la presente invención es hidroxiaurea o pentastatina.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 En el presente documento se divulga un método para preparar una composición farmacéutica que comprende la etapa de combinar un compuesto de la presente invención con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos que incorporan la presente invención tienen una actividad farmacéutica mejorada, particularmente una actividad anticancerígena mejorada, en comparación con el 3'-

desoxinucleósido basado en purina progenitora, especialmente cuando se emplean en el tratamiento de leucemia, linfoma y/o tumores sólidos.

5 El aumento de la actividad se ha encontrado en ausencia de la administración de un co-fármaco para inhibir la adenosina desaminasa, en comparación con el nucleósido basado en purina original administrado en ausencia de un co-fármaco para inhibir la ADA.

10 La presente invención proporciona así inesperadamente un medio para emplear un derivado de 3'-desoxiadenosina, o un derivado de un análogo de 3'-desoxiadenosina, como agente farmacéutico, particularmente como agente anticanceroso, que mitiga el problema de la desaminación mediante adenosina desaminasa, aunque evita por completo, si se desea, el uso de un co-fármaco que sea un inhibidor de la adenosina desaminasa, incluida la 2-desoxicofornicina, que es relativamente tóxica.

Sin limitarse a ninguna teoría, la eficacia, particularmente la eficacia contra el cáncer, mostrada por los compuestos de la presente invención demuestra que los compuestos 3'-desoxinucleósidos de la presente invención se fosforilan intracelularmente a trifosfato de 3'-desoxiadenosina, o al trifosfato de un análogo de 3'-desoxiadenosina.

15 Ninguna de las actividades intracelulares anteriores de los compuestos de la presente invención podría haberse predicho de antemano.

20 Los beneficios anteriores se suman a la permeabilidad de la membrana celular mejorada de los nucleósidos de fosforamidato de la presente invención, en comparación con el progenitor 3'-desoxiadenosina o el progenitor análogo de 3'-desoxiadenosina, donde la permeabilidad mejorada de la membrana celular es atribuible a la estructura de fosforamidato de los compuestos presentes. El beneficio de una permeabilidad de la membrana celular mejorada no puede, además, suponerse que está presente a priori para el fosforamidato de cualquier nucleósido. Se cree que los compuestos de la presente invención son el primer ejemplo de un fosforamidato de un 3'-desoxinucleósido para mostrar una potencia anticáncer mejorada, en relación con su 3'-desoxinucleósido progenitor. El beneficio de la permeabilidad de la membrana celular mejorada por los compuestos de la presente invención es, por lo tanto, sorprendente.

25 Las realizaciones preferidas de los compuestos de la presente invención tienen, en combinación, las características expuestas anteriormente con respecto a las realizaciones de los compuestos de la invención.

La invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el direccionamiento hacia las células madre de cáncer.

30 La divulgación proporciona el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el direccionamiento hacia las células madre de cáncer.

La divulgación proporciona un método para apuntar a las células madre de cáncer, comprendiendo el método proporcionar una población de células madre de cáncer con una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para apuntar a tales células madre de cáncer.

35 El direccionamiento de células madre cancerosas a las que se hace referencia en la presente invención se puede emplear en la prevención o el tratamiento del cáncer. En tales realizaciones, la población de células madre cancerosas puede estar en una condición cancerosa o precancerosa en un paciente que necesita tal direccionamiento, y el método puede comprender administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención.

La invención proporciona un compuesto de la invención para uso como un medicamento de células madre contra el cáncer. Este uso de un compuesto de la invención también puede emplearse en la prevención o tratamiento del cáncer.

40 La invención proporciona un compuesto de la invención para uso en la prevención o tratamiento del cáncer en un paciente seleccionado para tal tratamiento mediante un método que comprende:

analizar una muestra biológica representativa de cáncer o una condición precancerosa en el paciente para detectar la presencia de células madre cancerosas; en donde la presencia de células madre cancerosas en la muestra biológica indica que el paciente es adecuado para el tratamiento con un compuesto de la invención.

45 Los métodos expuestos anteriormente pueden comprender además una etapa de prevención o tratamiento del cáncer o condición precancerosa usando un compuesto de la invención.

En realizaciones adecuadas de los métodos de la invención, el cáncer es recidivante o cáncer refractario. Un compuesto de la invención se puede usar para el tratamiento de tal cáncer recidivante o refractario.

50 La invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de cáncer refractario en un sujeto. El sujeto puede ser un paciente humano. El sujeto puede ser un animal doméstico, por ejemplo mamífero.

La invención proporciona el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer recidivante o refractario en un sujeto. El sujeto puede ser un animal doméstico, por ejemplo mamífero.

5 La invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento del cáncer, en el que un compuesto de la invención es para uso a una dosis de entre aproximadamente 25 mg/m<sup>2</sup> y 4000 mg/m<sup>2</sup> por semana en al menos un ciclo inicial de tratamiento, y luego para usar en una dosis semanal más baja en al menos un ciclo adicional de tratamiento. El cáncer puede ser un cáncer recidivante o refractario.

10 Diversos aspectos de la invención se basan en el hallazgo de que un compuesto de la invención es capaz de reducir el número de células madre de cáncer, y puede reducirlas preferentemente en comparación con otros tipos de células. Este hallazgo es sorprendente, ya que se sabe que las células madre de cáncer son resistentes a muchos agentes quimioterapéuticos, y no se ha sugerido previamente que un compuesto de la invención, bien sea cordicina o 2-fluorocordicepina, el compuesto profármaco progenitor del cual se deriva un compuesto de la invención, sean capaces de dirigirse a las células madre de cáncer. Por lo tanto, el hallazgo de que un compuesto de la invención es capaz de apuntar a las células madre de cáncer y así reducir su número, un hallazgo que los inventores han confirmado que es aplicable en un amplio rango de cánceres, representa un avance sorprendente que permite un rango de nuevas aplicaciones terapéuticas de un compuesto de la invención.

15 Las actividades biológicas ejercidas por los compuestos de la invención, que no se han informado previamente, indican que estos compuestos pueden proporcionar un tratamiento que probablemente sea efectivo en pacientes con cánceres recidivantes o refractarios. El tratamiento de este tipo, utilizando los compuestos de la invención, puede provocar una reducción en el tamaño del tumor y/o una reducción en los biomarcadores clínicamente relevantes, cualquiera de los cuales puede estar asociado con un pronóstico más favorable. Adicionalmente, el tratamiento con un compuesto de la invención puede ayudar a mantener una reducción en el tamaño de los tumores en pacientes con cáncer recidivante o refractario. Por consiguiente, el tratamiento que utiliza un compuesto de la invención puede lograr una Tasa de Control de la Enfermedad (DCR) alta y duradera en pacientes con cánceres recidivantes o refractarios.

25 Sin desear estar limitados por ninguna hipótesis, los inventores creen que la capacidad de los compuestos de la invención para apuntar a las células madre de cáncer contribuye a la utilidad terapéutica de estos compuestos en el tratamiento del cáncer recidivante o refractario.

30 Excepto cuando el contexto requiera otra cosa, las referencias dentro de esta divulgación a un "uso" de un compuesto de la invención de acuerdo con la invención pueden tomarse como aplicables a cualquiera de los usos médicos de los compuestos de la invención descritos en el presente documento. De manera similar, las referencias a los "métodos" de la invención que usan un compuesto de la invención se deben tomar como aplicadas a cualquiera de los métodos de la invención descritos aquí.

35 La capacidad de un compuesto de la invención para atacar a las células madre de cáncer proporciona nuevas terapias dirigidas contra aquellas células cancerosas que se consideran más difíciles de tratar y que se considera que desempeñan un papel importante en la resistencia que limita la efectividad de muchas terapias contra el cáncer existentes. Esta capacidad también proporciona una forma de apuntar a las células que se cree que están asociadas con el desarrollo, la progresión, la recurrencia y la propagación de los cánceres. Por consiguiente, se reconocerá que esta actividad de células madre anticancerígenas de un compuesto de la invención produce beneficios en contextos en los que se han buscado terapias nuevas y efectivas durante mucho tiempo.

40 Breve descripción de las figuras.

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

45 Figura 1. Comparación de los valores de LD<sup>50</sup> para Cordicepina, Compuesto A, 2-F-Cordicepina y Compuestos comparativos O, P, Q y R. Todos los ensayos se realizaron usando células KG1a y los datos se presentan como media (± SD) de cinco experimentos independientes.

Figura 2. Análisis de la capacidad de direccionamiento de células madre leucémicas (LSC) de Cordicepina y Compuesto A. Los datos generados previamente (ii) se muestran para comparación. Todos los datos son la media (± SD) de tres experimentos independientes.

50 Figura 3. Análisis de la capacidad de direccionamiento de LSC de 2-F-Cordicepina y Compuestos comparativos O, P, Q y. Todos los datos son la media (± SD) de tres experimentos independientes.

Figura 4. Comparación de la capacidad de direccionamiento de LSC de 2-F-Cordicepina y cada proTide. Todos los datos son la media (± SD) de tres experimentos independientes.

Descripción detallada

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo cíclico o acíclico monovalente saturado lineal o ramificado (excepto cuando el contexto requiere otra cosa), que tiene el número de átomos de carbono indicado (o cuando no se indica, un grupo alquilo acíclico puede tener 1-20, 1-18, 1-10, 1-6 o 1-4 átomos de carbono y un grupo alquilo cíclico puede tener 3-20, 3-10 o 3-7 átomos de carbono), opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo expuesto anteriormente con respecto a los sustituyentes que pueden estar presentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>. A modo de ejemplos no limitantes, los grupos alquilo pueden incluir metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, octilo, nonilo y dodecilo.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "alquenilo" se refiere a un radical de hidrocarburo acíclico o cíclico monovalente insaturado lineal o ramificado (excepto cuando el contexto requiera otra cosa) que tenga uno o más enlaces dobles C=C y que tenga el número de átomos de carbono indicado (o donde no se indica, un grupo alquenilo acíclico puede tener 2-20, 2-10, 2-6 o 2-4 átomos de carbono y un grupo alquenilo cíclico puede tener 3-20 o 5-7 átomos de carbono), opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo expuesto anteriormente con respecto a los sustituyentes que pueden estar presentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>. A modo de ejemplos no limitantes, los grupos alquenilo pueden incluir vinilo, propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo.
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "alquinilo" se refiere a un radical de hidrocarburo acíclico o cíclico monovalente insaturado lineal o ramificado (excepto cuando el contexto requiere otra cosa) que tiene uno o más enlaces triples C≡C y que tiene el número de átomos de carbono como se indica (o donde no se indica, un grupo alquinilo acíclico puede tener 2-20, 2-10, 2-6 o 2-4 átomos de carbono y un grupo alquinilo cíclico puede tener 8-20 átomos de carbono), opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionado independientemente del grupo expuesto anteriormente con respecto a los sustituyentes que pueden estar presentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>.
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere al grupo alquil-O-, donde alquilo es como se definió anteriormente y donde la unidad estructural alquilo puede estar opcionalmente sustituida con uno, dos o tres sustituyentes como se indica anteriormente para alquilo. La unión es a través de -O-. A modo de ejemplos no limitantes, los grupos alcoxi pueden incluir metoxi, etoxi, n-propoxi, iso-propoxi, n-butoxi, tert-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi, n-hexoxi y 1,2-dimetilbutoxi.
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "ariloxi" se refiere al grupo aril-O-, donde arilo es como se define a continuación y donde la unidad estructural arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes como se estableció anteriormente con respecto al grupo Ar. La unión es a través de -O-.
- 30 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente alcoxi. La unión es a través del grupo alquilo. La unidad estructural alquilo y la unidad estructural alcoxi son como se definen aquí con respecto a las definiciones de alquilo y alcoxi, respectivamente. Las unidades estructurales alcoxi y alquilo pueden estar sustituidos cada uno con uno, dos o tres sustituyentes como se ha expuesto anteriormente con respecto a la definición de alquilo.
- 35 Como se usa en el presente documento, el término "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente arilo. La unión es a través del grupo alquilo. La unidad estructural arilo y el grupo alquilo son como se definen en este documento con respecto a las definiciones de arilo y alquilo, respectivamente. Las unidades estructurales arilo y alquilo pueden estar sustituidos cada uno con uno, dos o tres sustituyentes, siendo los sustituyentes como se definen aquí con respecto a las definiciones de aquellos sustituyentes que pueden estar presentes con respecto a arilo y alquilo, respectivamente. En una realización preferida, arilalquilo es bencilo, que es Ph-CH<sub>2</sub>-.
- 40 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxiarilo" se refiere a un grupo arilo que tiene un sustituyente alcoxi. La unión es a través del grupo arilo. La unidad estructural alcoxi y la unidad estructural arilo son como se definen en este documento con respecto a las definiciones de alcoxi y arilo, respectivamente. Las unidades estructurales alcoxi y arilo pueden estar cada uno sustituido con uno, dos o tres sustituyentes, siendo los sustituyentes como se definen aquí con respecto a las definiciones de aquellos sustituyentes que pueden estar presentes con respecto a alcoxi y arilo, respectivamente.
- 45 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilarilo" se refiere a un grupo arilo que tiene un sustituyente alquilo cíclico. La unión es a través del grupo arilo. La unidad estructural cicloalquilo y la unidad estructural arilo son como se definen en el presente documento con respecto a las definiciones de cicloalquilo y arilo, respectivamente. La unidad estructural cicloalquilo y la unidad estructural arilo pueden estar cada uno opcionalmente sustituidos con uno, dos o tres sustituyentes como se establece en el presente documento con respecto a las definiciones de alquilo y arilo, respectivamente.
- 50 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un radical carbocíclico aromático monovalente (excepto cuando el contexto requiere otra cosa) que tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis anillos y que tiene el número de átomos de carbono indicado (o donde no se indica 6 a 30, 6 a 12 o 6 a 11 átomos de carbono). Una realización preferida tiene uno, dos o tres anillos. Un grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes, tal como se expuso anteriormente con respecto a los sustituyentes opcionales que pueden estar presentes en el grupo Ar. En realizaciones preferidas, un grupo arilo comprende: un anillo monocíclico aromático que contiene 6 átomos de carbono; un sistema de anillo bicíclico aromático fusionado que contiene 7, 8, 9
- 55

o 10 átomos de carbono; o un sistema de anillo tricíclico fusionado aromático que contiene 10, 11, 12, 13 o 14 átomos de carbono. Los ejemplos no limitantes de anillo incluyen fenilo y naftilo. En una realización preferida, los grupos sustituyentes opcionales en un grupo anillo pueden seleccionarse independientemente de hidroxilo, alquilo C<sub>1-6</sub>, aciloxi C<sub>1-6</sub>, nitro, amino, carboxilo, ciano, alquilamino C<sub>1-6</sub>, alquilamino C<sub>1-6</sub>, tiol, cloro, bromo, fluoro, yodo, SO<sub>3</sub>H, SH y SR', en donde R' se selecciona independientemente de los mismos grupos que R<sub>1</sub> con respecto a la fórmula Ia.

Como se usa en el presente documento, el término "<sup>5-30</sup>heteroarilo" se refiere a un radical heterocíclico aromático insaturado monovalente (excepto cuando el contexto requiere otra cosa) que tiene de 5 a 30 miembros en forma de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis anillos fusionados y contenido en al menos un anillo, al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en N, O y S. Una realización preferida tiene uno, dos o tres anillos fusionados. Los átomos de carbono disponibles y/o los heteroátomos en el sistema de anillo pueden sustituirse en el anillo con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes, como se estableció anteriormente con respecto a los sustituyentes que pueden estar presentes en el grupo Ar. Los grupos heteroarilo pueden incluir un sistema de anillo monocíclico aromático que contiene seis miembros del anillo, de los cuales al menos un miembro del anillo es un átomo de N, O o S y que opcionalmente contiene uno, dos o tres átomos de N del anillo adicionales; un anillo monocíclico aromático que tiene seis miembros, de los cuales uno, dos o tres miembros anulares son un átomo de N; un sistema de anillo condensado bicíclico aromático que tiene nueve miembros, de los cuales al menos un miembro de anillo es un átomo de N, O o S y que opcionalmente contiene uno, dos o tres átomos de N de anillo adicionales; o un sistema de anillo fusionado bicíclico aromático que tiene diez miembros de anillo, de los cuales uno, dos o tres miembros de anillo son un átomo de N. Ejemplos incluyen, y no se limitan a, piridilo y quinolilo.

Como se usa en el presente documento, el término "<sup>5-20</sup>heterocíclico" se refiere a un radical heterocíclico saturado o parcialmente insaturado monovalente (excepto cuando el contexto requiere otra cosa) que tiene 5 a 20 miembros de anillo, con al menos un miembro de anillo seleccionado del grupo que consiste en N, O y S, y que esta en la forma de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis anillos fusionados. En una realización preferida, el radical tiene uno, dos o tres anillos. En una realización preferida, el radical tiene 5 a 10 miembros de anillo. Los radicales heterocíclico pueden incluir: un sistema de anillo monocíclico que tiene cinco miembros de anillo de los cuales al menos un miembro de anillo es un átomo de N, O o S y que opcionalmente contiene un átomo de anillo O adicional o uno, dos o tres átomos de N de anillo adicionales; un sistema de anillo monocíclico que tiene seis miembros de anillo de los cuales uno, dos o tres miembros de anillo son un átomo de N y que opcionalmente incluye un átomo de O; un sistema de anillo fundido bicíclico que tiene nueve miembros de anillo, de los cuales al menos un miembro de anillo es un átomo de N, O o S y que opcionalmente contiene uno, dos o tres átomos de N de anillo adicionales; o un sistema de anillo fusionado bicíclico que tiene diez miembros de anillo, de los cuales uno, dos o tres miembros de anillo son un átomo de N. Los ejemplos incluyen, y no se limitan a, pirrolinilo, pirrolidinilo, 1,3-dioxolanilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, piperidinilo, morfolinilo o piperazinilo.

Los átomos de carbono del anillo disponibles y/o los heteroátomos del anillo de los sistemas de anillo "heterocíclico" descritos anteriormente pueden estar sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes. Cuando los anillos están sustituidos con uno o más heteroátomos, los sustituyentes heteroátomos se seleccionan de halógeno (F, Cl, Br e I) y de oxígeno, nitrógeno y azufre, donde el oxígeno, nitrógeno o azufre forman parte de una unidad estructural sustituyente. Cuando el anillo (s) está sustituido con uno o más heteroátomos, preferiblemente hay 1, 2, 3 o 4 sustituyentes de heteroátomo seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, azufre y halógeno. Los ejemplos de grupos sustituyentes que pueden estar presentes en el sistema de anillo heterocíclico pueden seleccionarse independientemente de hidroxilo, alquilo C<sub>1-6</sub>, aciloxi C<sub>1-6</sub>, nitro, amino, carboxilo, ciano, alquilamino C<sub>1-6</sub>, alquilamino C<sub>1-6</sub>, tiol, cloro, bromo, flúor, yodo, SO<sub>3</sub>H, SH y SR', en donde R' se selecciona independientemente de los mismos grupos que R<sub>1</sub> con respecto a la fórmula Ia.

Como se usa en el presente documento, el término "acilo" se refiere a un radical monovalente lineal o ramificado, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido (excepto cuando el contexto requiere otra cosa) que incluye la unidad estructural -C(=O)-, donde la unión es a través del átomo -C de la unidad estructural -C(=O)-, y tiene el número de átomos de carbono indicado (o donde no se indique, un grupo acilo tiene 1-6, o 1-4 o 1-2 átomos de carbono, incluido el átomo C de la unidad estructural -C(=O)-, opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo expuesto anteriormente con respecto a los sustituyentes que pueden estar presentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>. A modo de ejemplos no limitativos, los grupos acilo incluyen HC(=O)-, CH<sub>3</sub>C(=O)-, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>C(=O)-, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>C(=O)-, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>C(=O)- y C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>C(=O)-.

Como se usa en este documento, el término "aciloxi" se refiere a un radical monovalente lineal o ramificado, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido (excepto cuando el contexto requiera otra cosa) que incluye la unidad estructural -C(=O)-O-, donde la unión es a través del átomo -O-, y tiene el número de átomos de carbono indicado, incluido el átomo C de la unidad estructural -C(=O)-O- (o donde no esté indicado, un grupo aciloxi tiene 1-6, 1-4 o 1-2 átomos de carbono, incluido el átomo de carbono de la unidad estructural -C(=O)-O-, opcionalmente sustituido con uno, dos o tres de los sustituyentes que pueden estar presentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>. A modo de ejemplos no limitativos, los grupos aciloxi incluyen HC(=O)-O-, CH<sub>3</sub>C(=O)-O-, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>C(=O)-O-, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>C(=O)-O-, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>C(=O)-O- y C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>C(=O)-O-.

Como se usa en este documento, el término "éster C<sub>2-6</sub>" se refiere a un radical monovalente sustituido o no sustituido (excepto cuando el contexto requiera otra cosa) que comprende R<sub>18</sub>C(=O)-O-R<sub>19</sub>, donde R<sub>18</sub> se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1-4</sub> y R<sub>19</sub> se seleccionan del grupo que consiste en alquilo C<sub>1-5</sub>, sujeto al número total

máximo de átomos de C, incluido el átomo de C de la unidad estructural-C(=O)-O-, de  $R_{18}C(=O)-O-R_{19}$  siendo seis. La unión es a través de R18 o R19, con un H del grupo respectivo ausente, de modo que el grupo alquilo a través del cual se produce la unión es divalente o, cuando R18 es H, a través del C de la unidad estructural -C(=O)-O-. En una realización preferida, el éster  $C_{2-6}$ , que incluye el átomo de C de la unidad estructural -C(=O)-O-, tiene 2-5 átomos de carbono. El éster  $C_{2-6}$  puede estar opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo expuesto anteriormente con respecto a los sustituyentes que pueden estar presentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>. A modo de ejemplo no limitativo, el éster  $C_{2-6}$  puede ser  $-C_2H_4-C(=O)-O-C_2H_5$ , donde la unidad estructural  $-C_2H_4-$  es  $-CH_2-CH_2-$  y la unión es a través de la unidad estructural  $-C_2H_4-$ .

Como se usa en este documento, el término "aldehído" se refiere a un radical lineal o ramificado, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido (excepto cuando el contexto requiera otra cosa) que comprende  $HC(=O)-R_{20-}$ , donde la unión es a través de  $-R_{20-}$ , tiene el número de átomos de carbono indicado, incluido el átomo de C de la unidad estructural -C(=O)- (o donde no esté indicado, un grupo aldehído tiene 1-6, 1-4 o 1-2 átomos de carbono, incluido el átomo C de la unidad estructural -C(=O)-, opcionalmente sustituido con uno, dos o tres de los sustituyentes que pueden estar presentes en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> o R<sub>4</sub>). A modo de ejemplos no limitativos, los grupos aldehído incluyen  $HC(=O)-CH_2-$ ,  $HC(=O)-C_2H_4-$ ,  $HC(=O)-C_3H_6-$ ,  $HC(=O)-C_4H_8-$  and  $HC(=O)-C_5H_{10}-$ .

Como se usa en el presente documento, el término "fluoroalquilo" se refiere a un grupo alquilo, donde el grupo alquilo es un radical hidrocarburo cíclico o acíclico monovalente saturado lineal o ramificado (excepto cuando el contexto requiere otra cosa), que tiene el número de átomos de carbono indicado (o donde no se indica, un grupo alquilo acíclico tiene 1-6 o 1-4 átomos de carbono y un grupo alquilo cíclico tiene 3-6 átomos de carbono) sustituido con 1 a 6 átomos de carbono.

Como se usa en este documento, el término "fluoroalqueno" se refiere a un grupo alqueno, donde el grupo alqueno es un radical hidrocarburo monovalente insaturado lineal o ramificado (excepto cuando el contexto requiere otra cosa) acíclico o cíclico que tiene uno o más enlaces dobles C=C y que tiene el número de átomos de carbono indicado (o donde no esté indicado, un grupo alqueno acíclico tiene 2-6 o 2-4 átomos de carbono y un grupo alqueno cíclico tiene 4-6 átomos de carbono) sustituido con 1 a 6 átomos de carbono.

El proceso para preparar un compuesto de fórmula Ia o Ib se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un solvente adecuado.

Los solventes adecuados incluyen solventes hidrocarburos tales como benceno y tolueno; solventes de tipo éter tales como éter dietílico, tetrahidrofurano, éter difenílico, anisol y dimetoxibenceno; solventes de hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo y clorobenceno; solventes de tipo cetona, tales como acetona, metil etil cetona y metil isobutil cetona; solventes de tipo alcohol tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, alcohol n-butílico y alcohol tert-butílico; solventes de tipo nitrilo tales como acetonitrilo, propionitrilo y benzonitrilo; solventes de tipo éster tales como acetato de etilo y acetato de butilo; solventes de tipo carbonato tales como carbonato de etileno y carbonato de propileno; y similares. Estos pueden usarse individualmente o dos o más de ellos pueden usarse como mezcla.

Preferiblemente, se usa un solvente inerte en el proceso de la presente invención. El término "solvente inerte" significa un solvente inerte bajo las condiciones de la reacción que se describe junto con el mismo que incluye, por ejemplo, benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, cloroformo, cloruro de metileno (o diclorometano), dietil éter, acetato de etilo, acetona, metiletilcetona, metanol, etanol, propanol, isopropanol, tert-butanol, dioxano, piridina y similares. El tetrahidrofurano es particularmente preferido.

Preferiblemente, el proceso de la presente invención se lleva a cabo bajo condiciones sustancialmente secas.

El fosforocloridato se puede preparar a partir de un ariloxi fosforodichloridato y un derivado de aminoácido De manera adecuada protegido. Alternativamente, la química del fosfato se puede usar con agentes de condensación adecuados.

Preferiblemente, el proceso para preparar el compuesto de fórmula Ib puede incluir la etapa de proteger grupos OH libres, en el nucleósido distinto de aquel al que debe unirse el fosforamidato. Por ejemplo, llevar a cabo la reacción del 3'-desoxinucleósido con el fosforocloridato deseado en presencia de t-BuMgCl permite preparar el 2'-fosforamidato.

Como se usa en el presente documento, el término "estereoisómero" define todos los compuestos posibles hechos por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces pero que tienen diferentes estructuras tridimensionales que pueden poseer los compuestos de la presente invención.

Cuando los compuestos de acuerdo con esta invención tienen al menos un centro quiral, pueden existir en consecuencia como enantiómeros. Cuando los compuestos poseen dos o más centros quirales, pueden existir además como diastereoisómeros. Cuando los procesos para la preparación de los compuestos de acuerdo con la invención dan lugar a una mezcla de estereoisómeros, estos isómeros pueden separarse mediante técnicas convencionales tales como cromatografía preparativa. Los compuestos pueden prepararse en forma estereoquímicamente mixta o pueden prepararse enantiómeros individuales mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis o resolución enantioespecífica, formación de pares diastereoisoméricos por formación de sal con un ácido ópticamente activo, seguido de cristalización fraccionada y regeneración de la base libre. Los

compuestos también pueden resolverse mediante la formación de ésteres o amidas diastereoisoméricas, seguido de la separación cromatográfica y la eliminación del auxiliar quiral. Alternativamente, los compuestos pueden resolverse usando una columna de HPLC quiral. Debe entenderse que todos estos isómeros y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

5 Adicionalmente, debe apreciarse que el centro de fosfato es quiral en los compuestos de la presente invención y que los compuestos pueden existir como diastereoisómeros de  $R_P$  y  $S_P$ . La composición del compuesto puede mezclarse  $R_P$  y  $S_P$  o un diastereoisómero puro. En una realización preferida, el compuesto es un diastereoisómero único sustancialmente puro de  $R_P$  o  $S_P$ . Por "diastereoisómero único sustancialmente puro" se entiende que el compuesto consiste en un 98% o más del  $R_P$  o del diastereoisómero  $S_P$ . En otra realización, puede haber una mezcla de 1: 1  $R_P$  a diastereoisómeros  $S_P$ . Alternativamente, el compuesto puede comprender una mezcla de diastereoisómeros  $R_P$  y  $S_P$  en una relación de diastereoisómeros  $R_P$  a  $S_P$  de 1:90 a 90:1, 1:50 a 50:1, 1:20 a 20:1, 1:15 a 15:1, 1:10 a 10:1, 1:9 a 9:1, 1:8 a 8:1, 1:7 a 7:1, 1:6 a 6:1, 1:5 a 5:1, 1:4 a 4:1, 1:3 a 3:1 o 1:2 a 2:1. En realizaciones preferidas, el compuesto de la invención puede comprender una relación de diastereoisómeros de  $R_P$  a  $S_P$  de más de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:50, 1:90, 1:95 o 1:99 o viceversa.

15 El término "solvato" significa un compuesto de la invención como se define en el presente documento, en el que las moléculas de un solvente adecuado se incorporan en la red cristalina. Un solvente adecuado es fisiológicamente tolerable a la dosis administrada. Ejemplos de solventes adecuados son etanol, agua y similares. Cuando el solvente es agua, la molécula se denomina hidrato.

20 Los compuestos de la presente invención también pueden estar presentes en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Para uso en medicina, las sales de los compuestos de esta invención se refieren a "sales farmacéuticamente aceptables". Las formas de sal farmacéuticamente aceptables aprobadas por la FDA (Ref. International J. Pharm. 1986, 33, 201-217; J. Pharm. Sci., 1977, enero, 66 (1)) incluyen sales ácidas/aniónicas o básicas/catiónicas farmacéuticamente aceptables.

25 Las sales ácidas/aniónicas farmacéuticamente aceptables incluyen, y no están limitadas a acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gliceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato y trietioduro.

30 Las sales básicas/catiónicas farmacéuticamente aceptables incluyen, y no se limitan a, aluminio, benzatina, calcio, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, litio, magnesio, potasio, procaína, sodio y zinc.

Los derivados de éster farmacéuticamente aceptables en los que uno o más grupos hidroxilo libres se esterifican en forma de un éster farmacéuticamente aceptable son ejemplos particulares de ésteres que pueden convertirse por solvólisis bajo condiciones fisiológicas a los compuestos de la presente invención que tienen grupos hidroxilo libres.

35 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Estas composiciones farmacéuticas pueden fabricarse de una manera que es conocida, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

40 El compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse a un paciente, que puede ser homo sapiens o animal, por cualquier medio adecuado.

45 Los medicamentos empleados en la presente invención pueden administrarse por vía oral o parenteral, incluida la administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, de las vías respiratorias (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluso bucal y sublingual).

Para la administración oral, los compuestos de la invención generalmente se proporcionarán en forma de comprimidos o cápsulas, como un polvo o gránulos, o como una solución o suspensión acuosa.

50 Las tabletas para uso oral pueden incluir el ingrediente activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes desintegrantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, las tabletas pueden recubrirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

55

Las cápsulas para uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido, y cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

5 Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen, además del ingrediente activo, los portadores que se conocen en la técnica como apropiados.

10 Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, los compuestos de la invención generalmente se proporcionarán en soluciones o suspensiones acuosas estériles, reguladas a un pH e isotonicidad apropiados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen la solución de Ringer y el cloruro de sodio isotónico. Las suspensiones acuosas de acuerdo con la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma de tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y n-propilo.

15 Los compuestos de la invención también pueden presentarse como formulaciones de liposomas.

En general, una dosis adecuada estará en el rango de 0.1 a 300 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. Una dosis más adecuada puede estar en el rango de 0.5 mg a 150 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, en el rango de 0.5 a 100 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, en el rango de 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, o en el rango de 1 a 10 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. Una dosis más baja adecuada puede ser 0.5 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día o 1 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. Alternativamente, una dosis adecuada puede estar en el rango de 1 a 100 mg por m<sup>2</sup> de área de superficie corporal del receptor por día o de 5 a 50 mg por m<sup>2</sup> de área de superficie corporal de receptor por día. Las dosis adecuadas pueden ser de 6, 12, 24 o 48 mg por m<sup>2</sup> de área de superficie corporal del receptor por día. La dosis deseada puede presentarse y administrarse como una dosis diaria única o como dos, tres, cuatro, cinco o seis o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del día. Las dosis se pueden administrar en formas de dosis unitarias, por ejemplo, que contienen de 10 a 1500 mg, preferiblemente de 20 a 1000 mg, y lo más preferiblemente de 50 a 700 mg de ingrediente activo por forma de dosis unitaria. La dosis diaria total es de manera adecuada de 1000 a 3000 mg, ya sea que se tome como una dosis única o como subdosis a intervalos a lo largo del día.

30 "Células madre de cáncer"

Las células madre de cáncer, que a veces se denominan "células iniciadoras de tumores", son bien conocidas por los expertos en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula madre de cáncer" se debe interpretar de acuerdo con su significado ampliamente aceptado, que es una célula que posee la capacidad de autorrenovarse a través de la división asimétrica, para iniciar la formación de tumores, y para dar lugar a más progenie de cáncer de células no madre maduras por diferenciación.

35 Las células madre de cáncer desempeñan un papel importante en el desarrollo, la progresión, la recurrencia y la propagación de los cánceres. Por consiguiente, el descubrimiento de que los compuestos de la invención son capaces de dirigirse a las células madre de cáncer y, por lo tanto, reducir su número, ofrece posibilidades terapéuticas para prevenir o tratar estas actividades.

40 Como se analiza con más detalle en otra parte de la especificación, las células madre de cáncer se encuentran en condiciones precancerosas, donde se cree que su presencia contribuye al desarrollo de tales condiciones en los cánceres. Por consiguiente, los métodos de tratamiento y usos médicos de la invención, en los cuales un compuesto de la invención se usa para atacar las células madre de cáncer, se pueden usar para reducir el número de células madre de cáncer en condiciones precancerosas (tal como el síndrome mielodiplástico u otras condiciones considerado en otra parte de la especificación), y por lo tanto para prevenir la progresión de tales condiciones precancerosas en cáncer.

Como se mencionó anteriormente, la división celular asimétrica de las células madre de cáncer da lugar a células cancerosas no madre diferenciadas. Así, las células madre de cáncer son responsables de la formación y el mantenimiento del volumen del tumor.

50 La acumulación de tales células cancerosas no madre desempeña un papel importante en la progresión de los cánceres. El objetivo de las células madre de cáncer mediante un compuesto de la invención es capaz de reducir el número de células madre de cáncer, lo que a su vez reduce la cantidad de progenie de células cancerosas no madre. Por lo tanto, los métodos de tratamiento y usos médicos de un compuesto de la invención de acuerdo con la presente invención son beneficiosos en el tratamiento del cáncer mediante la prevención de la progresión del cáncer. Tales realizaciones se describen con más detalle en otra parte de la presente especificación.

55

- Las células madre de cáncer también pueden actuar como un reservorio de células cancerosas que pueden causar la recurrencia del cáncer después de la remisión. Incluso en el caso de que la mayoría de las células cancerosas de un paciente hayan sido eliminadas (por ejemplo, mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, ya sea solas o en combinación), para que no queden signos observables de cáncer, la presencia continua de células madre cancerosas puede nuclear la recurrencia del cáncer con el tiempo. El objetivo de las células madre de cáncer mediante un compuesto de la invención proporciona un nuevo modo mediante el cual se puede reducir el número de células madre de cáncer y destruir las células madre de cáncer. Por consiguiente, y como se describe con más detalle en otra parte de la especificación, en realizaciones adecuadas, la presente invención proporciona métodos y usos médicos en los que un compuesto de la invención previene o retrasa la recurrencia del cáncer.
- 5
- 10 Adicionalmente, el movimiento de las células madre de cáncer desde el sitio de un cáncer a otra ubicación dentro del cuerpo puede contribuir a la propagación del cáncer, por ejemplo, dando lugar a metástasis. En consecuencia, la capacidad de un compuesto de la invención para atacar a las células madre de cáncer por lo tanto proporciona nuevos métodos de tratamiento y usos médicos para prevenir o tratar la propagación del cáncer.
- 15 Además de sus actividades biológicas, las células madre de cáncer pueden identificarse por su expresión de ciertos marcadores de superficie celular característicos. Las células madre cancerosas identificadas en malignidades hematológicas son típicamente CD34<sup>+</sup>, mientras que en tumores sólidos, CD44<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> y CD90<sup>+</sup> se han identificado como marcadores de células madre cancerosas. La siguiente tabla resume ejemplos de fenotipos conocidos de superficie de células madre de cáncer. Se espera que cada una de estas formas de células madre cancerosas se pueda atacar utilizando un compuesto de la invención de acuerdo con la invención, y así los métodos o usos que emplean un compuesto de la invención se pueden usar en la prevención o el tratamiento de los cánceres asociados con las células madre de cáncer que expresan cualquiera de estos conjuntos de marcadores.
- 20

Tipo de tumor	Marcadores de superficie celular reportados para células madre cancerosas
Tumores sólidos	
Mama	CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-inferior</sup> / Linaje /ESA <sup>+</sup>
CNS	CD133 <sup>+</sup>
Colon	CD133 <sup>+</sup>
Colon	ESA <sup>superior</sup> /CD44 <sup>+</sup> / Linaje <sup>-</sup> /(CO166 <sup>+</sup> )
De Ewing	CD133 <sup>+</sup>
Cabeza y cuello	CD44 <sup>+</sup> / Linaje <sup>-</sup>
Melanoma	ABC5 <sup>+</sup>
Higado	CD90 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /(CD44 <sup>+</sup> )
Colangiocarcinoma	CD44 <sup>+</sup> /GLI1 <sup>+</sup> (Homólogo-1 de oncógeno asociado a glioma)
Ovario	CD44 <sup>+</sup> /CD117 <sup>+</sup>
Páncreas	CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /ESA <sup>+</sup>
Páncreas	CD133 <sup>+</sup>
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	CD44 <sup>+</sup> /Ber-EP4 <sup>+</sup>
Cáncer de vejiga	CD44 <sup>+</sup> /ALDH1A1 <sup>+</sup>

Tipo de tumor	Marcadores de superficie celular reportados para células madre cancerosas
Tumores sólidos	
Tumores hematológicos	
Leucemia mieloide aguda	Lin <sup>-</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> /CD123 <sup>+</sup>
Leucemia linfoblástica aguda B	CD34 <sup>+</sup> /CD10 <sup>-</sup> o CD34 <sup>+</sup> /CD19 <sup>-</sup>
Leucemia linfoblástica aguda B	CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> /CD19 <sup>+</sup>
Mieloma múltiple	CD34 <sup>-</sup> /CD138 <sup>-</sup>
Leucemia linfoblástica aguda T	CD34 <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup> o CD34 <sup>+</sup> /CD7 <sup>-</sup>

5 Los datos presentados en los Ejemplos demuestran que un compuesto de la invención es capaz de apuntar a células madre cancerosas de líneas de células madre leucémicas, específicamente células madre cancerosas presentes en la línea celular de leucemia mieloide aguda KG1a. Esta línea celular manifiesta un compartimiento similar a una célula madre menor con un inmunofenotipo distinto (Lin<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD123<sup>+</sup>) al que se dirige un compuesto de la invención. Por consiguiente, los métodos de tratamiento o usos médicos de un compuesto de la invención de acuerdo con la presente invención pueden usarse para prevenir o tratar la leucemia u otros cánceres asociados con células madre de cáncer que expresan estos marcadores característicos.

10 La presente invención también proporciona métodos y usos médicos en los que los pacientes se seleccionan para la prevención o el tratamiento del cáncer, utilizando un compuesto de la invención, sobre la base de la identificación de la presencia de células madre cancerosas en una muestra biológica representativa del cáncer del paciente o condición precancerosa. Los marcadores establecidos anteriormente proporcionan ejemplos adecuados que pueden usarse para identificar la presencia de células madre cancerosas de acuerdo con dichas realizaciones de la invención. Las técnicas adecuadas mediante las cuales se puede investigar la expresión de estos marcadores en una muestra biológica se consideran más adelante en esta especificación.

*"Direccionamiento de las células madre de cáncer"*

La presente invención proporciona la primera indicación de que los compuestos de la invención se pueden usar para apuntar a las células madre de cáncer. La capacidad de los compuestos de la invención para apuntar a las células madre de cáncer se ilustra en los ejemplos divulgados en esta especificación.

20 Se puede ver que cuando se proporciona un compuesto de la invención a poblaciones de células cancerosas que contienen células madre cancerosas, se dirige a las células madre cancerosas presentes, lo que conduce a una reducción en el número total de células cancerosas. Como se discutió en otra parte de la presente especificación, ciertos compuestos de la invención se dirigen preferentemente a las células madre cancerosas en lugar de a las células tumorales en masa, y la actividad de tales compuestos puede no solo reducir el número total de células cancerosas presentes, sino también reducir la proporción de células cancerosas totales que exhiben marcadores fenotípicos de células madre cancerosas.

30 Se cree que los compuestos de la presente invención entran en las células cancerosas y se incorporan en los ácidos nucleicos (ARN y/o ADN) con las células. Sin estar limitado a ninguna teoría, se cree que la eficacia, en particular la eficacia contra el cáncer, mostrada por los compuestos de la presente invención demuestra que los compuestos de la presente invención se fosforilan al trifosfato de cordicepina o un derivado de cordicepina (por ejemplo, 2-fluorocordicepina o 2-Cl-cordicepina) y se cree que la escisión enzimática dentro de la célula convierte un compuesto de la invención directamente en monofosfato de 8-cloroadenosina antes de la fosforilación al trifosfato.

35 También se cree que los compuestos de la invención poseen una mayor permeabilidad de la membrana celular (en comparación con cordicepina), y que esto contribuye a la potencia anticancerígena mejorada de los compuestos de la invención en comparación con el progenitor del que se derivan.

Sin desear estar sujetos a ninguna hipótesis, los inventores creen que la reducción en el número de células madre de cáncer surge como resultado de la destrucción direccionada de las células madre de cáncer entre la población de

células cancerosas. Por lo tanto, los compuestos de la invención pueden causar la muerte de las células madre de cáncer. Adicionalmente, los resultados expuestos en otra parte de esta especificación ilustran que ciertos compuestos de la invención parecen matar las células madre de cáncer de manera preferencial en comparación con la muerte de las células cancerosas que no son madre, lo que provoca no solo la muerte de las células madre de cáncer, sino también una reducción de la proporción de células madre cancerosas en la población total de células cancerosas.

5 Si bien los inventores creen que los compuestos de la invención que se dirigen preferentemente a las células madre cancerosas matan preferencialmente a las células madre cancerosas en comparación con las células cancerosas no madre, otros mecanismos también pueden contribuir a la reducción en la proporción de células madre cancerosas causada por un compuesto de la invención dirigida a estas células.

10 Simplemente a modo de ejemplo, el tratamiento con un compuesto de la invención puede causar un aumento en la diferenciación de las células madre de cáncer, reduciendo así el número de células madre de cáncer y también la proporción de células cancerosas totales representadas por las células madre de cáncer. Alternativamente, un compuesto de la invención puede hacer que las células madre de cáncer pierdan su fenotipo de células madre, por ejemplo, perdiendo su capacidad de auto renovación, reduciendo así el número de células madre de cáncer.

15 Las referencias al direccionamiento de células madre cancerosas en la presente divulgación deben interpretarse en consecuencia. Para los fines de la presente divulgación, se puede considerar que el "direccionamiento" de las células madre cancerosas abarca cualquier mecanismo mediante el cual un compuesto de la invención reduce el número de células madre cancerosas presentes en una población de células, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En particular, el direccionamiento de las células madre cancerosas puede tomarse como una reducción preferencial del número de células madre cancerosas en comparación con otros tipos de células, particularmente en comparación con las células cancerosas no madre. Las referencias al direccionamiento en esta especificación pueden considerarse como la destrucción y, opcionalmente, la destrucción preferencial de las células madre cancerosas en comparación con las células cancerosas no madre.

"Prevención o tratamiento del cáncer"

25 La invención proporciona usos médicos y métodos de tratamiento en los que un compuesto de la invención se usa para la prevención o el tratamiento del cáncer. En el contexto de la presente invención, se debe considerar que la "prevención" del cáncer se relaciona con las aplicaciones profilácticas de un compuesto de la invención usado antes del desarrollo del cáncer, y con el objetivo de detener el desarrollo del cáncer. Por otra parte, "tratamiento" del cáncer se toma en relación con el uso de un compuesto de la invención después de que haya ocurrido el cáncer, con el fin de mejorar el cáncer al disminuir o detener la proliferación de células cancerosas y el crecimiento del tumor. Ventajosamente, el tratamiento del cáncer puede causar una reducción parcial o total en el número de células cancerosas y el tamaño del tumor. El tratamiento efectivo del cáncer puede provocar una enfermedad que bien sea "se estabiliza" o "responde" de acuerdo con las pautas RECIST (Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos).

30 35 Como se describe con más detalle a continuación, la prevención del cáncer de acuerdo con la presente invención puede ser particularmente beneficiosa en pacientes que tienen una condición precancerosa que aumenta su probabilidad de desarrollar cáncer.

"Prevención del cáncer"

40 La prevención del cáncer de acuerdo con la presente invención puede efectuarse mediante el tratamiento de una condición precancerosa usando un compuesto de la invención de acuerdo con los diversos aspectos o realizaciones de la invención descritos en el presente documento.

45 En particular, la prevención del cáncer, en el contexto de la presente invención, puede lograrse mediante los métodos o usos médicos de la invención en los que se proporciona un compuesto de la invención a un paciente con una condición precancerosa. Los métodos de tratamiento o usos médicos de acuerdo con esta realización pueden prevenir el desarrollo de la condición precancerosa tratada en cáncer, proporcionando así una prevención efectiva del cáncer.

Las referencias a la prevención del cáncer en el contexto de la presente invención también pueden abarcar otras aplicaciones profilácticas de un compuesto de la invención. Por ejemplo, la capacidad de un compuesto de la invención para apuntar a las células madre de cáncer y prevenir así el desarrollo de cáncer, y/o prevenir la progresión del cáncer, y/o prevenir la recurrencia del cáncer, y/o prevenir la propagación del cáncer. .

50 "Condiciones precancerosas"

55 Con frecuencia, el cáncer está precedido por el desarrollo de una condición precancerosa, que no es cancerosa en sí misma, pero está asociada con un mayor riesgo de cáncer. La acumulación de cambios genéticos o epigenéticos puede hacer que las células previamente normales desarrollen un fenotipo de células madre de cáncer. En consecuencia, las células madre de cáncer también pueden estar presentes en tales condiciones precancerosas, así como en condiciones cancerosas.

- Se cree que la presencia de células madre cancerosas en condiciones precancerosas contribuye al desarrollo de estas condiciones en el cáncer. Los métodos y usos médicos de la invención pueden emplearse para apuntar a células madre cancerosas presentes en condiciones precancerosas y, por lo tanto, tratar tales condiciones. Se apreciará que el descubrimiento nuevo e inesperado de que los compuestos de la invención apuntan a las células madre de cáncer significa que el tratamiento de condiciones precancerosas con tales compuestos puede usarse para prevenir que las condiciones tratadas se conviertan en cáncer. Esto representa una forma en la que un compuesto de la invención puede usarse médicamente en la prevención del cáncer, como se considera en otra parte en esta especificación.
- Ejemplos de condiciones precancerosas que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las seleccionados del grupo que consiste en: queratosis actínica, esófago de Barrett, gastritis atrófica, disqueratosis congénita, disfagia sideropénica, liquen plano, fibrosis submucosa oral, elastosis solar, displasia cervical, leucoplasia, eritroplasia, gammopatía monoclonal de importancia desconocida (MGUS), linfocitosis monoclonal de células B (MBL), síndromes mielodisplásicos así como condiciones precancerosas del estómago tales como gastritis atrófica, úlcera gástrica, anemia perniciosa, muñones gástricos, pólipos gástricos y enfermedad de Ménétrier. Entre las condiciones precancerosas del estómago que figuran en la lista, gastritis atrófica, anemia perniciosa, muñones gástricos y ciertos tipos de pólipos gástricos pueden tener un riesgo particularmente alto de desarrollar cáncer.
- Las condiciones precancerosas a menudo toman la forma de lesiones que comprenden células displásicas o hiperplásicas. Por consiguiente, la presencia de displasia o hiperplasia, como una alternativa o adición a la presencia de células con marcadores expresados o fenotipos característicos de las células madre de cáncer, puede usarse en la identificación de condiciones precancerosas.
- La gravedad de la displasia puede variar entre diferentes condiciones precancerosas o con el desarrollo de una única condición precancerosa a lo largo del tiempo. En general, cuanto más avanzada es la displasia asociada con una condición precancerosa, más probable es que la condición precancerosa se convierta en cáncer. La displasia se clasifica típicamente como leve, moderada o grave. La displasia grave generalmente se convierte en cáncer si no se trata. De manera adecuada, los métodos de tratamiento o usos médicos que emplean un compuesto de la invención pueden, por lo tanto, usarse para tratar a un paciente con una condición precancerosa asociada con displasia severa.
- En una realización adecuada de la invención, un compuesto de la invención se usa para tratar a un paciente con displasia cervical grave. La displasia cervical grave puede diagnosticarse mediante una prueba de frotis. En otra realización de la invención, un compuesto de la invención se usa para tratar la displasia esofágica grave ("esófago de Barrett"). La displasia esofágica grave se puede diagnosticar después de una biopsia de tejido.
- Recientemente se ha informado que las neoplasias malignas también pueden identificarse mediante la detección de mutaciones somáticas en células en individuos que no se sabe que tengan cáncer. En particular, se ha informado que la hematopoyesis clonal relacionada con la edad es una condición premaligna común que se asocia con un aumento de la mortalidad general y un mayor riesgo de enfermedad cardiometabólica. La mayoría de las mutaciones detectadas en células sanguíneas ocurrieron en tres genes: DNMT3A, TET2 y ASXL1. Por consiguiente, los pacientes que se beneficiarán del uso de un compuesto de la invención que apunta a las células madre de cáncer y, por lo tanto, tratar una condición precancerosa, pueden identificarse analizando una muestra que comprenda células sanguíneas para detectar la presencia de mutaciones genéticas indicativas de una condición cancerosa en al menos uno de: DNMT3A y/o TET2 y/o ASXL1.
- Las condiciones precancerosas que pueden beneficiarse del tratamiento con un compuesto de la invención de acuerdo con la invención para apuntar a las células madre de cáncer también se pueden identificar mediante la determinación de la presencia de células madre de cáncer con referencia a cualquiera de las técnicas basadas en la expresión de marcadores característicos de las células madre de cáncer, o fenotipos de células madre de cáncer, discutidas en otra parte de la especificación.
- "Tratamiento del cáncer"
- El experto en la técnica apreciará que hay muchas mediciones mediante las cuales se puede evaluar el "tratamiento" del cáncer. Simplemente a modo de ejemplo, se puede considerar que cualquier reducción o prevención del desarrollo del cáncer, la progresión del cáncer, la recurrencia del cáncer o la propagación del cáncer indican un tratamiento efectivo del cáncer.
- En ciertas realizaciones, se puede usar un compuesto de la invención: para reducir la proporción de células madre cancerosas en una población de células cancerosas; y/o para inhibir el crecimiento tumoral; y/o para reducir la tumorigenicidad; y/o para prevenir o tratar un cáncer primario; y/o para prevenir o tratar un cáncer recurrente; y/o para prevenir o tratar un cáncer metastásico o secundario; y/o para tratar, prevenir o inhibir la metástasis o la recurrencia; y/o para tratar o prevenir el cáncer refractario.
- La capacidad del tratamiento del cáncer usando un compuesto de la invención para lograr una reducción en el tamaño del tumor, y también para mantener la reducción en el tamaño del tumor durante/después del período en el que se administra el tratamiento representa una indicación particularmente relevante de un tratamiento efectivo contra el cáncer. Tal como se establece en los Ejemplos, los tratamientos o usos médicos de la invención han demostrado ser

sorprendentemente efectivos a este respecto, incluso en modelos que usan células representativas de cánceres recidivantes o refractarios que han sido previamente resistentes al tratamiento con otras terapias.

5 Los datos presentados en los ejemplos ilustran que el tratamiento con un compuesto de la invención reduce la proporción de células madre cancerosas en una población de células cancerosas. Las actividades biológicas características o los marcadores de superficie celular mediante los cuales se pueden identificar las células madre de  
10 cáncer se describen en otra parte de la especificación. En una realización adecuada, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la presente invención puede dar lugar a una reducción en la proporción de células madre cancerosas presentes en el cáncer de un paciente de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, o menos el 40%. En realizaciones adecuadas, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en la proporción de células madre cancerosas presentes en el cáncer de un paciente de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70% o al menos el 80%. El tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en la proporción de células madre cancerosas presentes en el cáncer de un paciente de al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95%. De hecho, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en la proporción de células madre cancerosas presentes en el cáncer de un paciente de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o incluso el 100% (de tal manera que sustancialmente no quedan células madre cancerosas).

20 La división asimétrica de las células madre de cáncer contribuye al crecimiento de los tumores. El tratamiento del cáncer con un compuesto de la invención de acuerdo con la presente invención puede provocar una inhibición del crecimiento tumoral de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30% o al menos el 40%. El tratamiento adecuado del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una inhibición del crecimiento tumoral de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70% o al menos el 80%. El tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una inhibición del crecimiento tumoral de al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% en un paciente así tratado. De hecho, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una inhibición del crecimiento tumoral de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o incluso el 100% en un cáncer tratado.

30 El crecimiento del tumor se puede evaluar mediante cualquier método adecuado en el que el cambio en el tamaño de un tumor se evalúe a lo largo del tiempo. De manera adecuada, el tamaño de un tumor antes del tratamiento del cáncer puede compararse con el tamaño del mismo tumor durante o después del tratamiento del cáncer. Se conocen un número de formas en que se puede evaluar el tamaño de un tumor. Por ejemplo, el tamaño de un tumor puede evaluarse mediante imágenes del tumor in situ dentro de un paciente. Las técnicas adecuadas, tales como las técnicas de generación de imágenes, pueden permitir determinar el volumen de un tumor y evaluar los cambios en el volumen del tumor.

35 Como se muestra en los resultados establecidos en los Ejemplos de esta especificación, los métodos de tratamiento y usos médicos de un compuesto de la invención de la invención no solo pueden detener el crecimiento del tumor, sino que en realidad pueden lograr una reducción en el volumen del tumor en pacientes con cáncer, incluidos los pacientes con cánceres recidivantes o refractarios. De manera adecuada, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la presente invención puede dar lugar a una reducción en el volumen del tumor de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, o al menos el 40%. En realizaciones adecuadas, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en el volumen del tumor de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% o al menos 80%. El tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en el volumen del tumor de al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95%. De hecho, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en el volumen del tumor de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o incluso el 100%.

45 Una reducción en el volumen del tumor del tipo descrito anteriormente se puede calcular con referencia a un control adecuado. Por ejemplo, en estudios realizados in vitro o in vivo en modelos animales adecuados, la reducción en el volumen del tumor se puede determinar por comparación directa entre el volumen de un tumor tratado con un compuesto de la invención y el volumen de un tumor de control (que puede ser no tratado, o puede haber recibido un tratamiento diferente al de un compuesto de la invención). Se apreciará que tales modelos que requieren la falta de tratamiento de un tumor pueden no ser éticamente aceptables en el contexto de los ensayos clínicos o el manejo terapéutico de los pacientes, y en este caso se puede evaluar una reducción en el volumen del tumor comparando el volumen de un tumor tratado con el volumen del mismo tumor antes del tratamiento, o con un volumen predicho que hubiera sido alcanzado por el tumor si no se hubiera administrado ningún tratamiento.

50 Los métodos de tratamiento y usos médicos de un compuesto de la invención pueden provocar una reducción en los biomarcadores indicativos de cáncer. La reducción de tales biomarcadores proporciona una evaluación adicional mediante la cual se puede demostrar un tratamiento efectivo del cáncer. Ejemplos adecuados de tales biomarcadores pueden seleccionarse en función del tipo de cáncer que se va a tratar: en el caso de los cánceres ginecológicos, CA125 representa un ejemplo adecuado de un biomarcador, mientras que en el caso de los cánceres pancreáticos o biliares, CA19.9 representa un ejemplo adecuado de un biomarcador, y en el caso de los cánceres colorrectales, el CEA puede ser un biomarcador adecuado.

De manera adecuada, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la presente invención puede dar lugar a una reducción en los biomarcadores del cáncer de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30% o al menos un 40%. En realizaciones adecuadas, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en los biomarcadores del cáncer de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, o al menos el 80%. El tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en los biomarcadores del cáncer de al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95%. De hecho, el tratamiento del cáncer de acuerdo con la invención puede dar lugar a una reducción en los biomarcadores del cáncer de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o incluso el 100%.

Los efectos beneficiosos, tales como la reducción en la proporción de células madre cancerosas presentes, la reducción en el crecimiento del tumor o la reducción en el volumen del tumor o los biomarcadores del cáncer, observados en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la presente invención, pueden mantenerse durante al menos un mes. De manera adecuada, tales efectos beneficiosos pueden mantenerse durante al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses o al menos seis meses. De hecho, tales efectos beneficiosos pueden mantenerse durante al menos 12 meses, al menos 18 meses o al menos 24 meses. De manera adecuada, los efectos beneficiosos pueden mantenerse durante al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o durante diez años o más.

En una realización adecuada de la invención, un compuesto de la invención se usa en un método para prevenir o tratar el cáncer o una condición premaligna, dirigiéndose a las células madre de cáncer. En una realización adecuada, la invención proporciona el uso de un compuesto de la invención en un método para prevenir o tratar el cáncer o una condición premaligna, en el que el método reduce la tumorigenicidad de una o más células madre cancerosas. De manera adecuada, tales métodos pueden prevenir la progresión del cáncer o inhibir el crecimiento del tumor.

Cuando un compuesto de la invención se usa en métodos o usos médicos de la presente invención para prevenir o tratar la progresión de un cáncer, tal prevención o tratamiento puede hacer que la progresión del cáncer se desacelere, se retrase o se detenga por completo.

El progreso de un cáncer típicamente se determina asignándole una etapa al cáncer. La estadificación se realiza generalmente asignando un número de I a IV al cáncer, siendo I un cáncer aislado y IV un cáncer que se ha extendido hasta el límite de lo que mide la evaluación. Los detalles de la estadificación varían entre los cánceres, pero la etapa generalmente toma en cuenta el tamaño de un tumor, si ha invadido órganos adyacentes, a cuántos ganglios linfáticos regionales (cercaños) se ha diseminado (si hay alguno) y si ha aparecido en ubicaciones más distantes (metastatizadas).

En general, la etapa I se localiza en una parte del cuerpo y se puede tratar con resección quirúrgica (para tumores sólidos que son lo suficientemente pequeños). La etapa II está localmente avanzada y se puede tratar con quimioterapia, radioterapia, cirugía o una combinación de ellas. La Etapa III también está avanzada a nivel local y la designación de Etapa II o Etapa III depende del tipo específico de cáncer, aunque la Etapa III generalmente se acepta como "tardía" localmente avanzada. Los cánceres en Etapa IV a menudo se han metastatizado en un segundo órgano. El tratamiento del cáncer utilizando un compuesto de la invención en los métodos o usos médicos de la presente invención se puede usar para tratar un cáncer en la Etapa I, II, III o IV dirigiéndose a las células madre de cáncer. El tratamiento con un compuesto de la invención se puede usar para prevenir la progresión de un cáncer de una etapa a la siguiente. En una realización, el tratamiento con un compuesto de la invención se usa para prevenir la progresión desde la Etapa I a la Etapa II. En otra realización, el tratamiento con un compuesto de la invención se usa para prevenir la progresión desde la Etapa II a la Etapa III. En todavía otra realización, el tratamiento con un compuesto de la invención se usa para prevenir la progresión desde la Etapa III a la Etapa IV.

La prevención o inhibición de la progresión del cáncer es particularmente importante para prevenir la diseminación del cáncer, por ejemplo, la progresión de la Etapa I a la Etapa II donde el cáncer se disemina localmente, o la progresión de la Etapa III a la Etapa IV donde el cáncer se metastatiza a otros órganos. Las células madre de cáncer son tumorigénicas y, por lo tanto, se cree que desempeñan un papel fundamental en la propagación del cáncer, tanto a nivel local como metastático. Los métodos de tratamiento o usos médicos de la invención que emplean un compuesto de la invención pueden utilizarse, por lo tanto, para prevenir la propagación del cáncer, dirigiéndose a las células madre de cáncer tumorigénicas y reduciendo así su número.

#### "Cánceres"

Los compuestos de la invención demuestran una mayor actividad anticancerígena en comparación con los nucleósidos progenitores de los que se derivan. Este aumento de la actividad anticancerígena parece proporcionarse como resultado de una mayor actividad tanto contra las células madre cancerosas como las células cancerosas no madre.

Las células madre de cáncer desempeñan un papel en la actividad biológica de un amplio rango de cánceres. Por consiguiente, existe un amplio rango de cánceres que pueden prevenirse o tratarse de acuerdo con la presente invención.

5 Como se explica en otra parte del presente documento, se sabe que las células madre de cáncer están presentes en muchos tipos de tumores, incluidos los tumores líquidos (incluidos los tumores hematológicos tales como las leucemias y los linfomas) y los tumores sólidos (tales como los tumores de mama, pulmón, colon, próstata, ovario, piel, vejiga, biliares y pancreáticos). Por lo tanto, se espera que los métodos de tratamiento y los usos médicos de un compuesto de la invención para apuntar a las células madre de cáncer sean útiles en la prevención o el tratamiento de tales cánceres.

10 De manera adecuada, un compuesto de la invención puede usarse en la prevención o tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: leucemia, linfoma, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, neuroblastoma, carcinoma de tiroides, cáncer de piel (incluyendo melanoma), carcinoma de células escamosas orales, cáncer de vejiga urinaria, tumor de células de Leydig, cáncer biliar, tal como el cáncer de coangiocarcinoma o del conducto biliar, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer colorrectal y cáncer ginecológico, incluyendo cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de útero y cáncer de cuello uterino, incluyendo el carcinoma epitelial de cérvix. En realizaciones adecuadas, el cáncer es leucemia y puede seleccionarse del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda (también conocida como leucemia mieloide aguda o leucemia no linfocítica aguda), leucemia promielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica (también conocida como leucemia mieloide crónica, leucemia mielocítica crónica o leucemia granulocítica crónica), leucemia linfocítica crónica, leucemia monoblástica y leucemia de células pilosas. En otras realizaciones preferidas, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda. En una realización particular, la leucemia es leucemia TdT positiva refractaria. En una realización adecuada, el cáncer es un linfoma, que puede seleccionarse del grupo que consiste en: linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; Linfoma de Burkitt; y linfoma linfocítico pequeño.

15 El direccionamiento de manera adecuada a las células madre de cáncer en tales cánceres puede lograr un tratamiento efectivo del cáncer al prevenir o tratar el desarrollo del cáncer, al prevenir o tratar la progresión del cáncer, al prevenir o tratar la recurrencia del cáncer, o al prevenir o tratar la propagación del cáncer.

20 En una realización adecuada, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de células madre cancerosas en la prevención o el tratamiento del cáncer metastásico.

En una realización adecuada, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de células madre cancerosas en el tratamiento de cáncer recidivante o refractario.

25 En una realización adecuada, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de células madre cancerosas en el tratamiento de un cáncer primario. De manera adecuada el cáncer primario tratado puede ser un segundo cáncer primario.

La invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de células madre cancerosas en el tratamiento de cáncer secundario. En una realización adecuada, el cáncer secundario es un cáncer metastásico.

30 En una realización adecuada, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el direccionamiento de células madre cancerosas, en el que el direccionamiento de células madre cancerosas previene o inhibe: (i) la recurrencia de un cáncer; (ii) aparición de un segundo cáncer primario; o (iii) metástasis de un cáncer.

35 Los métodos de tratamiento o usos médicos en los que se emplea un compuesto de la invención sobre la base de su capacidad para apuntar a las células madre de cáncer pueden usarse en el tratamiento de cáncer en recaída o refractario. Las consideraciones con respecto al cáncer recidivante o refractario en tales realizaciones son, excepto cuando el contexto requiera otra cosa, las mismas que para el tratamiento del cáncer recidivante o refractario en relación con los aspectos de la invención.

"Cáncer recurrente o refractario"

Como se señaló anteriormente, ciertos aspectos y realizaciones de la invención se refieren particularmente al uso de un compuesto de la invención en el tratamiento de cánceres recurrentes o refractarios.

40 Para los fines de la presente invención, los cánceres refractarios pueden tomarse como cánceres que demuestran resistencia al tratamiento mediante terapias anticancerosas distintas de las que utilizan un compuesto de la invención. Por ejemplo, un compuesto de la invención puede usarse en el tratamiento de cánceres refractarios que son resistentes al tratamiento con radioterapia. Alternativamente, o adicionalmente, un compuesto de la invención se puede usar en el tratamiento de cánceres refractarios que son resistentes a agentes biológicos usados en el tratamiento del cáncer.

45 En una realización adecuada, un compuesto de la invención se puede usar en el tratamiento de cánceres refractarios que son resistentes al tratamiento con agentes quimioterapéuticos distintos de un compuesto de la invención.

En particular, los cánceres refractarios que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento de usos médicos de la invención que emplean un compuesto de la invención incluyen aquellos cánceres que son resistentes a cordicepina o 2-fluorocordicepina.

Los cánceres recidivantes (o cánceres recurrentes) son aquellos que regresan después de un período de remisión durante el cual no se puede detectar el cáncer. La recurrencia del cáncer puede ocurrir en el sitio del cáncer original (recurrencia local del cáncer), en un sitio cercano al del cáncer original (recurrencia regional del cáncer), o en un sitio alejado del cáncer original (recurrencia del cáncer distal). Se cree que las células madre de cáncer desempeñan un papel en la recurrencia del cáncer, proporcionando una fuente a partir de la cual se generan las células del cáncer recurrente. Por consiguiente, los métodos de tratamiento y usos médicos de un compuesto de la invención de acuerdo con la invención, que permiten el direccionamiento de células madre cancerosas, pueden ser de gran beneficio en el contexto de los cánceres recurrentes. La capacidad de un compuesto de la invención para apuntar a las células madre de cáncer se puede usar para eliminar las poblaciones de tales células que pueden dar lugar a recurrencias, evitando así la incidencia de cáncer recurrente. La actividad de las células madre contra el cáncer de un compuesto de la invención también se puede usar para apuntar a las células madre de cáncer en los cánceres que han recurrido, así como ejercer potencialmente efectos citotóxicos en las células cancerosas no madre, proporcionando así el tratamiento de los cánceres recidivantes.

En vista de lo anterior, se apreciará que un compuesto de la invención se puede usar en los métodos o usos de la invención para la prevención o el tratamiento de un cáncer en recaída. Un compuesto de la invención se puede usar en los métodos o usos de la invención para la prevención o el tratamiento de un cáncer local, regional o distante recidivante.

Un compuesto de la invención se puede usar en los métodos o usos de la invención para prevenir la recurrencia del cáncer proporcionando al menos 2 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, o al menos 30 meses de remisión. De hecho, un compuesto de la invención se puede usar para prevenir la recurrencia del cáncer al proporcionar al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 6 años, al menos 7 años, al menos 8 años, al menos 9 años, o al menos 10 años de remisión.

Un compuesto de la invención se puede usar en los métodos o usos de la invención para tratar un cáncer recurrente que haya recurrido después de al menos 2 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, o al menos 30 meses de remisión. De hecho, un compuesto de la invención se puede usar para tratar un cáncer recurrente que ha recurrido después de al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 6 años, al menos 7 años, al menos 8 años, al menos 9 años, o al menos 10 años de remisión.

La capacidad de los compuestos de la invención para apuntar a las células madre de cáncer da lugar a la capacidad de estos compuestos para prevenir o tratar cánceres de acuerdo con los usos médicos o métodos de tratamiento de la invención. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los compuestos de la invención también ejercen un efecto citotóxico directo sobre las células cancerosas no madre que forman parte del volumen de los tumores. Si bien la actividad de las células madre cancerosas puede ser la base de gran parte de la resistencia que hace que los cánceres recurrentes o refractarios sean tan difíciles de tratar, las células cancerosas no madre también son un componente importante de tales cánceres recurrentes o refractarios.

Los compuestos de la invención ejercen mayores efectos citotóxicos sobre las células cancerosas no madre que la cordicepina o la 2-fluorocordicepina, la molécula quimioterapéutica de la que se derivan los compuestos de la invención. Por consiguiente, el mecanismo mediante el cual un compuesto de la invención actúa en el tratamiento del cáncer recidivante o refractario puede no estar limitado únicamente a la actividad de células madre anticancerígenas de este compuesto, sino que también puede hacer uso de la acción de un compuesto de la invención sobre células cancerosas no madre. En tales usos, el tratamiento con un compuesto de la invención reducirá el número total tanto de células madre cancerosas como de células no madre cancerosas. Cuando se utilizan ciertos compuestos de la invención, tales tratamientos reducirán preferencialmente la proporción de células madre cancerosas que permanecen después del tratamiento.

Dosis terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención puede ser una cantidad suficiente para inducir la muerte de células cancerosas. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención puede ser una cantidad suficiente para inducir la muerte de células madre cancerosas. En algunas realizaciones, particularmente las relacionadas con el tratamiento del cáncer recidivante o refractario, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención puede ser una cantidad suficiente para inducir la muerte de células madre cancerosas y también para inducir la muerte de células cancerosas no madre.

Hay diversas formas diferentes en las que la cantidad de un compuesto terapéuticamente efectivo, tal como un compuesto de la invención, para administrarse a un paciente puede calcularse y expresarse. Una forma tal que se considera particularmente relevante en dosis de agentes para la prevención o el tratamiento del cáncer, es en la cantidad de del a administrar por unidad de área de superficie corporal del paciente. Tales dosis se expresan típicamente en términos de la cantidad de agente (que se puede determinar por masa) por metro cuadrado (m<sup>2</sup>) de área de superficie.

Los usos de un compuesto de la invención para la prevención o el tratamiento del cáncer pueden utilizar una dosis semanal de entre 10 mg/m<sup>2</sup> y 1000 mg/m<sup>2</sup>. Tales tratamientos pueden, por ejemplo, utilizar una dosis semanal de

entre 375 mg/m<sup>2</sup> y 900 mg/m<sup>2</sup>. Por ejemplo, puede proporcionarse un tratamiento efectivo de los cánceres recidivantes o refractarios cuando a los pacientes se les proporcionan dosis semanales de un compuesto de la invención que oscilan entre aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup> y 825 mg/m<sup>2</sup>.

5 Sin querer estar limitado por ninguna hipótesis, los inventores creen que la capacidad de un compuesto de la invención para atacar a las células madre de cáncer permite que se logre la efectividad terapéutica utilizando dosis más bajas de este compuesto de lo que cabría esperar. Simplemente a modo de ejemplo, las dosis semanales de un compuesto de la invención que son tan bajas como 825 mg/m<sup>2</sup>, 750 mg/m<sup>2</sup>, 600 mg/m<sup>2</sup> o 500 mg/m<sup>2</sup> pueden ser terapéuticamente efectivas en los usos y métodos de invención.

10 Una dosis semanal elegida de un compuesto de la invención puede proporcionarse en una única incidencia de administración, o en múltiples incidencias de administración durante una semana. Por ejemplo, una dosis semanal de un compuesto de la invención se puede proporcionar en dos incidencias de administración, en tres incidencias de administración, o más. Por lo tanto, en el caso de una dosis semanal de 750 mg/m<sup>2</sup>, esto puede lograrse mediante tres administraciones de 250 mg/m<sup>2</sup> en el transcurso de una semana, o dos administraciones de 375 mg/m<sup>2</sup> durante una semana. De manera similar, en el caso de una dosis semanal de 600 mg/m<sup>2</sup>, esto puede lograrse mediante tres administraciones de 200 mg/m<sup>2</sup> en el transcurso de una semana, o dos administraciones de 300 mg/m<sup>2</sup> durante una semana.

Una cantidad adecuada de un compuesto de la invención para ser administrada en una sola incidencia de tratamiento para proporcionar una dosis requerida de este compuesto en el transcurso de la semana puede estar entre aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup> y 300 mg/m<sup>2</sup>.

20 La dosis semanal de un compuesto de la invención proporcionada puede disminuir a lo largo del tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede iniciarse con una dosis semanal de alrededor de 1000 mg/m<sup>2</sup>, 900 mg/m<sup>2</sup>, 825 mg/m<sup>2</sup>, 750 mg/m<sup>2</sup> o 725 mg/m<sup>2</sup>, y en el transcurso del tratamiento la dosis necesaria puede disminuir a alrededor de 750 mg/m<sup>2</sup> (en los casos donde la dosis inicial es superior a esta cantidad), alrededor de 650 mg/m<sup>2</sup>, alrededor de 625 mg/m<sup>2</sup>, o incluso alrededor de 500 mg/m<sup>2</sup> o alrededor de 375 mg/m<sup>2</sup>.

25 Las dosis de un compuesto de la invención pueden, por supuesto, presentarse de otras maneras. El más común de estos es la cantidad de agente activo que se proporciona por unidad de masa corporal. Se ha calculado que para un paciente humano promedio, una dosis de 1 mg/m<sup>2</sup> es equivalente a aproximadamente 0.025 mg/kg de masa corporal. Por consiguiente, los datos indican que un compuesto de la invención es efectivo para el tratamiento del cáncer recidivante o refractario en dosis que varían de aproximadamente 6.25 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg. Una dosis adecuada puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 9.5 mg/kg y 22.5 mg/kg. En una realización adecuada, un compuesto de la invención logra un tratamiento efectivo de cánceres recidivantes o refractarios cuando a los pacientes se les proporcionan dosis semanales que oscilan entre aproximadamente 12.5 mg/kg y 20.5 mg/kg.

35 Las consideraciones con respecto a las formulaciones de un compuesto de la invención adecuado para uso en los métodos de prevención o tratamiento y usos médicos de la presente invención se describen en otra parte en esta descripción. En el caso de formulaciones inyectables de un compuesto de la invención, estas pueden administrarse por vía intravenosa. La administración intravenosa se puede lograr en cualquier período de tiempo adecuado, por ejemplo, en una inyección de diez minutos, o similar.

#### Tipos de tratamiento

40 En una realización adecuada, un compuesto de la invención puede usarse para dirigirse a las células madre de cáncer como tratamiento de primera línea para el cáncer.

45 Sin embargo, el descubrimiento de que los compuestos de la invención pueden apuntar a las células madre de cáncer y, por lo tanto, tratar el cáncer recurrente o refractario, ilustra que un compuesto de la invención es capaz de proporcionar un tratamiento efectivo del cáncer en contextos en los que otros tratamientos han resultado ineficaces. Por consiguiente, en una realización adecuada, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para dirigirse a las células madre de cáncer como un tratamiento de segunda línea para el cáncer. De hecho, en una realización adecuada, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para dirigirse a las células madre de cáncer como un tratamiento de cáncer de tercera línea o adicional.

50 En una realización adecuada, se proporciona un compuesto de la invención para uso como un neoadyuvante en el tratamiento del cáncer. Un neoadyuvante es un agente proporcionado a un paciente con el fin de reducir el tamaño de un tumor antes de una terapia "principal" contra el cáncer, tal como la extirpación quirúrgica del cáncer. Un compuesto de la invención puede usarse como una terapia neoadyuvante para un paciente que subsecuentemente se someterá a un tratamiento quirúrgico del cáncer y/o radioterapia para el cáncer.

55 Alternativamente, o adicionalmente, la invención proporciona un compuesto de la invención para uso como adyuvante en el tratamiento del cáncer. Un adyuvante es un agente proporcionado a un paciente después de una terapia "principal" contra el cáncer, tal como la extirpación quirúrgica del cáncer, para prevenir el retorno del cáncer después de la terapia principal. Un compuesto de la invención se puede usar como adyuvante para un paciente que se ha sometido a un tratamiento quirúrgico de cáncer y/o radioterapia para el cáncer.

Un compuesto de la invención puede emplearse en los métodos o usos de la invención en una monoterapia, es decir, en prevenciones o tratamientos en los que un compuesto de la invención proporciona sustancialmente toda la actividad terapéutica que se utiliza en la prevención o tratamiento.

- 5 Alternativamente, los métodos o usos de la invención pueden emplear un compuesto de la invención en una terapia de combinación. En tales realizaciones, un compuesto de la invención se usa junto con al menos una terapia de cáncer adicional. La terapia adicional contra el cáncer puede comprender cirugía y/o radioterapia. Adicionalmente, o alternativamente, la terapia adicional contra el cáncer puede comprender el uso de al menos un agente terapéutico adicional que contribuya a la prevención o el tratamiento del cáncer a lograr. De manera adecuada, dicho agente puede ser un agente quimioterapéutico o un agente biológico usado en la prevención o el tratamiento del cáncer.
- 10 En una realización adecuada de una terapia de combinación, un compuesto de la invención y un agente terapéutico adicional pueden proporcionarse a un paciente al mismo tiempo. En un ejemplo adecuado, el compuesto de la invención y un agente terapéutico adicional pueden formularse como parte de la misma composición farmacéutica. Alternativamente, el compuesto de la invención y un agente terapéutico adicional pueden formularse por separado para proporcionar al paciente sustancialmente al mismo tiempo.
- 15 En otra realización adecuada de una terapia de combinación, un compuesto de la invención y un agente terapéutico adicional pueden proporcionarse a un paciente en diferentes momentos. El compuesto de la invención y un agente terapéutico adicional pueden proporcionarse a un paciente de forma secuencial. Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede proporcionar al paciente antes de la provisión del agente terapéutico adicional. Alternativamente, se puede proporcionar un compuesto de la invención al paciente después de la provisión del agente terapéutico adicional.
- 20

#### "Agentes terapéuticos adicionales"

Un compuesto de la invención se puede usar en combinación con un amplio rango de agentes terapéuticos adicionales para la prevención o el tratamiento del cáncer. Estos incluyen agentes biológicos, agentes inmunoterapéuticos y agentes quimioterapéuticos que pueden usarse para la prevención o el tratamiento del cáncer.

- 25 Si bien los ejemplos específicos de agentes adicionales adecuados se consideran en los párrafos siguientes, no deben tomarse como limitantes del rango de agentes terapéuticos adicionales adecuados para su uso con un compuesto de la invención. De hecho, la capacidad de un compuesto de la invención para apuntar a las células madre de cáncer indica que puede usarse de manera beneficiosa en combinación con cualquier agente terapéutico adicional utilizado en la prevención o el tratamiento del cáncer, ya sea que tal agente adicional se dirija a las células madre de cáncer, células cancerosas no madre, u otras células o componentes involucrados en el desarrollo, mantenimiento, recurrencia, propagación o de cáncer.
- 30

Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar en combinación con un compuesto de la invención incluyen:

- 35 (a) un agente antiangiogénico, opcionalmente en donde el agente antiangiogénico es: (i) un inhibidor de la vía de VEGF, opcionalmente bevacizumab; (ii) un inhibidor de tirosina quinasa, opcionalmente sorafenib, sunitinib o pazopanib; o (iii) un inhibidor de mTOR, opcionalmente everolimus;
- (b) un agente alquilante;
- (c) un antimetabolito;
- (d) un antibiótico antitumoral;
- 40 (e) una topoisomerasa;
- (f) un inhibidor mitótico;
- (g) un anticuerpo monoclonal;
- (h) un agente metálico; o
- (i) una inmunoterapia activa o pasiva.

- 45 Excepto cuando el contexto requiera otra cosa, los agentes terapéuticos adicionales establecidos en la lista anterior deben considerarse adecuados para su uso en cualquiera de las realizaciones de terapias de combinación con un compuesto de la invención considerado anteriormente.

#### Selección de pacientes

- 50 El hallazgo de los inventores de que un compuesto de la invención es capaz de apuntar a las células madre de cáncer hace posible un número de métodos por los cuales es posible determinar si un paciente en particular se beneficiará

de recibir un compuesto de la invención en la prevención o el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer recidivante o refractario.

5 En consecuencia, la divulgación proporciona un método para determinar si un paciente con cáncer o una condición precancerosa se beneficiará de la prevención o el tratamiento del cáncer con un compuesto de la invención, comprendiendo el método: analizar una muestra biológica representativa de cáncer o una condición cancerosa en el paciente por la presencia de células madre cancerosas; en donde la presencia de células madre cancerosas en la muestra biológica indica que el paciente se beneficiará del tratamiento con un compuesto de la invención.

10 La divulgación proporciona además un método para determinar un régimen de tratamiento adecuado para un paciente con cáncer o una condición precancerosa, comprendiendo el método: analizar una muestra biológica representativa de cáncer o una condición precancerosa en el paciente para detectar la presencia de células madre de cáncer; en donde la presencia de células madre de cáncer en la muestra biológica indica que un régimen de tratamiento adecuado comprenderá el tratamiento del paciente con un compuesto de la invención.

15 La invención también proporciona un compuesto de la invención para uso en la prevención o tratamiento del cáncer en un paciente seleccionado para tal tratamiento mediante un método que comprende: analizar una muestra biológica representativa de cáncer o una condición precancerosa en el paciente para detectar la presencia de células madre de cáncer; en donde la presencia de células madre de cáncer en la muestra biológica indica que el paciente es adecuado para el tratamiento con un compuesto de la invención.

En realizaciones adecuadas, las células madre de cáncer en una muestra biológica pueden identificarse por su expresión de patrones característicos de marcadores discutidos previamente en la solicitud.

20 El experto en la técnica apreciará que hay muchos ejemplos adecuados de muestras biológicas que pueden usarse en realizaciones de la invención tales como las expuestas anteriormente. De manera adecuada, una muestra de este tipo puede incluir células de cáncer o condición precancerosa. Una muestra biológica adecuada puede ser una muestra de tejido, tal como una muestra para uso en histología. Las células en tales muestras pueden ser evaluadas directamente para determinar su expresión de marcadores de células madre de cáncer, tal como los que se han  
25 expuesto anteriormente.

Alternativa o adicionalmente, una muestra biológica adecuada puede comprender moléculas diana representativas de la expresión génica por células del cáncer o condición precancerosa. Los ejemplos de tales moléculas diana incluyen proteínas codificadas por los genes expresados, o ácidos nucleicos, tales como ARNm, representativos de la expresión génica.

30 Ejemplos adecuados de técnicas mediante las cuales se puede evaluar la expresión de marcadores de células madre de cáncer pueden seleccionarse con referencia al tipo de muestra. Las técnicas para la investigación de marcadores expresados se utilizan con frecuencia en el contexto de las evaluaciones clínicas (tal como para fines de diagnóstico o pronóstico) y su uso será familiar para aquellos requeridos para practicarlas en el contexto de la presente invención. Simplemente a modo de ejemplo, en muestras que contienen proteínas, la presencia de marcadores de células madre  
35 de cáncer puede evaluarse mediante técnicas adecuadas que utilizan anticuerpos que reaccionan con los marcadores de células madre de cáncer en cuestión. Los ejemplos de tales muestras que contienen marcadores de células madre de cáncer de proteína incluyen muestras de histología (donde la presencia de los marcadores puede visualizarse mediante técnicas de inmunocitoquímica adecuadas), o muestras derivadas de la circulación. Aquí, la presencia de células madre cancerosas circulantes (que se cree que contribuyen a la propagación del cáncer a través de la  
40 metástasis) puede evaluarse utilizando técnicas tales como la citometría de flujo.

En muestras que contienen ácidos nucleicos representativos de la expresión de marcadores de células madre de cáncer, tal expresión puede evaluarse mediante técnicas de biología de moléculas adecuadas, tal como por ejemplo mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores adecuados.

#### Ejemplo 1-Procedimientos sintéticos

45 Los compuestos de la invención pueden fabricarse de acuerdo con o de forma análoga a los siguientes Procedimientos generales y Procedimientos sintéticos de Ejemplo.

#### Procedimiento general 1 (para los compuestos A-F y L-U)

50 Se añadieron gota a gota N-metilimidazol (1,0 mmol) y una solución del fosforocloridato apropiado (0.6 mmol) en THF anhidro (2 ml) a una suspensión de 3'-desoxiadenosina (0.20 mmol), o de la 3'-desoxiadenosina sustituida, en THF anhidro (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna y TLC preparativa proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido blanco. Las cantidades de componentes empleados pueden variar y las cantidades reales se dan en los ejemplos a continuación.

#### Procedimiento general 2 (para el compuesto J)

5 Se suspendió 3'-desoxiadenosina (0.80 mmol) en  $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$  (5 ml) y se añadió gota a gota  $\text{POCl}_3$  (0.80 mmol) a  $-5^\circ\text{C}$ . Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 4 horas. Se añadió una solución de la sal de éster de aminoácido apropiada (4.0 mmol) disuelta en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (5 ml) seguido de diisopropil etil amina (8.0 mmol) a  $-78^\circ\text{C}$ . Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 horas, se añadió agua y se separaron las capas. La fase acuosa se extrajo con diclorometano y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía de columna (elución en gradiente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 100/0$  a  $93/7$ ) para dar el producto deseado en forma de una espuma blanca. Las cantidades de componentes empleados pueden variar y las cantidades reales se dan en los ejemplos a continuación.

10 Procedimiento general 3 (para compuestos G-I)

Se suspendió 3'-desoxiadenosina (0.20 mmol) en THF anhidro (5 ml) y se añadió gota a gota  $^1\text{BuMgCl}$  (solución 1.0 M en THF, 0.22 mmol) a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución del fosforocloridato apropiado (0.6 mmol) en THF anhidro (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna y TLC preparativa proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido blanco. Las cantidades de los componentes empleados pueden variar y las cantidades reales se proporcionan en los ejemplos a continuación.

Procedimiento general 4 (para el compuesto V)

20 Se añadieron cloruro de tertbutildimetilsililo (3.3 mol/eq.) e imidazol 6.6 (mol/eq) a una solución del derivado de 3'-desoxiadenosina apropiado (1 mol/eq) en DMF anhidro y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche (16-20 h). Luego se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a la mezcla y se lavó dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el solvente se eliminó al vacío. La purificación de la mezcla por cromatografía de columna proporcionó el intermedio C1. El intermedio C1 luego se disolvió en una solución acuosa THF/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA 4/1/1 (6 ml/eq) y se agitó a  $0^\circ\text{C}$  durante 4 h. La solución se neutralizó cuidadosamente con una solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y la mezcla se lavó dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el solvente se eliminó a vacío. La purificación de la mezcla por cromatografía de columna proporcionó el intermedio C2. Luego se aplicó el procedimiento general B y se proporcionó el intermedio C3. El intermedio C3 se disolvió en una solución acuosa de THF/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA 1/1/1 (6 ml/eq) a  $0^\circ\text{C}$  y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La purificación por cromatografía proporcionó los compuestos deseados en forma de sólidos blancos.

30 Procedimiento general 5 (para preparar 3'-desoxiadenosina y 3'-desoxi-2-cloroadenosina empleados en los ejemplos):

Una solución de  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  1: 9 y luego  $\alpha\text{-AIBr}$  (4.0 mol/eq) se agregaron secuencialmente a una suspensión de adenosina seca o 2-cloroadenosina en  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro y la agitación se continuó a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ). Después de 1 h, se añadió cuidadosamente una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y la solución se extrajo con EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera. La fase acuosa se extrajo con EtOAc y la fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se evaporó para dar una goma blanca. La mezcla cruda se disolvió en MeOH anhidro y se agitó durante 1 h con resina de Amberlite (2 x OH-) previamente lavada bien con MeOH anhidro. La solución se filtró y la resina se lavó cuidadosamente con metanol anhidro. La evaporación del filtrado combinado proporcionó 2',3'-deshidroadenosina o 2', 3'-deshidro-2-cloroadenosina como un sólido blanco.

40 Se añadió gota a gota una solución de  $\text{LiEt}_3\text{BH}$  (solución 1M en THF 4-4.3 mol/eq) a una solución fría ( $4^\circ\text{C}$ ) de 2',3'-deshidroadenosina o 2',3'-deshidro-2-cloroadenosina (1 mol/eq) en DMSO/THF anhidro (1/10) bajo una atmósfera de argón. La agitación se continuó a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 h y a temperatura ambiente durante la noche (16 h). La mezcla de reacción se acidificó cuidadosamente ( $\text{AcOH}$  al 5%/H<sub>2</sub>O), se purgó con  $\text{N}_2$  durante 1 h (bajo la campana de extracción) para eliminar el trietilborano pirofórico y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía para dar 3'-desoxiadenosina o 3'-desoxi-2-cloroadenosina en forma de un polvo blanco.

45 Utilizando el Procedimiento general 5: 2',3'-deshidroadenosina se preparó a partir de 10.0 g (37.4 mmol) de adenosina, 7.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (1/9), 22 mL (149.7 mmol) de  $\alpha\text{-AIBr}$  en 500 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro y 300 ml de resina Amberlite (2 x OH-) en 400 ml de metanol seco. La 2',3'-deshidroadenosina se obtuvo como un sólido blanco (9.12 g, 98%). Se preparó 3'-desoxiadenosina a partir de 9.12 g (36.6 mmol) de 2',3'-deshidroadenosina y 159 ml (159 mmol) de  $\text{LiEt}_3\text{BH}/\text{THF}$  1M, en DMSO/THF anhidro (1/10, 50 ml). La purificación por cromatografía de columna sobre sílica gel (sistema eluyente 3-18% de MeOH en DCM) dio 3'-desoxiadenosina como un polvo blanco (7.12 g, 77%).

55  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.37 (s, 1H, H8), 8.17 (s, 1H, H2), 7.29 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.89 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H1'), 5.68 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, OH-2'), 5.19 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H, OH-5'), 4.63-4.58 (m, 1H, H2'), 4.40-4.34 (m, 1H, H4'), 3.71 (ddd,  $J = 12.0, 6.0, 3.0$  Hz, 1H, H5'), 3.53-3.49 (ddd,  $J = 12.0, 6.0, 4.0$  Hz, 1H, H5'), 2.30-2.23 (m, 1H, H3'), 1.98-1.90 (m, 1H, H3').  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  156.00 (C6), 152.41 (C2), 148.82 (C4), 139.09 (C8), 119.06 (C5), 90.79 (C1'), 80.66 (C4'), 74.56 (C2'), 62.61 (C5'), 34.02 (C3').

Utilizando el Procedimiento general 5: 2',3'-deshidro-2-cloroadenosina se preparó a partir de 5.0 g (16.6 mmol) de 2-cloroadenosina, 3.0 mL de  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (1/9), 9.7 mL (66.2 mmol) de  $\alpha\text{-AIBr}$  en 38 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro y 150 ml de resina Amberlite (2 x OH-) en 200 ml de metanol anhidro. La 2',3'-deshidro-2-cloroadenosina se obtuvo como un

sólido blanco (3.03 g, 60%). Se preparó 3'-desoxi-2-cloroadenosina a partir de 2.18 g (7,68 mmol) de 2',3'-deshidro-2-cloroadenosina y 30.7 ml (30.7 mmol) de LiEt<sub>3</sub>BH/THF 1M en DMSO/THF anhidro (1/10). mL, 30 mL). La purificación por cromatografía de columna sobre sílica gel (sistema de eluyente 2-20% de MeOH en DCM) proporcionó 3'-desoxi-2-cloroadenosina en forma de un polvo blanco (1.20 g, 55%).

- 5 <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δH 8.41 (s, 1H, H8), 5.93 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H1'), 4.68-4.66 (m, 1H, H2'), 4.56-4.52 (m, 1H, H4'), 3.95 (dd, *J* = 3, 12.5 Hz, 1H, H5'), 3.70 (dd, *J* = 3, 12.5 Hz, 1H, H5'), 2.39-2.33 (m, 1H, H3'), 2.08-2.03 (m, 1H, H3') <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δC 158.14 (C6), 155.19 (C2), 151.15 (C4), 141.30 (C8), 119.56 (C5), 93.58 (C1'), 82.80 (C4'), 76.81 (C2'), 64.01 (C5'), 34.33 (C3').

Preparación de 3'-desoxi-2-fluoroadenosina:

- 10 Una solución de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1: 9; 1,4 ml) y luego α-AIBBr (4,10 ml, 28,05 mmol) se agregaron secuencialmente a una suspensión de 2-fluoroadenosina seca (2.0 g, 7.01 mmol) en CH<sub>3</sub>CN anhidro (50 ml) y se continuó la agitación a temperatura ambiente (20°C). Después de 1 h, se añadió cuidadosamente una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y la solución se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (1 x 50 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml) y la fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para dar una goma blanca. La mezcla cruda se disolvió en una mezcla de THF/H<sub>2</sub>O (4/1, 50 ml) y se agitó durante 1 h con 60 ml de resina Amberlite (2 x OH-) (previamente lavada bien con THF). La solución se filtró y la resina se lavó cuidadosamente con THF. La evaporación del filtrado combinado y la cristalización del residuo en EtOH dio 2',3'-deshidro-2-fluoroadenosina en forma de un sólido de color blanco (1.13 g, 60%).

- 20 Se añadió gota a gota una solución de LiEt<sub>3</sub>BH/THF (1M; 18.01 ml, 18.01 mmol) a una solución fría (4 °C, baño de hielo) de 2',3'-deshidro-2-fluoroadenosina (1.13 g, 4.18 mmol) DMSO/THF anhidro (1/10, 15 ml) bajo una atmósfera de argón. La agitación se continuó a 4 °C durante 1 h y a temperatura ambiente durante la noche (16 h). La mezcla de reacción se acidificó cuidadosamente (AcOH al 5%/H<sub>2</sub>O), se purgó con N<sub>2</sub> durante 1 h (bajo la campana de extracción) para eliminar el trietilborano pirofórico y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en sílica gel (3-18% de MeOH en DCM) para dar 3'-desoxi-2-fluoroadenosina en forma de un polvo blanco (7.12 g, 77%).

- 25 <sup>19</sup>F RMN (470 MHz, DMSO-*d*6): δF -52.19. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6) δH 8.34 (s, 1H, H8), 7.80 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.78 (d, *J* = 2.25 Hz, 1H, H1'), 5.68 (br s, 1H, OH-2'), 5.01 (br s, 1H, OH-5'), 4.55-4.51 (m, 1H, H2'), 4.39-4.32 (m, 1H, H4'), 3.73-3.76 (m, 1H, H5'), 3.56-3.50 (m, 1H, H5'), 2.26-2.18 (m, 1H, H3'), 1.94-1.85 (m, 1H, H3'). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, DMSO-*d*6) δC 158.51 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 202.7 Hz, C2), 157.55 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 21.2 Hz, C6), 150.11 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 20.3 Hz, C4), 139.22 (d, <sup>6</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 2.2 Hz, C8), 117.37 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 4.1 Hz, C5), 90.67 (C1'), 80.90 (C4'), 74.73 (C2'), 62.35 (C5'), 33.89 (C3').

30

Preparación de 3'-desoxi-2-metoxiadenosina:

- 35 Una solución de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1: 9; 1,4 ml) y luego α-AIBBr (4.10 ml, 28.05 mmol) se agregaron secuencialmente a una suspensión de 2-fluoroadenosina seca (2,0 g, 7,01 mmol) en CH<sub>3</sub>CN anhidro (50 ml) y se continuó la agitación a temperatura ambiente (20°C). Después de 1 h, se añadió cuidadosamente una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y la solución se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (1 x 50 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml) y la fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para dar una goma blanca. La mezcla cruda se disolvió con MeOH anhidro (50 ml) y se agitó durante 1 h con 60 ml de resina Amberlite (2 x OH-) (previamente lavada bien con MeOH anhidro). La solución se filtró y la resina se lavó cuidadosamente con THF. La evaporación del filtrado combinado y la cristalización del residuo en EtOH dio 2',3'-deshidro-2-metoxiadenosina en forma de un sólido de color blanco (1.57 g, 84%).

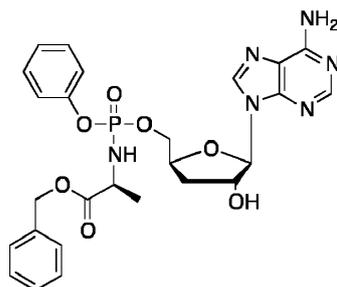
40

- 45 Se añadió gota a gota una solución de LiEt<sub>3</sub>BH (solución 1 M en THF; 8.53 ml, 8.53 mmol) a una solución fría (4 °C) de 2',3'-deshidro-2-metoxiadenosina (762 mg, 2.84 mmol) en DMSO anhidro/THF (1/10, 15 ml) bajo una atmósfera de argón. La agitación se continuó a 4 °C durante 1 h y a temperatura ambiente durante la noche (16 h). La mezcla de reacción se acidificó cuidadosamente (AcOH al 5%/H<sub>2</sub>O), se purgó con N<sub>2</sub> durante 1 h (bajo la campana de extracción) para eliminar el trietilborano pirofórico y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en sílica gel (3-17% de MeOH en DCM) para dar 3'-desoxi-2-metoxiadenosina en forma de un polvo blanco (650 mg, 81%).

- 50 <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δH 8.20 (s, 1H, H8), 5.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H1'), 4.75-4.71 (m, 1H, H2'), 4.54-4.48 (m, 1H, H4'), 3.91 (dd, *J* = 12.3, 2.5 Hz, 1H, H5'), 3.69 (dd, *J* = 12.30, 4.0 Hz, 1H, H5'), 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.43-2.35 (m, 1H, H3'), 2.08-2.02 (m, 1H, H3'). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δC 163.68 (C2), 158.12 (C6), 151.94 (C4), 139.71 (C8), 116.64 (C5), 93.36 (C1'), 82.53 (C4'), 76.59 (C2'), 64.24 (C5'), 55.29 (OCH<sub>3</sub>), 34.81 (C3').

Los clorhidratos de fósforo se prepararon mediante métodos publicados a partir de fosforodichloridatos de arilo y clorhidratos de ésteres de aminoácidos.

3'-desoxiadenosina-5'-O-[fenil(benciloxi-L-alaninil)] fosfato A



El compuesto A se preparó de acuerdo con el Procedimiento general 1 utilizando 3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.20 mmol), N-metilimidazol (80  $\mu$ L, 1.0 mmol) y fenil(benciloxi-L-alaninil)fosforocloridato (212 mg, 0.6 mmol). La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 7/93) con gradiente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (100% a 95: 5%) y TLC preparativa (1000  $\mu$ m, sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  5/95) proporcionó el compuesto del título como un sólido blanco (31 mg, 28%).

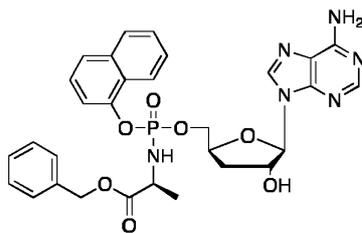
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ H 8.26 (s, 0.5H, H8), 8.24 (s, 0.5H, H8), 8.22 (s, 0.5H, H2), 8.21 (s, 0.5H, H2), 7.34-7.25 (m, 7H, Ar), 7.21-7.13 (m, 3H, Ar), 6.01 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H, H1'), 6.00 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H, H1'), 5.15-5.04 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.73-4.63 (m, 2H, H2', H4'), 4.43-4.35 (m, 1H, H5'), 4.27-4.20 (m, 1H, H5'), 4.03-3.91 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.35-2.28 (m, 1H, H3'), 2.09-2.02 (m, 1H, H3'), 1.32 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1.5 H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.28 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1.5 H,  $\text{CHCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ C 174.84 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4.5$  Hz, C=O), 174.63 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4.5$  Hz, C=O), 157.32 (C6), 157.31 (C6), 153.86 (C2), 153.84 (C2), 152.13 (C4), 152.07 (C4), 150.20 (C-Ar), 150.18 (C-Ar), 140.47 (C8), 137.26 (C-Ar), 137.19 (C-Ar), 130.76 (CH-Ar), 130.74 (CH-Ar), 129.57 (CH-Ar), 129.32 (CH-Ar), 129.31 (CH-Ar), 129.29 (CH-Ar), 129.26 (CH-Ar), 126.16 (CH-Ar), 126.14 (CH-Ar), 121.46 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4.7$  Hz, CH-Ar), 121.38 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4.7$  Hz, CH-Ar), 120.54 (C5), 120.53 (C5), 93.24 (C1'), 3.18 (C1'), 80.43 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 3.6$  Hz, C4'), 80.36 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 3.6$  Hz, C4'), 76.62 (C2'), 68.62 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.3$  Hz, C5'), 68.30 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.3$  Hz, C5'), 67.95 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.92 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 51.74 ( $\text{CHCH}_3$ ), 51.60 ( $\text{CHCH}_3$ ), 34.91 (C3'), 34.70 (C3'), 20.45 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7.0$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 20.28 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7.0$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ).

$^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ P 3.9, 3.7.

MS (ES+)  $m/z$ : Encontrado 569.2 (M + H<sup>+</sup>), 591.2 (M + Na<sup>+</sup>), 1159.4 (2M + Na<sup>+</sup>)  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_7\text{P}$  requerido: (M) 568.2.

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min,  $\lambda = 254$  nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 14.02 min. y tR 14.26 min.

Ejemplo comparativo: (2S)-bencil 2-(((2S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hidroxitetrahydrofuran-2-yl)metoxi)(naftalen-1-iloxi)fosforil)amino)propanoato B



Usando el Procedimiento general 1 anterior, N-metilimidazol (240  $\mu$ L, 3.0 mmol) y una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (naftalen-1-iloxi) fosforil) amino) propanoato (727 mg, 1.8 mmol) en THF anhidro (10 ml) se añadió gota a gota a una suspensión de 3'-desoxiadenosina (150 mg, 0.6 mmol) en THF anhidro y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 6/94) y TLC preparativa (2000  $\mu$ m, sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  5/95) proporcionó el compuesto deseado como un sólido blanco (45 mg, 12%).

MS (ES+)  $m/z$ : Encontrado 619.2 (M + H<sup>+</sup>), 641.2 (M + Na<sup>+</sup>), 1259.4 (2M + Na<sup>+</sup>)  $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_7\text{P}$  requerido: (M) 618.58.

$^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CH}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ P 4.3 (s), 4.1 (s).

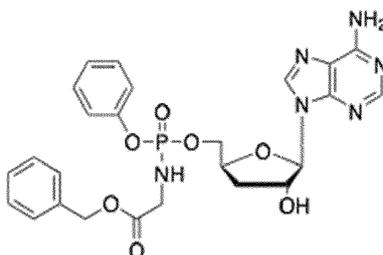
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CH}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ H 8.24 (s, 0.5H, H8), 8.22 (s, 0.5H, H8), 8.20 (s, 0.5H, H2), 8.19 (s, 0.5H, H2), 8.14-8.09 (m, 1H, Ar), 7.89-7.85 (m, 1H, Ar), 7.70-7.67 (m, 1H, Ar), 7.53-7.42 (m, 3H, Ar), 7.39-7.34 (m, 1H, Ar), 7.31-7.25 (m, 5H, Ar), 5.99 (d,  $J = 2.0$  Hz, 0.5H, H1'), 5.98 (d,  $J = 2.0$  Hz, 0.5H, H1'), 5.10-5.01 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.72-4.61 (m, 2H, H2', H4'), 4.47-4.40 (m, 1H, H5'), 4.33-4.24 (m, 1H, H5'), 4.09-3.98 (m, 1H, CH ala) 2.35-2.26 (m, 1H, H3'), 2.07-1.98 (m, 1H, H3'), 1.30-1.24 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CH}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ C 174.85 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 3.7$  Hz, C=O), 174.56 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 3.7$  Hz, C=O), 157.33 (C6), 157.31 (C6), 153.87 (C2), 153.85 (C2), 150.24 (C4), 150.23 (C4), 147.91 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7.5$  Hz, 'ipso' Nap), 147.95, (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7.5$

Hz, 'ipso' Nap), 140.56 (C8), 140.50 (C8), 137.22 (C-Ar), 137.17 (C-Ar), 136.28 (C-Ar), 129.55 (CH-Ar), 129.53 (CH-Ar), 129.30 (CH-Ar), 129.25 (CH-Ar), 128.88 (CH-Ar), 128.82 (CH-Ar), 127.91 (d,  $^2J_{C-P}$  = 6.25 Hz, C-Ar), 127.83 (d,  $^2J_{C-P}$  = 6.25 Hz, C-Ar), 127.77 (CH-Ar), 127.75 (CH-Ar), 127.49 (CH-Ar), 127.45 (CH-Ar), 126.48 (CH-Ar), 126.47 (CH-Ar), 126.02 (CH-Ar), 125.97 (CH-Ar), 122.77 (CH-Ar), 122.63 (CH-Ar), 120.58 (C5), 120.53 (C5), 116.35 (d,  $^3J_{C-P}$  = 3.75 Hz, CH-Ar), 116.15 (d,  $^3J_{C-P}$  = 3.75 Hz, CH-Ar), 93.22 (C1'), 93.20 (C1'), 80.30 (d,  $^3J_{C-P}$  = 2.75 Hz, C4'), 80.24 (d,  $^3J_{C-P}$  = 2.75 Hz, C4'), 76.51 (C2'), 76.44 (C2'), 68.87 (d,  $^2J_{C-P}$  = 5.2 Hz, C5'), 68.64 (d,  $^2J_{C-P}$  = 5.2 Hz, C5'), 67.93 (OCH<sub>2</sub>Ph), 51.82 (CH ala), 51.73 (CH ala), 35.01 (C-3'), 34.76 (C3'), 20.41 (d,  $^3J_{C-P}$  = 6.7 Hz, CH<sub>3</sub> ala), 20.22 (d,  $^3J_{C-P}$  = 6.7, CH<sub>3</sub> ala).

10 HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, 1 = 200 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 16.36 min. y tR 16.60 min.

Ejemplo comparativo: Bencil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-il)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)acetato C



15 Usando el Procedimiento general 1 anterior, se agregaron N-metilimidazol (80  $\mu$ L, 1.0 mmol) y una solución de bencil 2-((cloro (fenoxi) fosforil) amino) acetato (204 mg, 0.6 mmol) en THF anhidro (2 mL) La suspensión de 3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.20 mmoles) en THF anhidro se agitó y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (500  $\mu$ M, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto deseado como un sólido blanco (21 mg, 19%).

20 (ES+) m/z, Encontrado 555.2 (M + H<sup>+</sup>), 577.2 (M + Na<sup>+</sup>), 1131.4 (2M + Na<sup>+</sup>). C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: (M) 554.2.

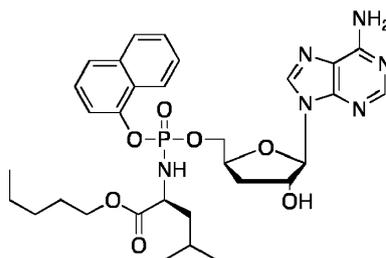
$^{31}$ P RMN (202 MHz, CH<sub>3</sub>OD)  $\delta$  5.1, 4.9.

25  $^1$ H RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.27 (s, 0.5H, H8), 8.24 (s, 0.5H, H8), 8.22 (s, 0.5H, H2), 8.21 (s, 0.5H, H2), 7.37-7.26 (m, 7H, Ph), 7.22-7.13 (m, 3H, Ph), 6.02 (d, J = 1.8 Hz, 0.5H, H1'), 6.00 (d, J = 1.8 Hz, 0.5H, H1'), 5.14-5.11 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.73-4.64 (m, 2H, H2', H4'), 4.50-4.39 (m, 1H, H5'), 4.36-4.24 (m, 1H, H5'), 3.53-3.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub> gly), 2.39-2.25 (m, 1H, H3'), 2.13-2.02 (m, 1H, H3').

30  $^{13}$ C RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OD)  $\delta$  172.30 (d,  $^3J_{C-P}$  = 5.0 Hz, C=O), 172.27 (d,  $^3J_{C-P}$  = 5.0 Hz, C=O), 157.34 (C6), 157.32 (C6), 153.88 (C2), 153.87 (C2), 152.08 (d,  $^3J_{C-P}$  = 7.5 Hz, C-Ar), 152.05 (d,  $^3J_{C-P}$  = 7.5 Hz, C-Ar), 150.20 (C4), 150.19 (C4), 140.52 (C8), 140.42 (C8), 137.15 (CAr), 130.79 (CH-Ar), 129.57 (CH-Ar), 129.55 (CH-Ar), 129.35 (CH-Ar), 129.34 (CH-Ar), 129.33 (CH-Ar), 126.22 (CH-Ar), 121.44 (d,  $J_{C-P}$  = 3.7 Hz, CH-Ar), 121.40 (d,  $J_{C-P}$  = 3.7 Hz, CH-Ar), 120.51 (C5), 120.49 (C5), 93.19, 93.14 (C1'), 80.46 (d,  $^3J_{C-P}$  = 4.60 Hz, C4'), 80.39 (d,  $^3J_{C-P}$  = 4.60, C4'), 76.66 (C2'), 68.68 (d,  $^2J_{C-P}$  = 5.42 Hz, C5'), 68.24 (d,  $^2J_{C-P}$  = 5.42 Hz, C5'), 67.95 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.93 (OCH<sub>2</sub>Ph), 43.90 (CH<sub>2</sub> gly), 43.83 (CH<sub>2</sub> gly), 34.83 (C3'), 34.54 (C3').

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, 1 = 200 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 13.63 min. y tR 13.41 min.

35 Ejemplo comparativo: (2S)-pentil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-il)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(naftalen-1-iloxi)fosforil)amino)-4-metilpentanoato D



Usando el Procedimiento General 1 anterior, N-metilimidazol (76  $\mu$ L, 0.95 mmol) y una solución de (2S)-pentil 2-((cloro (naftalen-1-iloxi) fosforil) amino)-4-metilpentanoato (250 mg, 0.6) mmol) en THF anhidro (1 ml) se añadieron gota a

gota a una suspensión de 3'-desoxiadenosina (48 mg, 19 mmol) en THF anhidro (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 5/95) y TLC preparativa (1000 μM, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4/96) proporcionó el compuesto deseado como un sólido blanco (27 mg, 22%).

5 MS (ES+) m/z: Encontrado 641.3 (M + H<sup>+</sup>), 663.3 (M + Na<sup>+</sup>), 1303.6 (2M + Na<sup>+</sup>) C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: (M) 640.3.

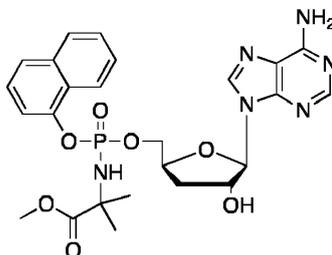
<sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CH<sub>3</sub>OD) δ 4.64, 4.37.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OD) δ 8.28 (s, 0.5H, H-8), 8.25 (s, 0.5H, H-8), 8.21 (s, 0.5H, H-2), 8.20 (s, 0.5H, H-2), 8.17-8.12 (m, 1H, Nap), 7.88-7.83 (m, 1H, Nap), 7.69-7.66 (m, 1H, Nap), 7.54-7.42 (m, 3H, Nap), 7.40-7.35 (m, 1H, Nap), 7.31-7.26 (m, 5H, Ar), 6.01 (d, J = 2.1 Hz, 0.5H, H1'), 6.00 (d, J = 2.1 Hz, 0.5H, H1'), 4.47-4.67 (m, 2H, H2', H4'), 4.55-4.44 (m, 1H, H5'), 4.43-4.31 (m, 1H, H5'), 4.00-3.87 (m, 3H, CH leu, CH<sub>2</sub> Pen), 2.44-2.30 (m, 1H, H3'), 2.14-2.04 (m, 1H, H3'), 1.66-1.39 (m, 5H, CH<sub>2</sub>CH leu, CH<sub>2</sub> Pen), 1.1.28-1.21 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> Pen), 0.86-0.81 (m, 3H, CH<sub>3</sub>Pen), 0.81-0.68 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> leu).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OD) δ 175.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C=O), 175.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C=O), 157.32 (C6), 153.87 (C2), 153.86 (C2), 150.23 (C4), 147.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.2 Hz, 'ipso' Nap), 140.55 (C8), 136.30 (C-Ar), 136.29 (C-Ar), 128.89 (CH-Ar), 128.84 (CH-Ar), 127.95 (C-Ar), 127.91 (C-Ar), 127.84 (C-Ar), 127.78 (CH-Ar), 127.76 (CH-Ar), 127.46 (CH-Ar), 126.50 (C-Ar), 126.48 (C-Ar), 126.46 (C-Ar), 126.01 (CH-Ar), 125.91 (CH-Ar), 122.80 (CH-Ar), 122.70 (CH-Ar), 120.58 (C5), 120.56 (C5), 116.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, CH-Ar), 116.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, CH-Ar), 93.31 (C1'), 93.27 (C1'), 80.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.5 Hz, C4'), 80.29 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.5 Hz, C4'), 76.54 (C2'), 76.50 (C2'), 69.07 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.5 Hz, C5'), 68.85 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.5 Hz, C5'), 66.33 (CH<sub>2</sub> Pent), 66.32 (CH<sub>2</sub> Pent), 54.81 (CH leu), 54.71 (CH leu), 44.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.6 Hz, CH<sub>2</sub> leu), 43.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.6 Hz, CH<sub>2</sub> leu), 35.15 (C3'), 34.86 (C3'), 29.32 (CH<sub>2</sub> pent), 29.30 (CH<sub>2</sub> Pent), 29.11 (CH<sub>2</sub> pent), 25.67 (CH leu), 25.45 (CH leu), 23.30 (CH<sub>2</sub> pent), 23.12 (CH<sub>3</sub> leu), 23.02 (CH<sub>3</sub> leu), 22.04 (CH<sub>3</sub> leu), 21.78 (CH<sub>3</sub> leu), 14.28 (CH<sub>3</sub> pent).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, λ = 200 nm, mostró un pico de los dos diastereoisómeros superpuestos con t<sub>R</sub> 20.84 min.

25 Ejemplo comparativo: Metil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-yl)-metoxi)(naftalen-1-iloxi)fosforil)amino)-2-metilpropanoato E



30 Usando el Procedimiento General 1 anterior, N-metilimidazol (24 μL, 3.0 mmol) y una solución de 2-((cloro (naftalen-1-iloxi) fosforil) amino)-2-metilpropanoato de metilo (612 mg, 1.8 mmol) en THF anhidro (1 ml) se añadió gota a gota a una suspensión de 3'-desoxiadenosina (150 mg, 0.6 mmol) en THF anhidro (15 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 7/93) y TLC preparativa (1000 μM, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4/96) proporcionó el compuesto deseado como un sólido blanco (20 mg, 6%).

MS (ES+) m/z: Encontrado 557.2 (M + H<sup>+</sup>), 579.2 (M + Na<sup>+</sup>), 1135.4 (2M + Na<sup>+</sup>) C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: (M) 556.51.

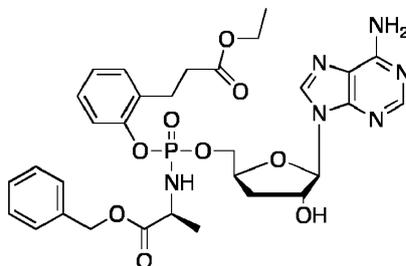
35 <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CH<sub>3</sub>OD) δ 2.73.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OD) δ 8.28 (s, 0.5H, H8), 8.25 (s, 0.5H, H8), 8.21 (s, 0.5H, H2), 8.19 (s, 0.5H, H2), 8.18-8.14 (m, 1H, Nap), 7.90-7.84 (m, 1H, Nap), 7.71-7.66 (m, 1H, Nap), 7.53-7.47 (m, 3H, Nap), 7.41-7.35 (m, 1H, Nap), 6.03 (d, J = 2.1 Hz, 0.5H, H1'), 5.99 (d, J = 2.1 Hz, 0.5H, H1'), 4.76-4.67 (m, 2H, H2', H4'), 4.52-4.44 (m, 1H, H5'), 4.42-4.33 (m, 1H, H5'), 3.65 (s, 1.5H, OCH<sub>3</sub>), 3.64 (s, 1.5H, OCH<sub>3</sub>), 2.48-2.41 (m, 0.5H, H3'), 2.37-2.30 (m, 0.5H, H3'), 2.15-2.09 (m, 0.5H, H3'), 2.08-2.02 (m, 0.5H, H3'), 1.47-1.44 (m, 6H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OD) δ 177.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, C=O), 157.53 (C6), 157.51 (C6), 153.86 (C2), 150.28 (C4), 150.25 (C4), 148.06 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, 'ipso' Nap), 148.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5, 'ipso' Nap), 140.67 (C8), 140.60 (C8), 136.28 (C-Ar), 136.27 (C-Ar), 128.82 (CH-Ar), 128.80 (CH-Ar), 127.93 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.25 Hz, C-Ar), 127.92 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.25 Hz, C-Ar), 127.71 (CH-Ar), 127.69 (CH-Ar), 127.32 (CH-Ar), 126.44 (CH-Ar), 125.84 (CH-Ar), 122.93 (CH-Ar), 120.56 (C5), 120.50 (C5), 116.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.75 Hz, CH-Ar), 116.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.75 Hz, CH-Ar), 93.25 (C1'), 80.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 8.0 Hz, C4'), 80.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 8.0 Hz, C4'), 76.57 (C2'), 76.43 (C2'), 68.99 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.5 Hz, C5'), 68.84 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.5 Hz, C5'), 53.01 (OCH<sub>3</sub>), 35.22 (C-3'), 34.90 (C3'), 27.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 27.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.0, CH<sub>3</sub>), 27.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.0, CH<sub>3</sub>), 27.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.0, CH<sub>3</sub>).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, λ = 254 nm, mostró dos picos con t<sub>R</sub> 16.51 min, t<sub>R</sub> 16.75 min.

Ejemplo comparativo: (2S)-bencil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-il)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(2-(3-etoxi-3-oxopropil)fenoxi)fosforil)amino)propanoato F



5

Usando el Procedimiento General 1 anterior, N-metilimidazol (32 μL, 4.2 mmol) y una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (2-(3-etoxi-3-oxopropil) fenoxi) fosforil) amino) propanoato (1,14 g, 2,5 mmol) en THF anhidro (2 ml) se añadieron gota a gota a una suspensión de 3'-desoxiadenosina (210 mg, 0.84 mmol) en THF anhidro (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> 0/100 a 8/92) y TLC preparativa (1000 μM, sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido blanco (123 mg, rendimiento = 22%).

10

MS (ES+) m/z: Encontrado 669.3 (M + H<sup>+</sup>), 691.3 (M + Na<sup>+</sup>), C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P requerido: (M) 668.63. <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δP 3.95, 3.65.

15

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δH 8.25 (s, 0.5H, H8), 8.21 (s, 1H, H8, H2), 8.20 (s, 0.5H, H2), 7.35-7.29 (m, 6H, Ph), 7.25-7.21 (m, 1H, Ph), 7.16-7.07 (m, 2H, Ar), 6.00 (d, J = 1.9 Hz, 0.5H, H1'), 5.98 (d, J = 1.9 Hz, 0.5H, H1'), 5.17-5.05 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.76-4.73 (m, 0.5H, H2'), 4.70-4.59 (m, 1.5H, H2', H4'), 4.45-4.34 (m, 1H, H5'), 4.30-4.22 (m, 1H, H5'), 4.08-3.96 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH ala), 2.98-2.92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.62-2.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.40-2.29 (m, 1H, H3'), 2.11-2.03 (m, 1H, H3'), 1.36 (d, J = 6.9 Hz, 1.5 H, CH<sub>3</sub> ala), 1.33 (d, J = 6.9 Hz, 1.5 H, CH<sub>3</sub> ala), 1.17 (t, J = 7.0 Hz, 1.5 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.16 (t, J = 7.0 Hz, 1.5 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

20

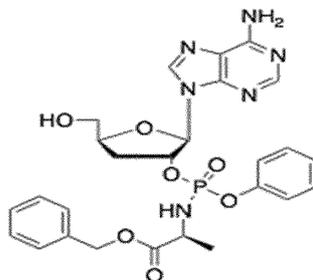
<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δC 174.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, C=O), 174.62 (C=O), 174.58 (C=O), 174.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, C=O), 157.34 (C6), 157.32 (C6), 153.86 (C2), 153.84 (C2), 150.48 (d, J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C-Ar), 150.44 (C4), 150.22 (d, J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C-Ar), 140.49 (C8), 137.29 (C-Ar), 137.21 (C-Ar), 133.09 (d, J = 7.5 Hz, C-Ar), 132.94 (d, J = 7.5 Hz, C-Ar), 131.62 (CH-Ar), 131.59 (CH-Ar), 129.58 (CH-Ar), 129.34 (CH-Ar), 129.31 (CH-Ar), 129.28 (CH-Ar), 128.70 (d, J = 5.0 Hz, CH-Ar), 128.69 (d, J = 5.0 Hz, CH-Ar), 126.18 (CH-Ar), 121.02 (d, J = 2.5 Hz, CH-Ar), 120.49 (d, J = 2.5 Hz, CH-Ar), 120.58 (C5), 93.28 (C1'), 93.24 (C1'), 80.32 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 8.7 Hz, C4'), 76.57 (C2'), 68.86 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.0 Hz, C5'), 68.53 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.0 Hz, C5'), 67.98 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.95 (OCH<sub>2</sub>Ph), 61.57 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 51.76 (CH ala), 51.65 (CH ala), 35.37 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 35.30 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 35.08 (C3'), 34.85 (C3'), 26.77 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 26.72 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.2 Hz, CH<sub>3</sub> ala), 20.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.2 Hz, CH<sub>3</sub> ala), 14.53 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

25

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, λ = 245 nm, mostró un pico con t<sub>R</sub> 15.99 min.

30

Ejemplo comparativo: (2S)-bencil 2-((((2R,3R,5S)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-5-(hidroximetil)tetrahidro-furan-3-il)oxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato G



35

Usando el Procedimiento general 3 anterior, se suspendió 3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.20 mmol) en THF anhidro (5 ml) y se añadió <sup>1</sup>BuMgCl (solución 1.0 M en THF, 0.22 ml, 0.22 mmol) a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (fenoxi) fosforil) amino) propanoato (212 mg, 0.6 mmol) en THF anhidro (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 8/92) y TLC preparativa (500 μM, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 5/95) proporcionó el compuesto deseado como un sólido blanco (6 mg, 5%).

## ES 2 742 167 T3

MS (ES+) m/z: Encontrado 569.2 (M + H<sup>+</sup>), 591.2 (M + Na<sup>+</sup>), 1159.4 (2M + Na<sup>+</sup>) C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: (M) 568.2.

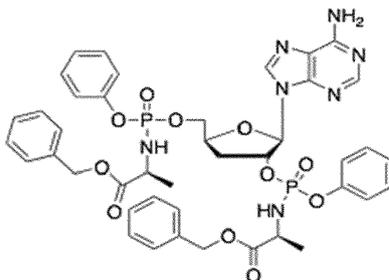
<sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δP 2.44 (s), 2.92 (s).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δH 8.41 (s, 0.5 H, H8), 8.28 (s, 0.5 H, H8), 8.19 (s, 0.5H, H2), 8.18 (s, 0.5H, H2), 7.39-7.30 (m, 4H, Ar), 7.28-7.18 (m, 4H, Ar), 7.17-7.11 (m, 1H, Ar), 7.08-7.03 (m, 1H, Ar), 6.23 (d, J = 2.0 Hz, 0.5H, H1'), 6.08 (d, J = 3.4 Hz, 0.5H, H1'), 5.52-5.43 (m, 1H, C2'), 5.19-5.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.07-4.95 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.48-4.42 (m, 1H, H4'), 4.05-3.97 (m, 1H, CH ala), 3.95-3.87 (m, 1H, H5'), 3.69-3.61 (m, 1H, H5'), 2.59-2.45 (m, 1H, H3'), 2.31-2.23 (m, 1H, H3'), 1.36-1.27 (m, 3H, CH<sub>3</sub> ala).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OH): δC 174.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.0 Hz, C=O), 174.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.0 Hz, C=O), 157.44 (C6), 153.76 (C2), 151.93 (C4), 150.06 (C-Ar), 149.93 (C-Ar), 141.38 (C8), 141.18 (C8), 137.33 (C-Ar), 137.10 (C-Ar), 130.69 (CH-Ar), 130.79 (CH-Ar), 129.61 (CH-Ar), 129.51 (CH-Ar), 129.40 (CH-Ar), 129.30 (CH-Ar), 129.23 (CH-Ar), 126.33 (CH-Ar), 126.16 (CH-Ar), 121.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.5 Hz, CH-Ar), 121.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.5 Hz, CH-Ar), 120.76 (C5), 91.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.7 Hz, C1'), 91.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.7 Hz, C1'), 82.78 (C4'), 82.28 (C4'), 81.83 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.7 Hz, C2'), 80.96 (2 x d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.7 Hz, C2'), 67.95 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.92 (OCH<sub>2</sub>Ph), 64.13 (C5'), 63.59 (C5'), 51.88 (CH ala), 51.75 (CH ala), 33.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.0 Hz, C3'), 33.59 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.0 Hz, C3'), 20.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.1 CH<sub>3</sub> ala), 20.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.1 CH<sub>3</sub> ala).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH de 90/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, l = 254 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 22.16 min. y tR 22.43 min.

Ejemplo comparativo: Bencil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-((((1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il)amino)(fenoxi)fosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato H



Usando el Procedimiento general 3 anterior, se suspendió 3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.20 mmol) en THF anhidro (5 ml) y se añadió <sup>t</sup>BuMgCl (solución 1.0 M en THF, 0.22 ml, 0.22 mmol) a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (fenoxi)fosforil) amino)propanoato (212 mg, 0.6 mmol) en THF anhidro (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un periodo de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 8/92) y TLC preparativa (500 μM, sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido blanco (19 mg, rendimiento = 11%).

MS (ES+) m/z, Encontrado 886.3 (M + H<sup>+</sup>), 1771.6 (2M + H<sup>+</sup>), 751.2 (molecule without nucleobase M). C<sub>42</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> requerido: (M+) 885.3.

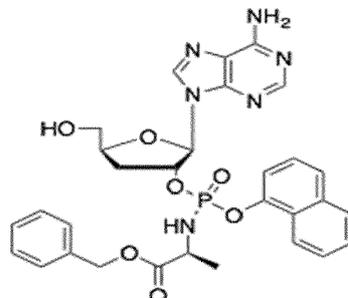
<sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δP 3.98, 3.88, 3.59, 3.12, 3.05, 2.45, 2.32.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δH 8.24-8.13 (m, 2H, H8, H2), 7.39-7.08 (m, 20H, Ph), 6.27-6.23 (m, 0.5H, H1'), 6.16-6.13 (m, 0.5H, H1'), 5.61-5.48 (m, 1H, H2'), 5.17-4.91 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.57-4.49 (m, 1H, H4'), 4.41-4.29 (m, 1H, H5'), 4.25-4.15 (m, 1H, H5'), 4.10-4.01 (m, 1H, CH ala), 3.99-3.89 (m, 1H, CH ala), 2.57-2.41 (m, 1H, H3'), 2.28-2.17 (m, 1H, H3'), 1.38-1.23 (m, 6H, CH<sub>3</sub> ala).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δC 174.88 (C=O), 174.83 (C=O), 174.79 (C=O), 174.73 (C=O), 174.61 (C=O), 174.57 (C=O), 174.53 (C=O), 157.36 (C6), 157.34 (C6), 157.32(C6), 157.29 (C6), 154.04 (C2), 154.01 (C2), 153.97 (C2), 153.94 (C2), 152.09 (C4), 152.04 (C4), 152.02 (C4), 151.97 (C4), 150.31 (C-Ar), 150.29 (C-Ar), 150.16 (C-Ar), 140.98 (C8), 140.91 (C8), 140.81 (C8), 137.31 (C-Ar), 137.28 (C-Ar), 137.22 (C-Ar), 137.09 (C-Ar), 130.86 (CH-Ar), 130.78 (CH-Ar), 130.77 (CH-Ar), 129.65 (CH-Ar), 129.61 (CH-Ar), 129.58 (CH-Ar), 129.55 (CH-Ar), 129.44 (CH-Ar), 129.42 (CH-Ar), 129.38 (CH-Ar), 129.34 (CH-Ar), 129.32 (CH-Ar), 129.30 (CH-Ar), 129.28 (CH-Ar), 129.23 (CH-Ar), 129.21 (CH-Ar), 12.42 (CH-Ar), 126.23 (CH-Ar), 126.20 (CH-Ar), 126.17 (CH-Ar), 121.65 (CH-Ar), 121.63 (CH-Ar), 121.61 (CH-Ar), 121.59 (CH-Ar), 121.52 (CH-Ar), 121.50 (CH-Ar), 121.47 (CH-Ar), 121.46 (CH-Ar), 121.40 (CH-Ar), 121.39 (CH-Ar), 121.36 (CH-Ar), 121.35 (CH-Ar), 121.30 (CH-Ar), 121.28 (CH-Ar), 121.26 (CH-Ar), 121.24 (CH-Ar), 120.61 (C5), 120.57 (C5), 120.56 (C5), 120.54 (C5), 91.56 (C1'), 91.51 (C1'), 91.45 (C1'), 91.25 (C1'), 91.20 (C1'), 81.84 (C2'), 81.82 (C2'), 81.79 (C2'), 81.27 (C2'), 81.22 (C2'), 81.18 (C2'), 80.49 (C4'), 80.43 (C4'), 80.06 (C4'), 79.99 (C4'), 68.29 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 68.25 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 68.00 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 67.96 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 67.94 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 67.90 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 67.71 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 67.67 (C5', OCH<sub>2</sub>Ph), 51.91 (CH ala), 51.74 (CH ala), 51.70 (CH ala), 51.59 (CH ala), 34.22 (C3'), 34.20 (C3'), 34.16 (C3'), 33.97 (C3'), 33.94 (C3'), 33.91 (C3'), 20.44 (CH<sub>3</sub> ala), 20.43 (CH<sub>3</sub> ala), 20.39 (CH<sub>3</sub> ala), 20.29 (CH<sub>3</sub> ala), 20.27 (CH<sub>3</sub> ala), 20.24 (CH<sub>3</sub> ala), 20.21 (CH<sub>3</sub> ala), 20.19 (CH<sub>3</sub> ala).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, l = 254 nm, mostró un pico ancho con t<sub>R</sub> 15.97 min.

Ejemplo comparativo: (2S)-bencil 2-((((2R,3R,5S)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-5-(hidroximetil)tetrahidro-furan-3-il)oxi)(naftalen-1-iloxi)fosforil)amino)propanoato I



5

Utilizando el Procedimiento general 3 anterior, se suspendió 3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.20 mmol) en THF anhidro (5 ml) y se añadió gota a gota <sup>1</sup>BuMgCl (solución 1.0 M en THF, 0.3 ml, 0.3 mmol) a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (naftalen-1-iloxi) fosforil) amino)propanoato (323 mg, 0.8 mmol) en THF anhidro (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (500 μM, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto deseado como un sólido blanco (14 mg, 11%).

10

(ES<sup>+</sup>) m/z, Encontrado 619.2 (M + H<sup>+</sup>), 641.2 (M + Na<sup>+</sup>), 1259.4 (2M + Na<sup>+</sup>). C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: (M) 618.20.

<sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δP 3.27 (s), 2.75 (s).

15

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δH 8.37 (s, 1H, H8), 8.18 (s, 1H, H8), 8.14 (s, 1H, H2), 8.13-8.11 (m, 0.5 H, Nap) 8.11 (s, 1H, H2), 7.94-7.90 (m, 0.5 H, Ar), 7.90-7.87 (m, 0.5 H, Ar), 7.86-7.82 (m, 0.5 H, Ar), 7.74-7.70 (m, 0.5 H, Ar), 7.66-7.61 (m, 0.5 H, Ar), 7.57-7.47 (m, 1.5 H, Ar), 7.46-7.37 (m, 2.5 H, Ar), 7.34-7.27 (m, 4 H, Ar), 7.25-7.17 (m, 1 H, Ar), 6.19 (d, J = 2.4 Hz, 0.5H, H1'), 6.04 (d, J = 2.4 Hz, 0.5H, H1'), 5.60-5.54 (m, 0.5H, H2'), 5.50-5.42 (m, 0.5H, H2'), 5.16-4.99 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.46-4.40 (m, 0.5H, H4'), 4.36-4.30 (m, 0.5H, H4'), 4.13-4.04 (m, 1H, CH ala), 3.90-3.83 (m, 1H, H5'), 3.64-3.56 (m, 1H, H5'), 2.61-2.54 (m, 0.5H, H3'), 2.49-2.41 (m, 0.5H, H3'), 2.35-2.27 (m, 0.5H, H3'), 2.22-2.16 (m, 0.5H, H3'), 1.35-1.24 (m, 3H, CH<sub>3</sub> ala).

20

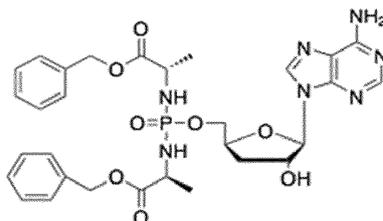
25

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OH): δC 174.52 (C=O), 174.49 (C=O), 157.27 (C6), 153.58 (C2), 149.97 (C4), 149.93 (C-4), 147.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5, 'ipso' Nap), 147.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5, 'ipso' Nap), 141.36 (C8), 141.19 (C8), 137.25 (C-Ar), 137.05 (C-Ar), 136.31 (C-Ar), 136.20 (C-Ar), 129.58 (CH-Ar), 129.48 (CH-Ar), 129.37 (CH-Ar), 129.26 (CH-Ar), 129.22 (CH-Ar), 128.88 (CH-Ar), 127.84 (CH-Ar), 127.75 (CH-Ar), 127.49 (CH-Ar), 127.44 (CH-Ar), 126.48 (CH-Ar), 126.39 (CH-Ar), 126.26 (CH-Ar), 126.05 (CH-Ar), 122.76 (CH-Ar), 122.38 (CH-Ar), 120.68 (C5), 120.61 (C5), 116.64 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.75 Hz, CH-Ar), 116.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.75, CH-Ar), 91.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, C1'), 91.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, C1'), 82.74 (C4'), 82.27 (C4'), 81.99 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.5 Hz, C2'), 81.12 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.5 Hz, C2'), 67.97 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.94 (OCH<sub>2</sub>Ph), 64.16 (C5'), 63.51 (C5'), 51.96 (CH ala), 51.89 (CH ala), 33.89 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub> ala), 33.63 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub> ala).

30

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min, l = 200 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t<sub>R</sub> 24.84 min. y t<sub>R</sub> 25.43 min.

Ejemplo comparativo: Bencil 2-[[[5-(6-amino-9H-purin-9-il)-4-hidroxioxolan-2-il]metoxi]{{1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-il]amino}}fosforil)amino]propanoato J



35

40

Utilizando el Procedimiento general 2 anterior, se suspendió 3'-desoxiadenosina (200 mg, 0.80 mmol) en (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (5 ml) y se añadió gota a gota POCl<sub>3</sub> (75 μl, 0.80 mmol) a -5 °C. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 4 horas. Se añadió una solución de (S)-1-(benciloxi)-1-oxopropan-2-amino-4-metilbencenosulfonato (1.4 g, 4.0 mmol) disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (5 ml) seguido de diisopropil etil amina (1.4 ml, 8.0 mmol) a -78 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 horas, se añadió agua y

se separaron las capas. La fase acuosa se extrajo con diclorometano y la fase orgánica se lavó con salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía de columna (elución en gradiente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 100/0$  a  $93/7$ ) para dar una espuma blanca (256 mg, 49%).

MS (ES+)  $m/z$ : Encontrado 654.2 ( $M + H^+$ ), 676.2 ( $M + \text{Na}^+$ ), 1329.5 ( $2M + \text{Na}^+$ )  $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_8\text{P}$  requerido: ( $M$ ) 653.62.

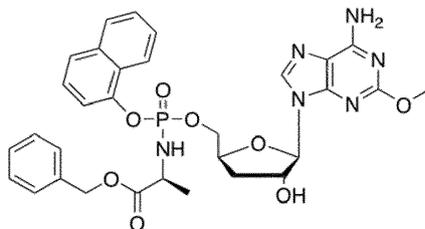
5  $^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CH}_3\text{OD}$ )  $\delta$  13.9.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CH}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.28 (s, 1H, H8), 8.22 (s, 1H, H2), 7.37-7.26 (m, 10H, Ph), 6.00 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H1'), 5.15-5.05 (m, 4H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.74-4.70 (m, 1H, H2'), 4.63-4.56 (m, 1H, H4'), 4.24-4.18 (m, 1H, H5'), 4.11-4.05 (m, 1H, H5'), 3.97-3.87 (m, 1H, CH ala), 2.35-2.27 (m, 1H, H3'), 2.07-2.01 (m, 1H, H3'), 1.34-1.27 (m, 3H,  $\text{CH}_3$  ala).

10  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CH}_3\text{OD}$ )  $\delta$  175.40 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 5.0$  Hz, C=O), 175.36 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 5.0$  Hz, C=O), 157.36 (C6), 153.91 (C2), 150.25 (C4), 140.64 (C8), 137.33 (C-Ar), 137.29 (C-Ar), 129.58 (CH-Ar), 129.57 (CH-Ar), 129.33 (CH-Ar), 129.31 (CH-Ar), 129.29 (CH-Ar), 120.55 (C5), 93.18 (C1'), 80.67 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 8.4$  Hz, C4'), 76.59 (C2'), 67.90 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.47 (d,  $^2\text{JC}_{\text{P}} = 5.2$  Hz, C5'), 51.14 (d,  $^2\text{JC}_{\text{P}} = 1.7$  Hz, CH ala), 51.11 (d,  $^2\text{JC}_{\text{P}} = 1.7$  Hz, CH ala), 35.08 (C3'), 20.77 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$  ala), 20.59 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$  ala).

15 HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  de 90/10 a 0/100 en 30 minutos, 1ml/min,  $\lambda = 254$  nm, mostró un pico con  $t_R$  13.87 min.

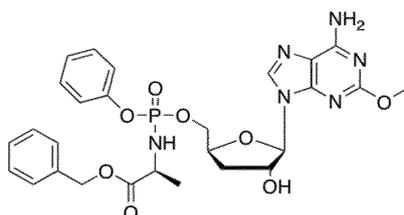
Ejemplo comparativo: (2S)-bencil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-2-metoxi-9H-purin-9-il)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(naftalen-1-iloxi)fosforilamino)propanoato K



20 Usando el Procedimiento General 1 anterior, N-metilimidazol (99  $\mu\text{L}$ , 1.24 mmol) y una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (naftalen-1-iloxi) fosforil) amino)propanoato (303 mg, 0.75 mmol) en Se añadió gota a gota THF anhidro (5 ml) a una suspensión de 2-O-metil-3'-desoxiadenosina (70 mg, 0.25 mmol) en THF anhidro (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 6/94) y TLC preparativa (sistema eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  5/95) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido blanco (96 mg, 60%).

25 MS (ES+)  $m/z$ : Encontrado 649.2 ( $M + H^+$ )  $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$  requerido: 648.21(M).  $^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  P 4.38 (s), 4.08 (s).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  H 8.14-8.11 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.5H, Ar), 8.07 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.5H, Ar), 8.05 (s, 0.5H, H8), 8.02 (s, 0.5H, H8), 7.82-7.80 (m, 1H, Ar), 7.61 (d,  $J = 7.0$  Hz, Ar), 7.47-7.44 (m, 4H, Ar), 7.35-7.29 (m, 2H, Ar), 7.24-7.22 (m, 3H, Ar), 5.88 (s, 1H, H1'), 4.71-4.68 (m, 1H, H4'), 4.65-6.60 (m, 1H, H2'), 4.42-4.40 (m, 1H, H5'), 4.30-4.27 (m, 1H, H5'), 4.08-3.98 (m, 1H, CH ala) 3.88 (s, 1.5H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.86 (s, 1.5H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.37-2.33 (m, 1H, H3'), 2.04-2.01 (m, 1H, H3'), 1.27 (d  $J = 7.0$  Hz, 1.5H,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (d  $J = 7.0$  Hz, 1.5H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CH}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  C 174.83 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 3.7$  Hz, C=O), 174.60 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 3.7$  Hz, C=O), 163.70 (C-2), 158.10 (C6), 151.95 (C4), 147.95 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 7.5$  Hz, 'ipso' Nap), 147.91 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 7.5$  Hz, 'ipso' Nap), 139.39 (C8), 139.37 (C8), 137.12, 137.17 (C-ipso  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 136.22 (C-Ar), 129.57, 129.54, 129.48, 129.32, 129.27, 129.12, 129.24 128.89, 128.83, (CH-Ar), 127.85 (d,  $^2\text{JC}_{\text{P}} = 6.25$  Hz, C-Ar), 127.86, 127.76, 127.51, 127.48, 126.49, 126.00, 125.97, 122.73, 122.63 (CH-Ar), 116.86 (C5), 116.72 (C5), 116.29 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 3.75$  Hz, CH-Ar), 116.22 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 3.75$  Hz, CH-Ar), 93.33 (C1'), 93.31 (C1'), 80.24 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 2.75$  Hz, C4'), 76.29 (C2'), 76.26 (C2'), 69.09 (d,  $^2\text{JC}_{\text{P}} = 5.0$  Hz, C5'), 68.16 (d,  $^2\text{JC}_{\text{P}} = 8.2$  Hz, C5'), 67.95 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 55.28, 55.32 ( $\text{OCH}_3$ ), 51.79 (CH ala), 51.71 (CH ala), 35.40 (C-3'), 35.12 (C3'), 20.49 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 6.7$  Hz,  $\text{CH}_3$  ala), 20.35 (d,  $^3\text{JC}_{\text{P}} = 6.7$ ,  $\text{CH}_3$  ala). HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  de 100/10 a 0/100 en 30 minutos,  $F = 1$  ml/min,  $\lambda = 280$  nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con  $t_R$  16.22 min. y  $t_R$  16.48 min.

40 Ejemplo comparativo: (2S)-bencil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-2-metoxi-9H-purin-9-il)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(naftalen-1-iloxi)fosforilamino)propanoato L

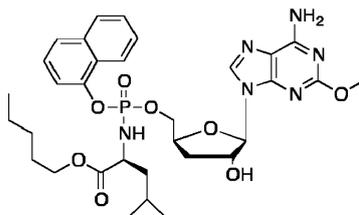


Usando el Procedimiento general 1 anterior, N-metilimidazol (99  $\mu$ L, 1.24 mmol) y una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (fenoxi) fosforil) amino) propanoato (264 mg, 0.75 mmol) en THF anhidro (2 Se añadieron gota a gota a una suspensión de 2-O-metil-3'-desoxiadenosina (70 mg, 0.25 mmol) en THF anhidro y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) produjo el compuesto deseado en forma de un sólido blanco (13 mg, 10%).

(ES+) m/z, Encontrado 599.2 (M + H<sup>+</sup>), C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>P requerido: 598.19 (M).

<sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  3.97, 3.64. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.06 (s, 0.5H, H8), 8.04 (s, 0.5H, H8), 7.33-7.28 (m, 7H, Ph), 7.20-7.14 (m, 3H, Ph), 5.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 0.5H, H1'), 5.90 (d, *J* = 1.5 Hz, 0.5H, H1'), 5.14-5.04 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.78-4.76 (m, 0.5H, H4'), 4.74-4.72 (m, 0.5H, H4'), 4.63-4.59 (m, 1H, H2'), 4.10-4.34 (m, 1H, H5'a), 4.25-4.20 (m, 1H, H5'b), 3.94, 3.95 (OCH<sub>3</sub>), 3.99-3.90 (m, 1H, CH ala), 2.40-2.37 (m, 1H, H3'), 2.07-2.04 (m, 1H, H3'), 1.31 (d *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.26 (d, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  174.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, C=O), 174.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, C=O), 163.80 (C-2), 158.16, 158.13 (C6), 152.15 (C4), 152.05 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.8 Hz, *C-ipso* Ph), 152.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.8 Hz, *C-ipso* Ph), 139.39 (C8), 137.30, 137.21 (*C-ipso* CH<sub>2</sub>Ph), 130.72, 129.57, 129.31, 129.27, 126.122 (CH-Ar), 121.42 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 4.5 Hz, CH-Ar), 121.37 (d, *J*<sub>C-P</sub> = 4.5 Hz, CH-Ar), 116.72 (C5), 116.69 (C5), 93.33, 93.24 (C1'), 80.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 8.87, C4'), 80.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 8.87, C4'), 76.35 (C2'), 68.78 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.0 Hz, C5'), 68.35 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.0 Hz, C5'), 67.94 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.92 (OCH<sub>2</sub>Ph), 55.25, 55.28 (OCH<sub>3</sub>), 51.69, 51.57 (CH ala), 35.23 (C3'), 34.96 (C3'), 20.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.7, CH<sub>3</sub> ala), 20.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.7, CH<sub>3</sub> ala). HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, F = 1 ml/min,  $\lambda$  = 280 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 14.22 min. y tR 14.51 min.

Ejemplo comparativo: 2-O-metil-3'-desoxiadenosin-5'-O-[1-naftil(1-pentiloxi-L-leucinil)] fosfato M



El compuesto M se preparó de acuerdo con el procedimiento general 1 utilizando 2-O-metil-3'-desoxiadenosina (70 mg, 0.25 mmol), N-metilimidazol (99  $\mu$ L, 1.24 mmol) y naftil (pentiloxi-L-leucinil)fosforocloridato (330 mg, 0.75 mmol). La purificación por cromatografía de columna (gradiente del sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (2000  $\mu$ M, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 7/93) produjo el compuesto del título en forma de un sólido blanco (50 mg, 30%).

<sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  P 4.53, 4.28.

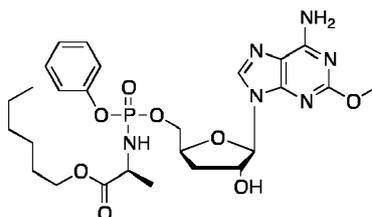
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  H 8.04-7.96 (m, 1H, H8), 7.77-7.71 (m, 1H, Nap), 7.58-7.53 (m, 1H, Nap), 7.45-7.17 (m, 5H, Nap), 5.83-5.75 (m, 1H, H1'), 4.64-4.51 (m, 2H, H2', H4'), 4.40-4.16 (m, 2H, H5'), 3.88-3.75 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.38-2.24 (m, 1H, H3'), 2.00-1.91 (m, 1H, H3'), 1.53-1.05 (m, 11H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.77-0.55 (m, 9H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  C 175.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C=O), 174.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C=O), 163.76 (C2), 158.14 (C6), 151.03 (C4), 147.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.2, 'ipso' Nap), 138.96 (C8), 136.30 (C-Ar), 136.28 (C-Ar), 136.22 (C-Ar), 128.93 (CH-Ar), 128.88 (CH-Ar), 128.81 (CH-Ar), 128.48 (CH-Ar), 127.77 (CH-Ar), 127.73 (CH-Ar), 127.44 (CH-Ar), 127.42 (CH-Ar), 127.06 (CH-Ar), 126.86 (CH-Ar), 126.45 (CH-Ar), 126.44 (CH-Ar), 126.31 (CH-Ar), 125.98 (CH-Ar), 125.88 (CH-Ar), 123.83 (CH-Ar), 123.43 (CH-Ar), 123.24 (CH-Ar), 122.81 (CH-Ar), 122.77 (CH-Ar), 122.69 (CH-Ar), 116.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, CH-Ar), 116.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, CH-Ar), 115.71 (C5), 93.42 (C1'), 93.32 (C1'), 80.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.3 Hz, C4'), 80.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.3 Hz, C4'), 76.29 (C2'), 76.27 (C2'), 69.22 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.2 Hz, C5'), 69.028 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.2 Hz, C5'), 66.31 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 66.30 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 55.29 (OCH<sub>3</sub>), 55.24 (OCH<sub>3</sub>), 54.79 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 54.68 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 44.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.25 Hz, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.25 Hz, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 35.49 (C3'), 35.17 (C3'), 29.31 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 29.11 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 25.67 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.44 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.30 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 23.10 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.00 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.94 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.81 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.27 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>).

(ES+) m/z, Encontrado 671.3 (M + H<sup>+</sup>), C<sub>32</sub>H<sub>43</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>P requerido: 670.69 (M).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1 ml/min,  $\lambda$  = 254 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 20.83 min. y tR 20.93 min.

Ejemplo comparativo: 2-O-metil-3'-desoxiadenosin-5'-O-[fenil(1-hexiloxi-L-alaninil)] fosfato N



El compuesto N se preparó de acuerdo con el procedimiento general 1 utilizando 2-O-metil-3'-desoxiadenosina (70 mg, 0.25 mmol), N-metilimidazol (99  $\mu$ L, 1.24 mmol) y fenil(hexiloxi-L-alaninil)fosforocloridato (261 mg, 0.75 mmol). La purificación por cromatografía de columna (gradiente del sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 6/94) y TLC preparativa (1000  $\mu$ M, sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  7/93) produjo el compuesto del título en forma de un sólido blanco (26 mg, 18%).

$^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ P 3.87, 3.65.

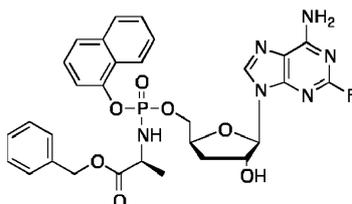
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ H 8.08 (s, 0.5H, H8), 8.07 (s, 0.5H, H8), 7.36-7.29 (m, 2H, Ph), 7.24-7.14 (m, 3H, Ph), 5.94 (d,  $J = 2.0$  Hz, 0.5H, H1'), 5.92 (d,  $J = 2.0$  Hz, 0.5H, H1'), 4.81-4.76 (m, 1H, H2'), 4.71-4.62 (m, 1H, H4'), 4.48-4.43 (m, 0.5H, H5'), 4.42-4.36 (m, 0.5H, H5'), 4.33-4.25 (m, 1H, H5'), 4.10-3.83 (m, 6H,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.48-2.40 (m, 1H, H3'), 2.13-2.07 (m, 1H, H3'), 1.61-1.51 (m, 2H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 1.33-1.24 (m, 9H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.89 (m, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ C 175.13 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4.3$  Hz, C=O), 174.94 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4.3$  Hz, C=O), 163.80 (C2), 163.78 (C2), 158.17 (C6), 158.15 (C6), 152.17 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 6.3$  Hz, C-Ar), 152.15 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 6.3$  Hz, C-Ar), 152.03 (C4), 151.99 (C4), 139.42 (C8), 139.39 (C8), 130.75 (CH-Ar), 130.74 (CH-Ar), 126.13 (CH-Ar), 121.43 (CH-Ar), 121.41 (CH-Ar), 121.39 (CH-Ar), 121.37 (CH-Ar), 116.74 (C5), 116.69 (C5), 93.40 (C1'), 93.27 (C1'), 80.30 (C4'), 80.23 (C4'), 76.40 (C2'), 68.85 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.2$  Hz, C5'), 68.42 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.2$  Hz, C5'), 66.43 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 55.30 ( $\text{OCH}_3$ ), 55.26 ( $\text{OCH}_3$ ), 51.64 ( $\text{CHCH}_3$ ), 51.54 ( $\text{CHCH}_3$ ), 35.30 (C3'), 35.04 (C3'), 32.58 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 29.67 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 29.64 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 26.61 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 23.59 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 20.56 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6.4$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 20.41 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6.4$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 14.36 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ).

(ES+)  $m/z$ , Encontrado 593.3 (M + H<sup>+</sup>),  $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$  requerido: 592.58 (M).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1 ml/min,  $\lambda = 254$  nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con  $t_R$  17.02 min. y  $t_R$  17.23 min.

Ejemplo comparativo: 2-Fluoro-3'-desoxiadenosin-5'-O-[1-naftil(benciloxi-L-alaninil)] fosfato O



El compuesto O se preparó de acuerdo con el procedimiento general 1 utilizando 2-fluoro-3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.18 mmol), N-metilimidazol (74  $\mu$ L, 0.93 mmol) y fenil(benciloxi-L-alaninil)fosforocloridato (196 mg), 0.56 mmol). La purificación por cromatografía de columna (gradiente de sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 6/94) y TLC preparativa (500  $\mu$ M, sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  5/95) produjo el compuesto del título en forma de un sólido blanco (5 mg, 4%).

$^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ P 4.33, 4.08.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ H 8.17 (s, 0.5H, H8), 8.14 (s, 0.5H, H8), 8.14-8.09 (m, 1H, Ar), 7.89-7.85 (m, 1H, Ar), 7.70-7.66 (m, 1H, Ar), 7.54-7.42 (m, 4H, Ar), 7.40-7.24 (m, 5H, Ar), 5.89 (d,  $J = 2.3$  Hz, 0.5H, H1'), 5.88 (d,  $J = 2.3$  Hz, 0.5H, H1'), 5.08-5.01 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.70-4.60 (m, 2H, H2', C4'), 4.46-4.39 (m, 1H, C5'), 4.32-4.24 (m, 1H, C5'), 4.09-3.97 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.36-2.25 (m, 1H, H3'), 2.06-1.98 (m, 1H, H3'), 1.32-1.25 (m, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ C 175.54 (CO), 175.22 (CO), 161.02 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 207.3$  Hz, C2), 160.89 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 207.3$  Hz, C2), 158.45 (d,  $^3J_{\text{C-F}} = 18.2$  Hz, C6), 158.23 (d,  $^3J_{\text{C-F}} = 18.2$  Hz, C6), 150.63 (d,  $^3J_{\text{C-F}} = 18.4$  Hz, C4), 140.67 (C8), 136.26 (C-Ar), 131.62, 131.54, 129.56 (CH-Ar), 129.52 (CH-Ar), 129.37 (CH-Ar), 129.31 (CH-Ar), 129.26 (CH-Ar), 128.87 (CH-Ar), 128.81 (CH-Ar), 128.29 (CH-Ar), 128.02 (CH-Ar), 127.79 (CH-Ar), 127.76 (CH-Ar), 127.51 (CH-Ar), 127.49 (CH-Ar), 127.47 (CH-Ar), 126.47 (CH-Ar), 126.33 (C-Ar), 126.27 (C-Ar), 125.97 (CH-Ar), 122.78 (CH-Ar), 122.74 (CH-Ar), 122.64 (CH-Ar), 122.62 (CH-Ar), 116.35 (d,  $^4J_{\text{C-F}} = 3.0$  Hz, C5), 116.15 (d,  $^4J_{\text{C-F}} = 3.0$  Hz, C5), 93.25 (C1'), 93.20 (C1'), 80.41 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7.5$  Hz, C4'), 80.33 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7.5$  Hz, C4'), 76.43 (C2'), 76.35 (C2'), 68.84 (d,  $^2J_{\text{C-P}}$ ).

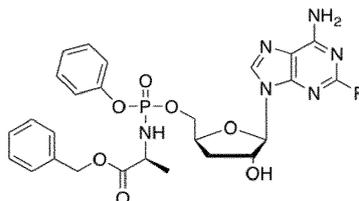
$\rho = 5.5$  Hz, C5'), 68.45 (d,  $^2J_{C-P} = 5.5$  Hz, C5'), 67.92 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.92 (OCH<sub>2</sub>Ph), 51.75 (CHCH<sub>3</sub>), 51.52 (CHCH<sub>3</sub>), 34.97 (C3'), 34.74 (C3'), 20.42 (d,  $^3J_{C-P} = 6.7$  Hz, CHCH<sub>3</sub>), 20.20 (d,  $^3J_{C-P} = 6.7$  Hz, CHCH<sub>3</sub>).

$^{19}F$  RMN (470 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta F$  -53.14, -53.22.

(ES+) m/z, Encontrado 637.2 (M + H<sup>+</sup>), C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: 636.57 (M).

- 5 HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1 ml/min, l = 254 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 17.09 min. y tR 17.34 min.

Ejemplo comparativo: (2S)-bencil 2-(((2S,4R,5R)-5-(6-amino-2-fluoro-9H-purin-9-il)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato P

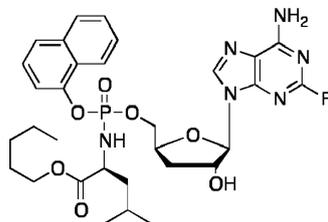


- 10 Usando el Procedimiento General 1 anterior, N-metilimidazol (74  $\mu$ L, 0.93 mmol) y una solución de (2S)-bencil 2-((cloro (fenoxi) fosforil) amino) propanoato (196 mg, 0.56 mmol) en THF anhidro (2 Se añadieron gota a gota a una suspensión de 2-fluoro-3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.18 mmol) en THF anhidro (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido blanco (5 mg, 7%).

- 15 (ES+) m/z, Encontrado 587.1 (M + H<sup>+</sup>), C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: 586.17 (M).  $^{19}F$  RMN (470 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta F$  -53.17, -53.23.  $^{31}P$  RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta P$  3.95 (s), 3.67 (s).  $^1H$  RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta H$  8.19 (s, 0.5H, H8), 8.16 (s, 0.5H, H8), 7.36-7.27 (m, 7H, Ar), 7.22-7.13 (m, 3H, Ar), 5.91 (d, J = 1.5 Hz, 0.5H, H1'), 5.89 (d, J = 1.7 Hz, 0.5H, H1'), 5.15-5.06 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.73-4.58 (m, 2H, H2', H4'), 4.42-4.34 (m, 1H, H5'), 4.02-3.90 (m, 1H, H5'), 3.27-3.24 (m, 1H, H3'), 2.08-2.00 (m, 1H, H3'), 1.33 (d, J = 7.1 Hz, 1.5H, CH<sub>3</sub> ala), 1.29 (d, J = 7.1 Hz, 1.5H, CH<sub>3</sub>ala).  $^{13}C$  RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta C$  175.85 (d,  $^3J_{C-P} = 3.7$  Hz, C=O), 174.63 (d,  $^3J_{C-P} = 5.0$  Hz, C=O), 160.58 (d,  $^1J_{C-F} = 207.5$  Hz, C2), 160.53 (d,  $^1J_{C-F} = 207.5$  Hz, C2), 159.06 (d,  $^3J_{C-F} = 18.7$  Hz, C6), 159.05 (d,  $^3J_{C-F} = 17.5$  Hz, C6), 152.11 (d,  $^2J_{C-P} = 8.75$  Hz, CAr), 152.08 (d,  $^2J_{C-P} = 8.7$  Hz, C-Ar), 151.58 (d,  $^3J_{C-F} = 19.7$  Hz, C4), 151.56 (d,  $^3J_{C-F} = 19.5$  Hz, C4), 140.63 (C8), 137.28 (C-Ar), 137.21 (C-Ar), 130.78 (CH-Ar), 130.75 (CH-Ar), 129.58 (CH-Ar), 129.34 (CH-Ar), 129.32 (CH-Ar), 129.28 (CH-Ar), 128.3 (CH-Ar), 128.02 (CH-Ar), 121.16 (CH-Ar), 121.18 (CH-Ar), 121.47 (CH-Ar), 121.51 (CH-Ar), 121.42 (CH-Ar), 121.39 (CH-Ar), 121.36 (CH-Ar), 118.75 (d,  $^4J_{C-F} = 3.7$  Hz, C5), 118.72 (d,  $^4J_{C-F} = 3.7$  Hz, C5), 93.25 (C1'), 93.18 (C1'), 80.48 (d,  $^3J_{C-P} = 8.3$  Hz, C4'), 80.46 (d,  $^3J_{C-P} = 8.1$  Hz, C4'), 76.51 (C2'), 76.49 (C2'), 68.54 (d,  $^2J_{C-P} = 5.2$  Hz, C5'), 68.18 (d,  $^2J_{C-P} = 5.6$  Hz, C5'), 67.94 (CH<sub>2</sub> Bn), 67.91 (CH<sub>2</sub> Bn), 51.71 (CH ala), 51.56 (CH ala), 34.85 (C3'), 34.64 (C3'), 20.42 (d,  $^3J_{C-P} = 7.1$  Hz, CH<sub>3</sub> ala), 20.25 (d,  $^3J_{C-P} = 7.5$  Hz, CH<sub>3</sub> ala).

- 25 HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1 ml/min, l = 280 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 14.98 min. y tR 15.12 min.

Ejemplo comparativo: 2-Fluoro-3'-desoxiadenosin-5'-O-[1-naftil(1-pentiloxi-L-leucinil)] fosfato Q



- 35 El Compuesto Q se preparó de acuerdo con el procedimiento general 1 usando 2-Fluoro-3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.18 mmol), N-metilimidazol (74  $\mu$ L, 0.93 mmol) y naftil (pentiloxi-L-leucinil)fosforocloridato (246 mg, 0.56 mmol). La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (1000  $\mu$ m, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto del título como un sólido blanco (65 mg, 53%).

$^{31}P$  RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 4.60, 4.35.

- 40  $^1H$  RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta H$  8.23 (s, 0.5H, H8), 8.20 (s, 0.5H, H8), 8.18-8.12 (m, 1H, Ar), 7.92-7.86 (m, 1H, Ar), 7.73-7.68 (m, 1H, Ar), 7.57-7.46 (m, 3H, Ar), 7.42-7.36 (m, 1H, Ar), 5.93-5.91 (m, 1H, H1'), 4.74-4.62 (m, 2H, H2', H4'), 4.55-4.50 (m, 0.5H, H5'), 4.49-4.44 (m, 0.5H, H5'), 4.43-4.37 (m, 0.5H, H5'), 4.36-4.31 (m, 0.5H, H5'), 4.02-3.86 (m,

3H, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, 2.43-2.29 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 2.12-2.04 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 1.67-1.20 (m, 11H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89-0.67 (m, 9H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

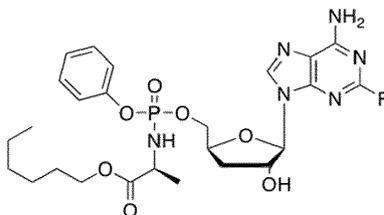
<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δC 175.03 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C=O), 174.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.5 Hz, C=O), 161.45 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 205.5 Hz, C2), 160.39 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 205.5 Hz, C2), 158.33 (C6), 151.60 (C4), 147.92 (C-Ar), 140.69 (C8), 136.30 (C-Ar), 128.88 (CH-Ar), 128.83 (CH-Ar), 127.80 (CH-Ar), 127.76 (CH-Ar), 127.49 (CH-Ar), 127.46 (CH-Ar), 126.48 (CH-Ar), 126.45 (CH-Ar), 126.02 (CH-Ar), 125.91 (CH-Ar), 123.03 (C-Ar), 122.81 (CH-Ar), 122.69 (CH-Ar), 116.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.9 Hz, CH-Ar), 116.28 (C5), 116.26 (C5), 115.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 2.9 Hz, CH-Ar), 93.29 (C1'), 93.23 (C1'), 80.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.0 Hz, C4'), 80.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.0 Hz, C4'), 76.45 (C2'), 76.41 (C2'), 68.99 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.4 Hz, C5'), 68.78 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.4 Hz, C5'), 66.31 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 66.29 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 54.78 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 54.66 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 44.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.25 Hz, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 43.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.3 Hz, CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 35.09 (C3'), 34.79 (C3'), 29.31 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 29.12 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 25.65 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.41 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.33 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 23.11 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.00 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.95 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.68 (CHCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.29 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F RMN (470 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δF -53.15, -53.20.

15 (ES+) m/z, Encontrado 659.3 (M + H<sup>+</sup>), C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: 658.66 (M).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1 ml/min, λ = 254 nm, mostró un pico de los diastereoisómeros superpuestos con t<sub>R</sub> 21.95 min.

Ejemplo comparativo: (2S)-hexil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-2-fluoro-9H-purin-9-yl)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato R



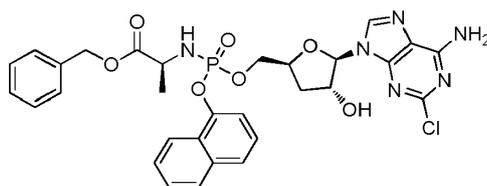
20 Usando el Procedimiento General 1 anterior, N-metilimidazol (74 μL, 0.93 mmol) y una solución de (2S)-hexil 2-((cloro (fenoxi) fosforil) amino) propanoato (196 mg, 0.56 mmol) en THF anhidro (2 ml) se añadieron gota a gota a una suspensión de 2-fluoro-3'-desoxiadenosina (50 mg, 0.18 mmol) en THF anhidro (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto deseado en forma de un sólido blanco (5 mg, 7%).

25 (ES+) m/z, Encontrado 587.1 (M + H<sup>+</sup>), C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: 586.17 (M). <sup>19</sup>F RMN (470 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δF -53.15, -53.20. <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 3.91 (s), 3.73 (s). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δH 8.21 (s, 0.5H, H8), 8.20 (s, 0.5H, H8), 7.37-7.29 (m, 7H, Ar), 7.26-7.13 (m, 3H, Ar), 5.94-5.91 (m, 1H, H1'), 4.76-4.64 (m, 2H, H2', H4'), 4.49-4.44 (m, 0.5H, H5'), 4.43-4.37 (m, 0.5H, H5'), 4.33-4.26 (m, 1H, H5'), 4.11-3.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Hex), 3.97-3.83 (m, 1H, CH ala), 2.41-2.32 (m, 1H, H3'), 2.13-2.06 (m, 1H, H3'), 1.62-1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Hex), 1.37-1.23 (m, 9H, CH<sub>3</sub> ala, CH<sub>2</sub> Hex), 0.92-0.85 (m, 3H, CH<sub>3</sub> Hex).

30 <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δC 175.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, C=O), 174.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.0 Hz, C=O), 160.59 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 207.5 Hz, C2), 160.56 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 207.5 Hz, C2), 159.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 21.2 Hz, C6), 159.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 20.0 Hz, C6), 152.16 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, C-Ar), 152.14 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6.3 Hz, C-Ar), 151.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 20.0 Hz, C4), 151.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 20.0 Hz, C4), 140.70 (d, <sup>5</sup>J<sub>C-F</sub> = 2.5 Hz, C8), 140.68 (d, <sup>5</sup>J<sub>C-F</sub> = 2.5 Hz, C8), 130.77 (CH-Ar), 130.74 (CH-Ar), 126.16 (CH-Ar), 126.24 (CH-Ar), 121.48 (CH-Ar), 121.44 (CH-Ar), 121.41 (CH-Ar), 121.37 (CH-Ar), 118.80 (d, <sup>4</sup>J<sub>C-F</sub> = 3.7 Hz, C5), 118.77 (d, <sup>4</sup>J<sub>C-F</sub> = 3.7 Hz, C5), 93.37 (C1'), 93.25 (C1'), 80.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz, C4'), 80.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.1 Hz, C4'), 76.52 (C2'), 76.49 (C2'), 68.69 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.4 Hz, C5'), 68.30 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 4.9 Hz, C5'), 66.46 (CH<sub>2</sub> Hex), 51.68 (CH ala), 51.57 (CH ala), 35.02 (C3'), 34.80 (C3'), 32.58 (CH<sub>2</sub> Hex), 29.65 (CH<sub>2</sub> Hex), 26.61 (CH<sub>2</sub> Hex), 23.59 (CH<sub>2</sub> Hex), 20.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub> ala), 20.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub> ala), 14.35 (CH<sub>3</sub> Hex).

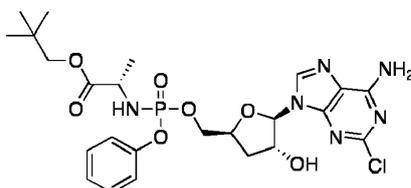
HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, 1 ml/min, λ = 280 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t<sub>R</sub> 17.83 min. y t<sub>R</sub> 18.02 min.

45 Ejemplo comparativo: (2R)-bencil 2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-2-cloro-9H-purin-9-yl)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(naftalen-1-iloxi)fosforilamino)propanoato S



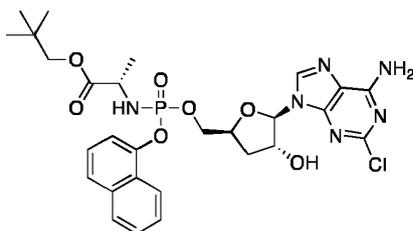
- A una solución en agitación de 2-cloro-3'-desoxiadenosina (100 mg, 1,0 mol/eq.) en 10 ml de THF anhidro, se añadieron gota a gota 424 mg de (2S)-bencil 2- (cloro (naftalen-1-iloxi) fosforilamino)propanoato (3.0 eq/mol) disueltos en 10 ml de THF anhidro. A esa mezcla de reacción, se añadieron gota a gota 0.14 ml de NMI (5 mol/eq.) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 88 h. El solvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de columna con un gradiente de eluyente (CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 5/95) para dar un producto deseado como un sólido de color amarillo. (7 mg, rendimiento = 3%). MS (ES+) m/z: Encontrado 653 (M + H<sup>+</sup>), 675 (M + Na<sup>+</sup>) C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: 652.16 (M); <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δP 4.39 (s), 4.12 (s); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δH 8.10 (s, 0.5 H, H8), 8.07 (s, 0.5 H, H8), 8.02-7.97 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph y Naph), 7.43-7.14 (m, 9H, CH<sub>2</sub>Ph y Naph), 5.80-5.81 (m, 1H, H1'), 4.89-4.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) 4.49-4.53 (m, 2H, H4'y H2'), 4.30-4.35 (m, 1H, H5'), 4.15-4.21 (m, 1H, H5'), 3.87-3.95 (m, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 2.12-2.23 (m, 1H, H3'), 1.86-1.93 (m, 1H H3'), 1.14-1.17 (m, 3H, CHCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δC 174.85 (d J<sub>CP</sub> = 4.0 Hz, C=O), 174.55 (d J<sub>CP</sub> = 4.3 Hz, C=O), 158.07, 158.04 (C6), 155.31, 155.28 (C2), 151.34, 151.31 (C4), 149.69 (C-Ar), 147.96 (d <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 7.25 Hz, C-*ipso* Naph), 147.90 (d <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 7.0 Hz, C-*ipso* Naph), 140.70 (C8), 137.21, 137.16 (C-*ipso* CH<sub>2</sub>Ph), 136.26 (C-Ar), 130.92, 130.80, 129.56, 129.53, 129.31, 129.27, 129.25, 128.88, 128.81 (CH-Ar), 127.78 (d J<sub>CP</sub> = 4.7 Hz, CH-Ar), 127.50 (d J<sub>CP</sub> = 6.2 Hz, CH-Ar), 126.48, 126.02, 125.97 (CH-Ar), 119.46, 119.42 (C5), 116.33 (d, J<sub>CP</sub> = 3.0, CH-Ar), 116.16 (d, J<sub>CP</sub> = 3.4, CH-Ar), 93.30, 93.27 (C1'), 80.56 (d J = 8.3 Hz, C4'), 80.51 (d J = 8.4 Hz, C4'), 76.61, 76.54 (C2'), 68.74 (d J<sub>CP</sub> = 5.3 Hz, C5'), 68.54 (d J<sub>CP</sub> = 5.1 Hz, C5'), 67.93, 67.90 (CH<sub>2</sub>Ph), 51.81, 51.70 (CHCH<sub>3</sub>), 34.79, 34.53 (C3'), 20.42 (d J<sub>CP</sub> = 6.5 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 20.23 (d J<sub>CP</sub> = 7.7 Hz, CHCH<sub>3</sub>);
- HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 90/10 a 0/100 en 30 minutos, F = 1ml/min, 1 = 254 nm, tR 18.03 min.

Ejemplo comparativo: 2-Cloro-3'-desoxiadenosin 5'-O-[1-fenil (2,2-dimetilpropoxi-L-alanina)] fosfato T



- El compuesto T se preparó de acuerdo con el procedimiento general 1 utilizando 2-cloro-3'-desoxiadenosina (350 mg, 1,25 mmol), N-metilimidazol (490 μL, 6,15 mmol) y fenil(2,2-dimetilpropoxi-L-alaninil) fosforocloridato (1231 mg, 3,69 mmol). La purificación por cromatografía de columna (sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 5/95) y TLC preparativa (1000 μm, sistema eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4/96) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido blanco (181 mg, 25%).
- <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δP 3.93, 3.72.
- <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δH 8.12 (s, 0.5 H, H8), 8.10 (s, 0.5 H, H8), 7.19-7.23 (m, 2 H, Ph), 7.03-7.12 (m, 3 H, Ph), 5.84 (d J = 2, 0.5 H, H1'), 5.83 (d J = 2, 0.5 H, H1'), 4.54-4.60 (m, 2 H, H4'y H2'), 4.34-4.38 (m, 0.5 H, H5'), 4.27-4.31 (m, 0.5 H, H5'), 4.16-4.23 (m, 1 H, H5'), 3.80-3.90 (m, 1 H, CHCH<sub>3</sub>), 3.57-3.73 (m, 2 H OCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.18-2.28 (m, 1 H, H3'), 1.94-1.99 (m, 1 H, H3'), 1.20-1.24 (m, 3 H, CHCH<sub>3</sub>), 0.81 (s, 4.5 H OCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.79 (s, 4.5 H OCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).
- <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δC 175.09 (d <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 4.75 Hz, C=O), 174.90 (d <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 5.37 Hz, C=O), 158.10, (C6), 155.31, 155.28 (C2), 152.14 (d <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 6.37 Hz, C-*ipso* Ph), 152.13 (d <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 6.25 Hz, C-*ipso*Ph), 151.33, 151.30 (C4), 140.87, 140.76 (C8), 130.78, 130.77 (CH-Ar), 126.17, 126.42 (CH-Ar), 121.45 (d <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 11.75 Hz, CH-Ar), 121.41 (d <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 11.75 Hz, CH-Ar), 119.52, 119.48 (C5), 93.49, 93.35 (C1'), 80.67 (d J = 8.62 Hz, C4'), 80.65 (d J = 8.25 Hz, C4'), 76.70, 76.67 (C2'), 75.43, (OCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 68.68 (d <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 5.12 Hz, C5'), 68.42 (d <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 5.12 Hz, C5'), 51.77, 51.60 (CHCH<sub>3</sub>), 34.94, 34.67 (C3'), 32.36, 32.32 (OCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.78, 26.76 (OCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.83 (d J<sub>CP</sub> = 6.25 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 20.61 (d J<sub>CP</sub> = 7.12 Hz, CHCH<sub>3</sub>).
- MS (ES+) m/z: Encontrado 583 (M + H<sup>+</sup>), 605 (M + Na<sup>+</sup>) C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: 582.18 (M).
- HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 90/10 a 0/100 en 30 minutos, F = 1ml/min, 1 = 254 nm, tR 16.37, 16.55 min.

Ejemplo comparativo: 2-Cloro-3'-desoxiadenosin 5'-O-[1-naftil (2,2-dimetilpropoxi-L-alanina)] fosfato U



El compuesto U se preparó de acuerdo con el procedimiento general 1 utilizando 2-cloro-3'-desoxiadenosina (350 mg, 1,25 mmol), N-metilimidazol (490  $\mu$ L, 6.15 mmol) y naftil(2,2-dimetilpropoxi-L-alaninil)fosforo-cloridato (1416 mg, 3.69 mmol). La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 5/95) y TLC preparativa (1000  $\mu$ m, sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  4/96) produjo el compuesto del título en forma de un sólido blanco (264 mg, 34%).

$^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta\text{P}$  4.35, 4.20.

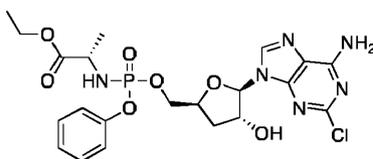
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta\text{H}$  8.23 (s, 0.5 H, H8), 8.21 (s, 0.5 H, H8), 8.11-8.16 (m, 1 H, Naph), 7.86-7.89 (m, 1 H, Naph), 7.69-7.70 (m, 1 H, Naph), 7.54-7.46 (m, 3 H, Naph), 7.37-7.41 (m, 1 H, Naph), 5.95 (d  $J = 2$ , 0.5 H, H1'), 5.94 (d  $J = 1.5$ , 0.5 H, H1'), 4.67-4.73 (m, 2 H, H4'y H2'), 4.34-4.55 (m, 2 H, H5'), 4.00-4.08 (m, 1 H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3.66-3.81 (m, 2 H  $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.28-2.41 (m, 1 H, H3'), 2.03-2.10 (m, 1 H, H3'), 1.31-1.34 (m, 3 H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.90 (s, 4.5 H  $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.89 (s, 4.5 H  $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta\text{C}$  175.11 (d  $J_{\text{CP}} = 4.1$  Hz, C=O), 174.85 (d  $J_{\text{CP}} = 5.0$  Hz, C=O), 158.10, 158.04 (C6), 155.32, 155.30 (C2), 151.33 (C4), 147.96 (d  $^2J_{\text{CP}} = 7.25$  Hz, C-*ipso* Naph), 147.93 (d  $^2J_{\text{CP}} = 7.25$  Hz, C-*ipso* Naph), 140.84, 140.76 (C8), 136.29 (C-Ar), 128.87, 128.82 (CH-Ar), 127.85 (C-Ar), 127.77, 127.74, 127.48, 127.45, 126.47, 125.99, 125.96, 122.74, 122.66 (CH-Ar), 119.47 (C5), 116.29 (d  $^3J_{\text{CP}} = 3.4$  Hz, CH-Ar), 116.17 (d  $^3J_{\text{CP}} = 2.9$  Hz, CH-Ar), 93.42, 93.34 (C1'), 80.57 (d  $^3J_{\text{CP}} = 8.1$  Hz, C4'), 80.53 (d  $^3J_{\text{CP}} = 5.1$  Hz, C4'), 76.61, 76.53 (C2'), 75.41, 75.38 ( $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 68.95 (d  $^2J_{\text{CP}} = 5.3$  Hz, C5'), 68.82 (d  $^2J_{\text{CP}} = 5.2$  Hz, C5'), 51.84, 51.73 ( $\text{CHCH}_3$ ), 35.04, 34.75 (C3'), 32.29 ( $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.70 ( $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 20.76 (d  $^3J_{\text{CP}} = 6.4$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 20.55 (d  $^3J_{\text{CP}} = 7.2$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ).

MS (ES+)  $m/z$ : Encontrado 633 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ), 655 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ )  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{ClN}_6\text{O}_7\text{P}$  requerido: 652.16 (M).

HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  de 90/10 a 0/100 en 30 minutos,  $F = 1\text{ml}/\text{min}$ ,  $\lambda = 254\text{ nm}$ ,  $t\text{R} = 19.16\text{ min}$ .

Ejemplo comparativo: 2-Cloro-3'-desoxiadenosin 5'-O-[1-fenil (etoxi-L-alanina)] fosfato V



El compuesto V se preparó de acuerdo con el procedimiento general 4 usando 2-cloro-3'-desoxiadenosina (343 mg, 0.66 mmol), cloruro de tert-butildimetilsililo (328 mg, 2.18 mmol) imidazol (297 mg, 4.36 mmol). La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 12/88) produjo el intermedio 1 con un rendimiento cuantitativo. A continuación, el intermedio 1 (970 mg, 1.89 mmol) se hizo reaccionar con 12 ml de una solución  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$  4/1/1. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 12/88) produjo el intermedio 2 (544 mg, 72%). Luego, el intermedio 2 (204 mg, 0.51 mmol) se hizo reaccionar con cloruro de tertbutilmagnesio y una solución de fenil(etiloxi-L-alaninil)fosforo-cloridato (348,56 mg, 1,02 mmol) en THF anhidro (5 ml). La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0/100 a 8/92) produjo el intermedio 3 (93 mg, 28%). Finalmente, el intermedio 3 (93 mg, 0.14 mmol) se hizo reaccionar con una solución de  $\text{THF}/\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}$  1/1/1 (3 ml). La purificación por TLC preparativa (2000  $\mu$ m, sistema de eluyente  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  4/96) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido blanco (50 mg, 66%). (Rendimiento global 13%)

$^{31}\text{P}$  RMN (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta\text{P}$  3.93, 3.72.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta\text{H}$  8.12 (s, 0.5 H, H8), 8.11 (s, 0.5 H, H8), 7.18-7.23 (m, 2 H, Ph), 7.03-7.12 (m, 3 H, Ph), 5.85 (d  $J = 1.5$ , 0.5 H, H1'), 5.84 (d  $J = 2$ , 0.5 H, H1'), 4.55-4.62 (m, 2 H, H4'y H2'), 4.34-4.38 (m, 0.5 H, H5'), 4.28-4.32 (m, 0.5 H, H5'), 4.16-4.22 (m, 1 H, H5'), 3.93-4.03 (m, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.70-3.84 (m, 1 H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.20-2.28 (m, 1 H, H3'), 1.95-1.99 (m, 1 H, H3'), 1.15-1.21 (m, 3 H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.06-1.11 (m, 3 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).

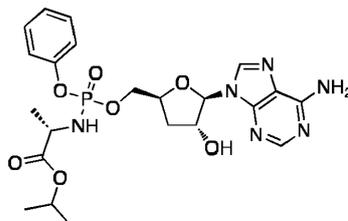
$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta\text{C}$  173.66 (d  $^3J_{\text{CP}} = 4.5$  Hz, C=O), 173.65 (d  $^3J_{\text{CP}} = 5.3$  Hz, C=O), 156.68, 156.70 (C6), 153.93, 153.88 (C2), 150.72 (d  $^2J_{\text{CP}} = 6.7$  Hz, C-*ipso* Ph), 150.71 (d  $^2J_{\text{CP}} = 6.5$  Hz, C-*ipso* Ph), 149.89, 149.94 (C4), 139.41, 139.35 (C8), 129.33 (CH-Ar), 124.74, 124.73 (CH-Ar), 120.03 (d  $^3J_{\text{CP}} = 4.75$  Hz, CH-Ar), 119.97 (d  $^3J_{\text{CP}} = 4.87$  Hz, CH-Ar), 118.07, 118.03 (C5), 92.02, 91.88 (C1'), 79.26, 79.19 (C4'), 75.26, 75.24 (C2'), 67.18 (d  $^2J_{\text{CP}} = 5.25$  Hz,

C5'), 66.81 (d  $^2J_{CP}$  = 5.12 Hz, C5'), 60.96 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 50.23, 50.12 (CHCH<sub>3</sub>), 33.46, 33.21 (C3'), 19.16 (d  $^3J_{CP}$  = 6.3 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 18.97 (d  $^3J_{CP}$  = 7.2 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 13.10, 13.07 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

MS (ES+) *m/z*: Encontrado 541 (M + H<sup>+</sup>), 563 (M + Na<sup>+</sup>) C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P requerido: 540 (M).

5 HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 90/10 a 0/100 en 30 minutos, F = 1ml/min, λ = 254 nm, tR 12.41, 12.83 min.

Ejemplo comparativo: (2S)-isopropil-2-((((2S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino) propanoato W



10 Se añadieron gota a gota N-metilimidazol (240 μl, 5 mmol) y una solución de (2S)-isopropil 2-((cloro (fenoxi) fosforil) amino) propanoato (546 mg, 3 mmol) en THF anhidro (5 ml) una suspensión de (2R, 3R, 5S)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-3-ol (150 mg, 0.6 mmol) en THF anhidro (3 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante un período de 16 horas. La purificación por cromatografía de columna (sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0/100 a 6/94) y TLC preparativa (2000 μm, sistema de eluyente CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5/95) proporcionó el compuesto deseado como un sólido blanco (40 mg, 13%).

15 MS (ES+) *m/z*: Encontrado 521.2 (M + H<sup>+</sup>), 543.3 (M + Na<sup>+</sup>), 1063.4 (2M + Na<sup>+</sup>) C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>P requerido: 520.18(M).

$^{31}$ P RMN (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δP 3.99 (s), 3.82 (s).

1H RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δH 8.16 (s, 0.5H, H8), 8.15 (s, 0.5H, H8), 8.11 (s, 1H, H-2) 7.23-7.20 (m, 2H, Ph), 7.11-7.03 (m, 3H, Ph), 5.91 (d *J* = 2.0Hz, 0.5H, H1'), 5.90 (d *J* = 2.0Hz, 0.5H, H1'), 4.85-4.79 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.64-4.63 (m, 1H, H4'), 4.60-6.57 (m, 1H, H2'), 4.37-4.33 (m, 1H, H5'), 4.31-4.28 (m, 1H, H5'), 3.74-4.22-4.17 (m, 1H, H5'), 3.70 (m, 1H, CH ala), 2.02-1.97 (m, 1H, H3'), 2.04-2.01 (m, 1H, H3'), 1.18-1.14 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (m, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

20 HPLC HPLC en fase reversa eluyendo con H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN de 100/10 a 0/100 en 30 minutos, F = 1ml/min, λ = 200 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con tR 11.58 min. y tR 11.92 min.

25 Solventes y reactivos. Los siguientes solventes anhidros se adquirieron de Sigma-Aldrich: diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), trimetilfosfato ((CH<sub>3</sub>O)<sub>3</sub>PO). Los ésteres de aminoácidos disponibles en el mercado se adquirieron de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos disponibles comercialmente se usaron sin purificación adicional.

Cromatografía de capa fina (TLC).

30 Las placas con respaldo de aluminio prerrecubierto (60 F254, 0.2 mm de espesor, Merck) se visualizaron bajo luz ultravioleta de onda corta y larga (254 y 366 nm) o mediante combustión utilizando los siguientes indicadores de TLC: (i) sulfato de molibdato de amonio y cerio; (ii) solución de permanganato de potasio. Las placas de TLC preparativas (20 cm x 20 cm, 500-2000 μm) se adquirieron de Merck. Cromatografía de columna Instantánea. La cromatografía de columna Instantánea se llevó a cabo utilizando sílica gel suministrada por Fisher (60A, 35-70 μm). Las columnas de vidrio se empaquetaron en suspensión utilizando el eluyente apropiado, cargando la muestra como una solución concentrada en el mismo eluyente o preadsorbida en sílica gel. Las fracciones que contenían el producto se identificaron mediante TLC y se agruparon y el solvente se eliminó en vacuo.

35 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se verificó que la pureza de los compuestos finales era > 95% mediante análisis de HPLC usando I) ThermoSCIENTIFIC, SPECTRA SYSTEM P4000, detector SPECTRA SYSTEM UV2000, Varian Pursuit XRs 5 C18, 150 x 4.6 mm (como una columna analítica) o II) Varian Prostar (detector LC Workstation-Varian Prostar 335 LC), Thermo SCIENTIFIC Hypersil Gold C18, 5μ, 150 x 4,6 mm (como columna analítica). Para el método de elución véase la parte experimental.

40 Resonancia magnética nuclear (RMN). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C RMN (125 MHz), <sup>31</sup>P RMN (202 MHz) y <sup>19</sup>F RMN (470 MHz) se registraron en un espectrómetro Bruker Avance de 500 MHz a 25 °C. Los desplazamientos químicos (δ) se citan en partes por millón (ppm) en relación con el MeOH-d<sub>4</sub> interno (δ 3.34 1H-RMN, δ 49.86 <sup>13</sup>C-RMN) y CHCl<sub>3</sub>-d<sub>4</sub> (δ 7.26 <sup>1</sup>H RMN, δ 77.36 <sup>13</sup>C RMN) o externo 85% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (δ 0.00 <sup>31</sup>P RMN). Las constantes de acoplamiento (J) se miden en hercios. Las siguientes abreviaturas se utilizan en la asignación de las señales de RMN: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto), m (multiplete), bs (singlete), dd (doblete de doblete), dt (doblete de triplete), app (aparente). La asignación de las señales en <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN se realizó con base en el análisis de constantes de acoplamiento y experimentos bidimensionales adicionales (COSY, HSQC, HMBC, PENDANT).

45

Espectrometría de masas (MS). Los espectros de masas de baja resolución se realizaron en Bruker Daltonics microTof-LC, (ionización a presión atmosférica, espectroscopia de masas por aspersión electrónica) ya sea en modo positivo o negativo.

5 Pureza de los compuestos finales. La pureza  $\geq 95\%$  de todos los compuestos finales se confirmó usando análisis de HPLC.

#### Ejemplo 2 – Citotoxicidad

Los compuestos ejemplificados que incorporan la presente invención se evaluaron en los siguientes procedimientos para determinar su potencia anticancerosa.

10 Se realizaron ensayos de viabilidad *in vitro* para evaluar los efectos de los compuestos sobre la viabilidad celular en 7 líneas celulares seleccionadas durante 72 h utilizando el ensayo CellTiterGlo (CTG, Promega-G7573). Las pruebas se realizaron por duplicado con el tratamiento de los compuestos en 9 puntos, con una titulación de 3.16 veces en placas de 96 pozos durante ~72 h. Las concentraciones de partida del compuesto fueron 198 mM. Se realizó un ensayo de viabilidad celular utilizando CellTiterGlo en una placa de 96 pozos. El tratamiento del compuesto fue de 72 horas, bajo condiciones de crecimiento estándar y por duplicado. Los compuestos se disolvieron a 40 mM con 100% descongela-  
 15 do. Los compuestos se diluyeron en serie a 3.16 veces en DMSO descongela- do y se calentaron hasta 37 °C antes de disolverse en medio (2  $\mu$ l + 200  $\mu$ l). Después de que los compuestos se disolvieron en medio (el medio también se calentó hasta 37 °C). Los medios que contenían compuestos se calentaron hasta 37 °C en la incubadora y luego se agregaron compuestos en medios a las placas celulares (50  $\mu$ l + 50  $\mu$ l), en duplicados. Las concentraciones finales de los compuestos fueron de 198M a 19.9nM. Todas las solubilidades de los compuestos se verificaron y registraron nuevamente, luego las placas se transfirieron a la incubadora de cultivo de tejidos con CO<sub>2</sub> inmediatamente y se incubaron durante 3 días. La concentración final de DMSO es del 0.5%.

20 Los resultados de la selección inicial se presentan en la Tabla II. A representa una IC<sub>50</sub> relativo de 0.1 a 5  $\mu$ M, B representa una IC<sub>50</sub> relativa mayor que 5  $\mu$ M y hasta 15  $\mu$ M, C representa una IC<sub>50</sub> relativa mayor que 15  $\mu$ M y hasta 100  $\mu$ M; y D representa una IC<sub>50</sub> relativa mayor que 100  $\mu$ M.

Tabla II

Comp	MOLT-4 <sup>a</sup>		KG-1 <sup>b</sup>		HL-60 <sup>c</sup>		CCRF-CEM <sup>d</sup>		K562 <sup>e</sup>	
	IC <sub>50</sub> <sup>f</sup>	M.I.% <sup>g</sup>	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%
cordicepina	C	52	C	78	C	88	C	12	C	88
A	A	98	B	92	B	97	A	100	A	92
B	A	100	B	100	B	100	A	100	A	97
C	A	93	D	65	C	82	B	94	B	92
D	A	100	B	100	B	100	B	100	B	99
G	C	75	C	63	C	57	C	65	C	78
H	C	100	C	69	C	80	C	100	C	89
I	C	100	C	93	C	99	C	99	C	87
E	B	97	C	69	C	74	C	90	D	81
J	A	100	C	29	C	98	C	100	C	97
F	A	100	C	98	C	100	S	99	C	91

<sup>a</sup>MOLT-4: leucemia linfoblástica aguda; <sup>b</sup>KG-1: leucemia mielógena aguda; <sup>c</sup>HL-60: leucemia promielocítica aguda; <sup>d</sup>CCRF-CEM: leucemia linfoblástica aguda; <sup>e</sup>K562: leucemia mielógena crónica. <sup>f</sup>IC<sub>50</sub>  $\mu$ M: IC<sub>50</sub> relativa; <sup>g</sup>M.I.%: porcentaje de inhibición máximo de viabilidad celular.

**Tabla II (cont)**

Compuesto	MCF-7 <sup>h</sup>		HepG2 <sup>i</sup>	
	IC50	M.I.%	IC50	M.I.%
cordicepina	C	78	C	66
A	A	94	B	76
B	A	99	B	95
C	B	87	C	59
D	A	100	B	99
G	B	97	C	67
H	A	94	B	55
I	B	99	C	90
E	C	78	C	59
J	C	97	C	55
F	B	99	C	84

<sup>h</sup>MCF-7: adenocarcinoma de mama; <sup>i</sup>HepG2: carcinoma hepatocelular

Un subconjunto de compuestos de la invención se ensayó luego para determinar su actividad citotóxica en un arreglo más amplio de diferentes tumores sólidos y malignidades hematológicas usando el siguiente ensayo.

Tumor sólido y ensayo de malignidad hematológica.

- 5 Se realizó un ensayo de viabilidad *in vitro* para evaluar los efectos de los compuestos sobre la viabilidad celular en líneas celulares seleccionadas durante 72 h usando el ensayo CellTiterGlo (CTG, Promega-G7573). Las pruebas se realizaron por duplicado con el tratamiento de los compuestos en 9 puntos, con una titulación de 3.16 veces en placas de 96 pozos durante ~72 h. Las concentraciones de partida del compuesto fueron 198 mM. Se realizó un ensayo de viabilidad celular utilizando CellTiterGlo en una placa de 96 pozos. Tratamiento del compuesto 72 hrs, condiciones estándar de crecimiento, duplicados. Los compuestos se disolvieron a 40 mM con 100% descongela-  
10 do. Los compuestos se diluyeron en serie a 3.16 veces en DMSO descongela- do y se calentaron hasta 37 °C antes de disolverse en medio (2 µl + 200 µl). Después de que los compuestos se disolvieron en los medios, los medios que contenían los compuestos se calentaron hasta 37 °C en la incubadora y luego los compuestos en los medios se

agregaron a las placas celulares (50  $\mu$ l + 50  $\mu$ l) en duplicados. Las concentraciones finales de los compuestos fueron de 198M a 19.9nM. Todas las solubilidades de los compuestos se verificaron y registraron nuevamente, luego las placas se transfirieron a la incubadora de cultivo de tejidos con CO<sub>2</sub> inmediatamente y se incubaron durante 3 días. La concentración final de DMSO es del 0.5%.

5 Las siguientes líneas celulares se probaron y se mencionan en la Tabla IV a continuación:

Tabla III

Línea celular	Malignidad	Línea celular	Malignidad
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda	HEL92.1.7	Eritroleucemia
CCRFCEM	Leucemia linfoblástica aguda	HL-60	Leucemia promielocítica
RL	Linfoma no Hodgkin	MV4-11	Leucemia mielomonocítica bifenotípica B
HS445	linfoma de Hodgkin	HepG2	Carcinoma hepatocelular
RPMI8226	Mieloma múltiple humano	HT29	Adenocarcinoma de colon
K562	Leucemia mielógena crónica	BxPC-3	Cáncer de páncreas
KG-1	Leucemia mielógena aguda	MCF-7	Adenocarcinoma de mama
THP-1	Leucemia monocítica aguda	MiaPaCa2	Adenocarcinoma de mama
Z-138	Linfoma de células del manto	SW620	Adenocarcinoma de colon
NCI-H929	Plasmacitoma	Jurkat	leucemia aguda de células T

10 Los resultados de la selección adicional se presentan en las Tablas IV-VII. Para las Tablas IV a VI: A representa una IC<sub>50</sub> absoluta de 0.1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M, B representa una IC<sub>50</sub> absoluta mayor que 5  $\mu$ M y hasta 15  $\mu$ M, C representa una IC<sub>50</sub> absoluta mayor que 15  $\mu$ M y hasta 100  $\mu$ M; y D representa una IC absoluta de más de 100  $\mu$ M. Para la Tabla VII: A representa una EC<sub>50</sub> absoluta de 0.1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M, B representa una EC<sub>50</sub> absoluta mayor que 5  $\mu$ M y hasta 15  $\mu$ M, C representa una EC<sub>50</sub> absoluta mayor que 15  $\mu$ M y hasta 100  $\mu$ M; y D representa una EC<sub>50</sub> absoluta de más de 100  $\mu$ M.

**Tabla IV**

Comp	CCRFCEM		MOLT-4		KG-1		Jurkat	
	IC <sub>50</sub>	MI%						
Cordicepina	D	41	D	46	D	69	D	20
A	A	100	A	98	C	100	A	100
B	A	100	A	98	B	97	A	100
C	B	100	A	92	C	102	B	100
F	A	101	A	98	C	95	A	100
E	A	100	A	98	C	100	B	95

**Tabla IV (Cont.)**

Comp	THP-1		RL		HS445		NCI-H929	
	IC <sub>50</sub>	MI%						
Cordicepina	D	-3	D	17	D	2	D	24
A	C	74	A	93	C	98	B	100
B	C	99	A	96	B	96	A	99
C	C	99	B	100	C	102	B	104
F	C	100	B	90	C	92	B	100
E	D	43	B	88	C	85	C	98

Table IV (Cont.)

	RPMI-8226		MV4-11		HEL92.1.7		K562	
Cmpd	IC <sub>50</sub>	MI%						
Cordycepin	D	1	D	1	C	88	C	78
A	B	96	A	99	B	100	A	96
B	B	102	A	99	A	98	A	99
C	C	103	B	106	A	99	B	100
F	C	106	A	100	B	99	A	93
E	C	89	B	101	C	101	B	90

Table IV (Cont.)

	HL-60		Z138		BxPC-3		HepG2	
Cmpd	IC <sub>50</sub>	MI%						
Cordycepin	D	61	B	95	D	22	D	13
A	B	99	C	95	C	81	C	75
B	A	99	B	100	B	90	B	98
C	B	100	B	100	C	99	C	99
F	B	96	C	76	C	78	C	79
E	B	95	C	93	C	71	C	67

**Tabla IV (Cont.)**

Comp	RPMI-8226		MV4-11		HEL92.1.7		K562	
	IC <sub>50</sub>	MI%						
Cordicepina	D	I	D	I	C	88	C	78
A	B	96	A	99	B	100	A	96
B	B	102	A	99	A	98	A	99
C	C	103	B	106	A	99	B	100
F	C	106	A	100	B	99	A	93
E	C	89	B	101	C	101	B	90

**Tabla IV (Cont.)**

Comp	HL-60		Z138		BxPC-3		HepG2	
	IC <sub>50</sub>	MI%						
Cordicepina	D	61	B	95	D	22	D	13
A	B	99	C	95	C	81	C	75
B	A	99	B	100	B	90	B	98
C	B	100	B	100	C	99	C	99
F	B	96	C	76	C	78	C	79
E	B	95	C	93	C	71	C	67

**Tabla IV (Cont.)**

Comp	HT29		MCF7		MiaPaCa-2		SW620	
	IC <sub>50</sub>	MI%						
Cordicepina	D	44	D	77	D	35	D	10
A	B	93	A	99	B	96	C	85
B	B	98	A	96	A	98	B	93
C	C	99	A	102	B	106	C	100
F	C	89	B	103	B	101	C	90
E	C	76	B	89	C	91	C	74

**Tabla V**

Comp	CCRFCM		KG-1		K562		MOLT-4	
	IC <sub>50</sub>	M.I.%						
2-OMe-Cordicepina	D	-4	D	1	D	40	D	1
L	C	100	D	92	C	104	C	101
K	B	102	C	99	C	100	C	104
M	B	100	C	102	B	100	B	101
N	C	93	C	96	C	78	C	97

**Tabla V (Cont.)**

Comp	HT29		MCF7		NCI-H929		RL	
	IC <sub>50</sub>	M.I.%						
2-OMe-Cordicepina	D	19	D	8	D	51	D	0
L	C	81	C	90	C	104	C	97
K	C	98	B	99	B	102	C	104
M	C	100	C	100	B	99	B	100
N	C	69	C	73	C	99	C	88

**Tabla VI**

Comp	HepG2		HL-60		HT29	
	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%
2-F- Cordicepina	C	82	B	96	C	73
O	B	83	A	101	C	84
P	B	74	A	100	B	87
Q	A	94	A	99	C	88
R	B	82	A	100	C	92

**Tabla VI (Cont.)**

Comp	CCRFCEM		HEL92.1.7		KG-1	
	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%
2-F-Cordicepina	C	101	B	99	B	99
O	A	99	A	100	B	99
P	A	99	A	99	A	97
Q	A	101	A	99	B	103
R	A	100	A	99	A	96

**Tabla VI (Cont.)**

Comp	MiaPaCa-2		MCF7		K562	
	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%	IC <sub>50</sub>	M.I.%
2-F-Cordicepina	C	100	C	97	C	97
O	A	100	A	95	A	99
P	A	98	A	95	A	97
Q	A	100	A	99	A	100
R	B	98	A	87	B	96

**Tabla VII**

		BxPC-3-Luc	CCR5-CEM	HEL.92.1.7	HepG2	HL-60	HS445	HT29	K562	KG-1
2-Cl-	EC <sub>50</sub>	D	C	B	D	C	D	D	D	D
cordicepina	MI %	-1.3	98.1	94.3	31.1	84.4	-1.9	4.4	37.6	4.3
Comp. S	EC <sub>50</sub>	C	B	B	C	B	C	C	C	C
	MI %	82.6	100	100.4	84.6	101.9	105.9	88.1	101.4	99

Tabla VII (Cont.)

		MCF-7	Mia-Pa-Ca-2	MOLT-4	MV4-11	NCI-H929	RL	RPMI-8226	SW620	THP-1	Z-138
2-Cl-cordicepina	EC <sub>50</sub>	D	D	D	C	B	C	D	D	D	C
	MI%	-0.9	17.7	80.4	100.2	93.6	84.1	29	36.3	24.1	99.5
Comp. S	EC <sub>50</sub>	C	C	B	B	B	B	C	C	C	C
	MI%	100.9	98.2	100.1	100.9	102.3	100.2	99.6	92.1	97	90.2

Todos los compuestos probados mostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares analizadas. En la mayoría de los casos, los compuestos de la invención fueron más potentes que el nucleósido original contra todas las líneas celulares.

## Ejemplo 3- Evaluación de la citotoxicidad y la actividad de las células madre de cáncer

Se llevó a cabo un análisis comparativo adicional de la toxicidad de los compuestos en la línea celular KG1a de leucemia mieloide aguda (AML) durante un rango de dosis extendido, y se evaluó el efecto relativo de los compuestos en el compartimiento de células madre leucémicas (LSC) dentro de la línea celular KG1a, a través de todo el rango de dosis.

## Materiales y métodos

## Condiciones de cultivo de células KG1a

La línea celular KG1a se mantuvo en medio RPMI (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 20% de suero de ternera fetal. Subsecuentemente, las células se dividieron en partes alícuotas (10<sup>5</sup> células/100 µl) en placas de 96 pozos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5% durante 72 h en presencia de análogos de nucleósidos y sus respectivas proTides en concentraciones que se determinaron experimentalmente para cada serie de compuestos. Además, se llevaron a cabo cultivos de control a los que no se añadió fármaco. Las células se recolectaron subsecuentemente mediante centrifugación y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el ensayo de anexina V.

## Medición de la apoptosis en vitro.

Las células cultivadas se recolectaron mediante centrifugación y luego se resuspendieron en 195 µl de regulador rico en calcio. Subsecuentemente, se agregaron 5 µl de Anexina V (Caltag Medsystems, Botolph Claydon, Reino Unido) a la suspensión de células y las células se incubaron en la oscuridad durante 10 minutos antes del lavado. Las células finalmente se resuspendieron en 190 µl de regulador rico en calcio junto con 10 µl de yoduro de propidio. La apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo inmunofluorescente de doble color como se describió anteriormente. Subsecuentemente, se calcularon los valores de LD<sub>50</sub> (la dosis requerida para matar el 50% de las células en un cultivo) para cada análogo de nucleósido y ProTide.

## Identificación inmunofenotípica del compartimiento leucémico de células madre.

Las células KG1a se cultivaron durante 72 h en presencia de un amplio rango de concentraciones de cada compuesto analizado. Las células se recolectaron y se marcaron con un cóctel de anticuerpos anti-linaje (PE-cy7), anti-CD34 (FITC), anti-CD38 (PE) y anti-CD123 (PERCP cy5). La subpoblación que expresaba un fenotipo LSC se identificó posteriormente y se expresó como un porcentaje de todas las células viables que quedan en el cultivo. Los porcentajes de células madre restantes se representaron en un gráfico de dosis-respuesta y los efectos de los compuestos se compararon entre sí y con el nucleósido original.

## Análisis estadístico

Los datos obtenidos en estos experimentos se evaluaron utilizando ANOVA de una vía. Todos los datos se confirmaron como Gaussianas o una aproximación Gaussiana usando la prueba de ómnibus K2. Los valores de LD<sub>50</sub> se calcularon a partir de la regresión no lineal y la línea de análisis de mejor ajuste de las curvas de dosis-respuesta sigmoidales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad Prism 6.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA).

## Resultados

La sensibilidad del fármaco en vitro se midió utilizando el ensayo de yoduro de anexina V/propidio. El compuesto A mostró un aumento en la vitropotencia en comparación con Cordicepina (P <0.0001). 2-F-Cordicepina fue significativamente más potente que Cordicepina (P <0.0001) y todas las ProTides probadas mostraron una mayor potencia en comparación con el nucleósido parental (Figura 1).

Estos experimentos confirmaron que el compuesto A mostró evidencia de mayor potencia en el compartimiento de células madre a concentraciones por encima de 1 mM. Como se puede ver en la Figura 2, el compuesto A demostró una capacidad no solo para reducir el número de células madre de cáncer en total, sino también para reducir el número de dichas células como proporción del total de células cancerosas presentes en el cultivo. Esto indica la capacidad del compuesto A para apuntar preferentemente a las células madre de cáncer. A las concentraciones más altas probadas (1 mM y superiores), la capacidad del compuesto A para apuntar preferentemente a las LSC fue significativamente mayor que la del compuesto original.

Los compuestos 2-F-Cordicepina proTides P, Q y R también mostraron un direccionamiento preferencial de las LSC que mejoró significativamente en comparación con el nucleósido parental. En contraste, mientras que el compuesto O fue capaz de lograr una reducción en la proporción de LSC presentes en las poblaciones de células tratadas (lo que indica una capacidad para apuntar a las LSC), su actividad no fue significativamente diferente a la 2-F-Cordicepina en ninguna de las concentraciones probadas. La Figura 3 muestra la comparación entre 2-F-Cordicepina y todas las proTides probadas, mientras que las comparaciones individuales se muestran en los paneles de la Figura 4.

## Ejemplo 4- Evaluación adicional de la citotoxicidad y estudios de inhibición

Ciertos compuestos de la invención se sometieron a estudios adicionales para probar la actividad citotóxica de ciertos compuestos de la invención y también para medir su actividad frente a 4 líneas celulares de cáncer hematológico.

TdT positivo CEM (ALL humana)

TdT negativo K562 (CML humana)

5 TdT negativo HL-60 (ANLL humano)

Linfoma no HD de RL (CRL-2261)

También se midieron las concentraciones del metabolito activo dATP (trifosfato de Cordicepina) en estas líneas celulares.

10 La actividad citotóxica y las concentraciones intracelulares de 3'-dATP también se estudiaron en presencia de inhibidores farmacológicos de hENT1, adenosina quinasa (AK) y adenosina deaminasa en líneas celulares de cáncer CEM y RL. Dichos inhibidores que imitan los mecanismos conocidos de resistencia al cáncer.

Métodos

*Cultivo de células*

15 Líneas celulares de leucemia HL-60 (ATCC® CCL-240™), K562 (ATCC® CCL-243™), CCRF-CEM (ATCC® CRM-CCL-119™) y RL (ATCC® CRL-2261™) I, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), Middlesex. Las líneas celulares HL-60 y K562 son desoxinucleotidil transferasa negativas (TdT-ve), mientras que la línea celular CCRF-CEM es TdT+ve.

La línea celular HL-60 es de leucemia promielocítica aguda; K562 es una línea celular de CML, la línea celular CCRF-CEM es de leucemia linfoblástica aguda (ALL); y RL es una línea celular de linfoma no Hodgkin.

20 Mantenimiento de Líneas Celulares.

Las líneas celulares HL-60, K562, CCRF-CEM y RL se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Reino Unido), que se suplementaron con suero bovino fetal (FBS) al 10% (Laboratorios PAA), 1% de anfotericina B (5.5 ml) y 1% de penicilina/estreptomycin (5.5 ml) (Laboratorios PAA) y se cultivan en matraces a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%.

25 Ensayo de adenosina 5'-trifosfato (ATP)

30 La cantidad de ATP se utilizó como una medida del número de células y la viabilidad celular. Kit de ensayo ATP ViaLight™ plus (Lonza, EE. UU. : Producto N° LT07-121) para detectar ATP en células tratadas en placas de 96 pozos compatibles con luminiscencia (la concentración inicial de células fue de 1x10<sup>4</sup> células/pozo) con cordicepina y ProTides a concentraciones de: 0, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 µM, seguido de incubación durante 72 horas a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Para los estudios con inhibidores, se agregaron 10 µM de NBTI o 1 µM de EHNA o A-134974 y se dejaron durante 5 minutos antes de agregar los medicamentos (véase la sección 5 para obtener detalles sobre los inhibidores).

35 Después de la incubación, se agregaron 50 µl de reactivo de lisis celular a las placas de 96 pozos para liberar el ATP intracelular, seguido de 100 µl de reactivo de monitorización de ATP (AMR). Los valores luminiscentes de cada pozo se determinaron utilizando el lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) que convierte el ATP en luz mediante el uso de la enzima de luciferasa. Por lo tanto, la cantidad de luminiscencia producida fue directamente proporcional a la cantidad de ATP.

Tratamiento de células y extracción de muestras para el análisis de trifosfato intracelular

40 Se utilizaron líneas celulares con 5x10<sup>6</sup> células/ml. Las células se trataron con 1 µl de 50 µM de cada uno de cordicepina y compuestos A, B, D, E y F y se incubaron durante 2 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, las células se centrifugaron (ambiente, 1200 rpm, 5 minutos), los sobrenadantes del medio de cultivo se eliminaron y los sedimentos celulares se lavaron con 1 ml de PBS y se centrifugaron (ambiente, 1200 rpm, 5 minutos). Los sobrenadantes fueron eliminados; los sedimentos se reconstituyeron en 100 µl de PBS y 100 µl de ácido perclórico 0.8 M y se mezclaron con vórtex y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó (ambiente, 1200 rpm, 5 minutos) y se transfirieron 180 µl del sobrenadante a nuevos tubos y se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis.

45 Durante el análisis, se transfirieron 90 µl del extracto a los tubos nuevos. Se añadieron 25 µl de acetato de amonio 1 M al extracto y luego se neutralizaron mediante la adición de 10 µl de amoníaco al 10% y 5 µl de agua desionizada, luego se transfirieron a viales de LC-MS y se inyectaron 10 µl en el sistema UPLC-MS/MS.

50 Estudios de inhibidores

Las líneas celulares se trataron de la misma manera que se describió anteriormente, pero antes del tratamiento con medicamentos, se agregaron varios inhibidores:

- 1) La nitrobenziltioinosina (NBTI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, producto # N2255) bloquea los transportadores de nucleósidos
- 5 2) El clorhidrato de EHNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, producto # E114) bloquea la adenosina desaminasa
- 3) El hidrato de dihidrocloruro del inhibidor de adenosina quinasa A-134974 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, producto # A2846): bloquea la adenosina quinasa

Las células se trataron con 10 µM de NBTI o 1 µM de EHNA o A-134974 y se dejaron durante 5 minutos antes de añadir el fármaco. Las células se incubaron luego durante 2 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%.

10 Análisis LC-MS/MS

Los analitos se resolvieron utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (Accela UPLC, Thermo Scientific, Reino Unido) equipado con una columna Biobasic Ax5µm, 50 × 2.1mm (Thermo Electron Corporation, Murrieta, CA, USA) y una fase móvil que consiste en una mezcla de NH<sub>4</sub>Ac 10 mM en ACN/H<sub>2</sub>O (30: 70v/v), pH 6.0 (A) y NH<sub>4</sub>Ac 1 mM en ACN/H<sub>2</sub>O (30: 70v/v), pH 10.5 (B). Se empleará el gradiente de fase móvil, que comprende: regulador A = 95% a 0-0.5 min, de 95 a 0% durante 1.25 minutos, mantenido a 0% durante 1.75 minutos, de 0-95% a 0.1 min, terminando con 95 % durante 2.9 minutos, todo a una tasa de flujo de 500 µl/min.

15

Los compuestos de elución de interés se detectaron utilizando un sistema de espectrometría de masas Vantage de cuadrupolo de triple etapa (Thermo Scientific, Reino Unido) equipado con una fuente de iones de electroaspersión. Las muestras se analizaron en los modos de iones negativos en Monitorización de Reacción Múltiple a un voltaje de aspersión de 3000V. El nitrógeno se usó como cubierta y gas auxiliar a una tasa de flujo de 50 y 20 unidades arbitrarias, respectivamente. Se usó argón como gas de colisión con una presión de 1.5 mTorr. La masa de iones hijos de transición óptima y la energía de colisión de cada analista fueron las siguientes: 3'ATP 490.1 → 392.1 (energía de colisión 19V) y el estándar interno CloroATP 539.9 → 442.2 (energía de colisión 24V).

20

Análisis estadístico

- 25 Las curvas de dosis-respuesta de la citotoxicidad de los fármacos se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal del porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración y se obtuvieron los valores de EC<sub>50</sub>. El ensayo intracelular se realizó en cinco repeticiones para cada condición. El ensayo intracelular se determinó mediante la prueba t pareada (dos colas) de la concentración de 3'ATP/ATP y se obtuvieron los valores de p. Para todo el análisis, se utilizó el programa Prism Software (software GraphPad) y se usó Microsoft Powerpoint® 2013 para graficar los resultados.

30

Resultados

Tabla de resumen de IC<sub>50</sub> (µM)

	Cordicepina	A (FD)	B (FD)	D (FD)	E (FD)	F (FD)
CEM (TdT <sup>ve</sup> )	19.5	0.87 (22)	0.13 (150)	6.1 (3)	10.0 (2)	4.3 (5)
K562	10.9	2.4 (5)	0.21 (52)	4.2 (3)	13.9 (1)	6.3 (2)
HL-60	11.4	4.6 (3)	2.6 (4)	5.4 (2)	10.2 (1)	8.3 (1)
CRL	24.5	2.1 (12)	0.4 (61)	4.8 (5)	11.0 (2)	3.4 (7)

(FD) = diferencia de veces en comparación con Cordicepina = Cordicepina IC<sub>50</sub>/ProTide IC<sub>50</sub>

Resumen de los niveles medios intracelulares de 3'-dATP (µg/ml)

	Cordicepina	A (FD)	B (FD)	D (FD)	E (FD)	F (FD)
CEM	0.2	3.7 (19)	11.5 (58)	2.9 (15)	0.2 (1)	1.1 (6)

ES 2 742 167 T3

	Cordicepina	A (FD)	B (FD)	D (FD)	E (FD)	F (FD)
K562	1.7	2.6 (13)	6.2 (4)	0.9 (0.5)	0.2 (0.1)	1.3 (0.8)
HL-60	1.7	3.2 (16)	5.1 (3)	0.7 (0.4)	0.2 (0.1)	1.2 (0.7)
CRL	0.8	6.6 (33)	10.8 (14)	1.7 (2)	1 (1)	3.4 (4)

(FD) = diferencia de veces en comparación con Cordicepina = Protide Intracelular TP/TP intracelular de Cordicepina

Los compuestos A y B tuvieron los mejores resultados con IC<sub>50</sub> de 3 a 150 veces mejor que la cordicepina. Los compuestos A y B produjeron concentraciones intracelulares de 3'-dATP de 3 a 56 veces mejores que la cordicepina.

Tabla de resumen de IC50 (todo en µM)

		CEM (FD)	CRL (FD)
Cordicepina	Control	11.5	7.3
	NBTI	57.7 (5)	17.9 (2)
	EHNA	0.7 (-16)	13.2 (2)
	AK	29.2 (3)	28.6 (4)
A	Control	1.4	3.6
	NBTI	2.0 (1)	2.6 (1)
	EHNA	3.1 (2.2)	2.9 (1)
	AK	3.6 (3)	10.2 (3)
B	Control	0.9	3.1
	NBTI	1.4 (1)	2.6 (1)
	EHNA	1.3 (1)	5.2 (2)
	AK	1.3 (1)	2.8 (1)
E	Control	9.9	8.2
	NBTI	17.1 (2)	8.2 (1)
	EHNA	13.4 (1)	5.9 (1)
	AK	10.3 (1)	7.1 (1)

(FD) = diferencia de veces en comparación con el control

5

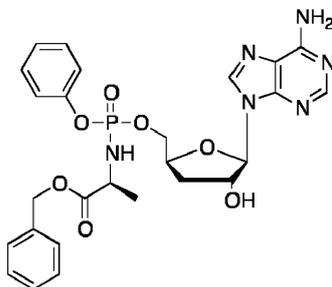
Resumen de los niveles medios intracelulares de 3'-dATP (µg/ml)

		CEM (FD)	CRL (FD)
Cordicepina	Control	0.24	0.10
	NBTI	0.14 (1)	0.06 (1)
	EHNA	9.01 (38)	1.85 (19)
	AK	0.31 (1)	0.16 (1)
A	Control	1.30	0.31
	NBTI	0.99 (1)	0.32 (1)
	EHNA	1.35 (1)	0.27 (1)
	AK	1.20 (1)	0.30 (1)
B	Control	4.07	0.59
	NBTI	3.14 (1)	0.68 (1)
	EHNA	3.62 (1)	0.67 (1)
	AK	2.99 (1)	0.77 (1)
E	Control	0.32	0.08
	NBTI	0.17 (1)	0.12 (1)
	EHNA	0.21 (1)	0.07 (1)
	AK	0.19 (1)	0.06 (1)
(FD) = diferencia de veces en comparación con el control			

5 NBTI, AK y EHNA no afectaron el 3'-dATP intracelular generado por los tres compuestos de la invención probados, lo que indica que estos inhibidores no interfieren con el metabolismo por el cual los compuestos de la invención generan el agente activo 3'-dATP dentro del líneas celulares de cáncer hematológico utilizadas en este estudio. Como estos inhibidores imitan los mecanismos conocidos de resistencia al cáncer, estos resultados indican que los compuestos de la invención serán menos susceptibles a los mecanismos de resistencia al cáncer que la cordicepina.

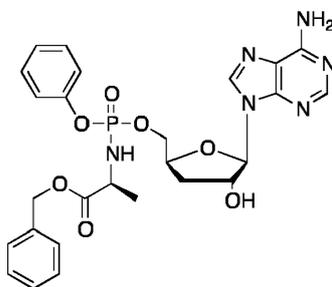
## REIVINDICACIONES

1. 3'-desoxiadenosin-5'-O-[fenil(benciloxi-L-alaninil)] fosfato



o una sal, éster, sal de un éster o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto del mismo.

5 2. 3'-desoxiadenosina-5'-O-[fenil(benciloxi-L-alaninil)] fosfato de acuerdo con la reivindicación 1



3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso como un medicamento.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en la profilaxis o tratamiento del cáncer.

10 5. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de células madre de cáncer en el tratamiento del cáncer.

6. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer se selecciona de leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer biliar y cáncer pancreático.

15 7. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de mama, CNS, cáncer de colon, sarcoma de Ewing, melanoma, cáncer de hígado, colangiocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, neuroblastoma, sarcoma (incluido el sarcoma de Ewing), carcinoma de tiroides, cáncer de piel (incluido el melanoma), carcinoma oral de células escamosas, cáncer de vejiga urinaria, tumor de células de Leydig, cáncer biliar, tal como colangiocarcinoma o cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer colorrectal y cánceres ginecológicos, incluido el cáncer de ovario y el cáncer de endometrio.

20 8. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: leucemia, linfoma, mieloma múltiple, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, neuroblastoma, sarcoma (incluido el sarcoma de Ewing), carcinoma de tiroides, cáncer de piel (incluido el melanoma), carcinoma oral de células escamosas, cáncer de vejiga urinaria, tumor de células de Leydig, cáncer biliar, tal como colangiocarcinoma o cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer colorrectal y cánceres ginecológicos, incluido el cáncer de ovario y el cáncer de endometrio.

9. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer es leucemia o linfoma.

10. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la leucemia se selecciona del grupo que comprende leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia monoblástica, leucemia de células pilosas, Linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin.

11. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 10 en donde la leucemia es leucemia linfoblástica aguda.

12. Un compuesto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde el cáncer es cáncer recidivante o refractario.

13. Un compuesto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde el cáncer es un cáncer metastásico.

14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

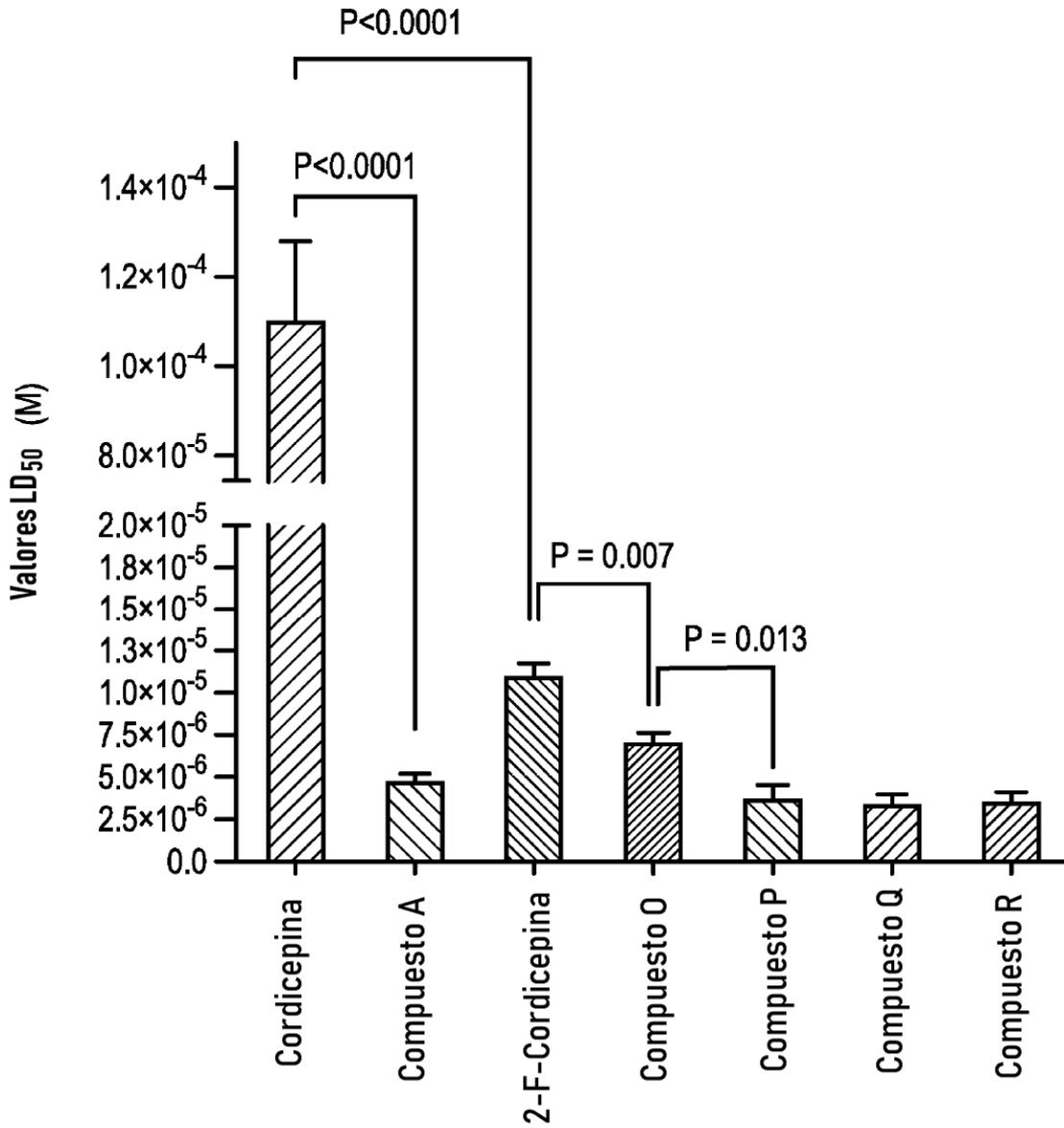


FIG. 1

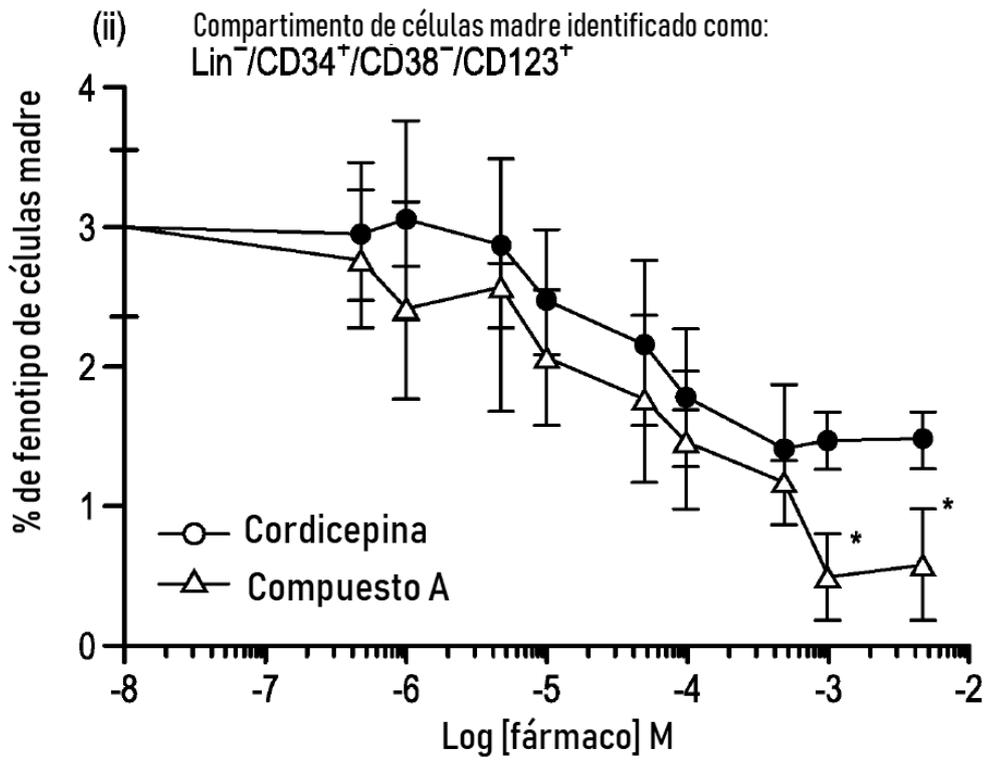
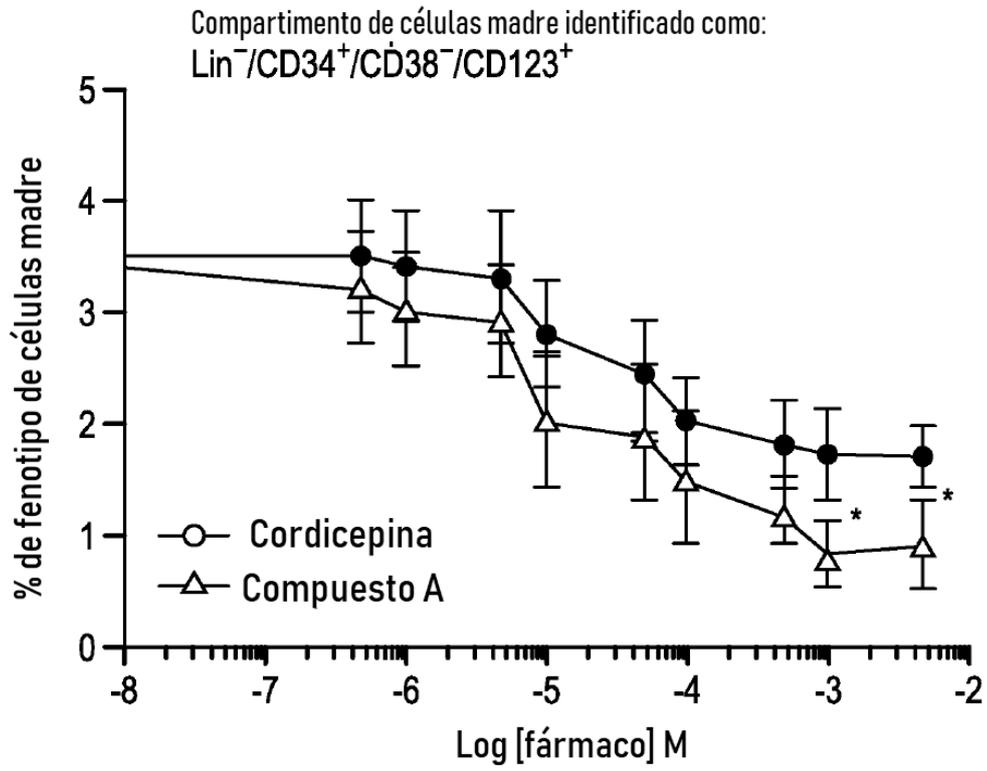


FIG. 2

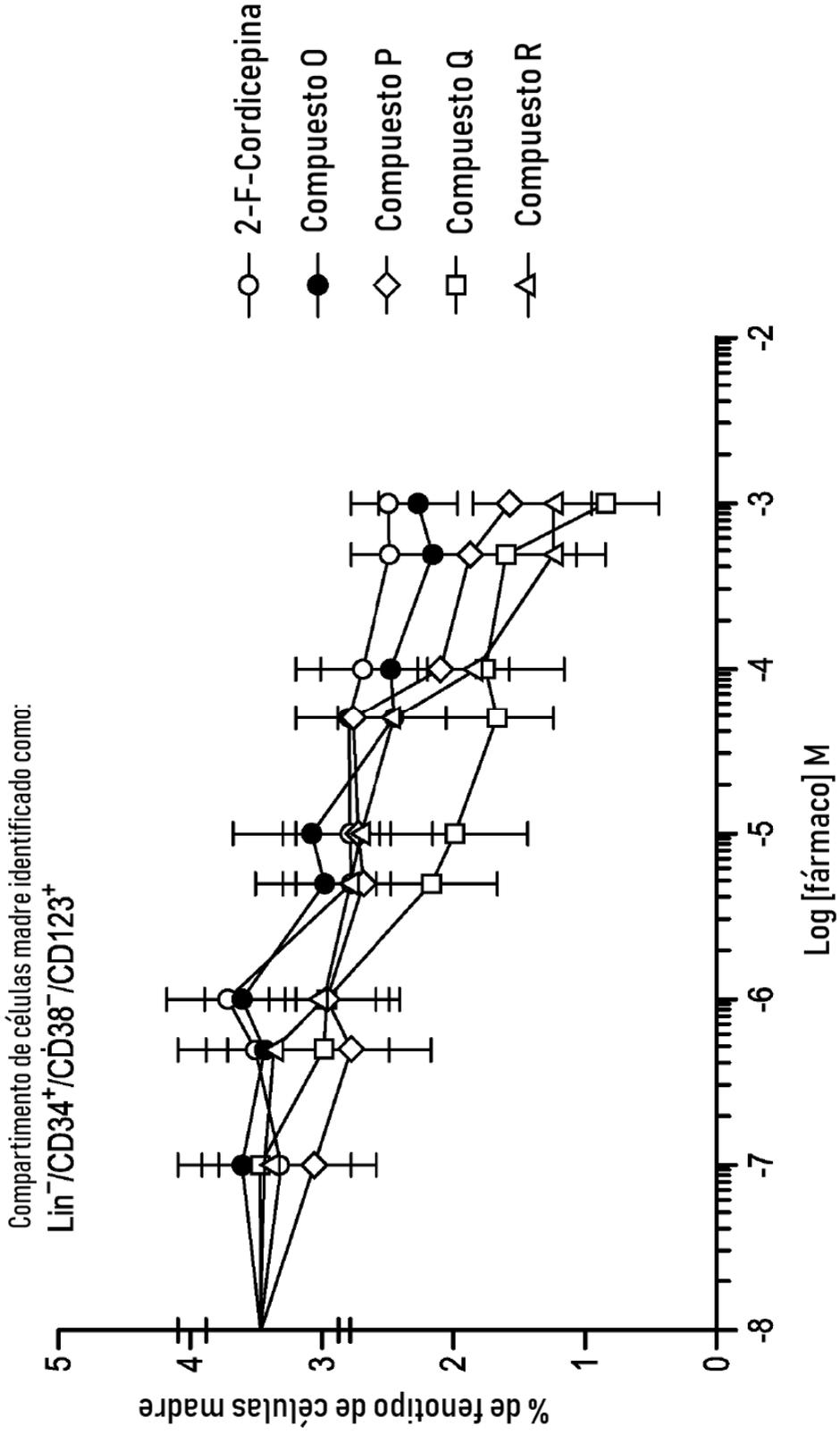


FIG. 3

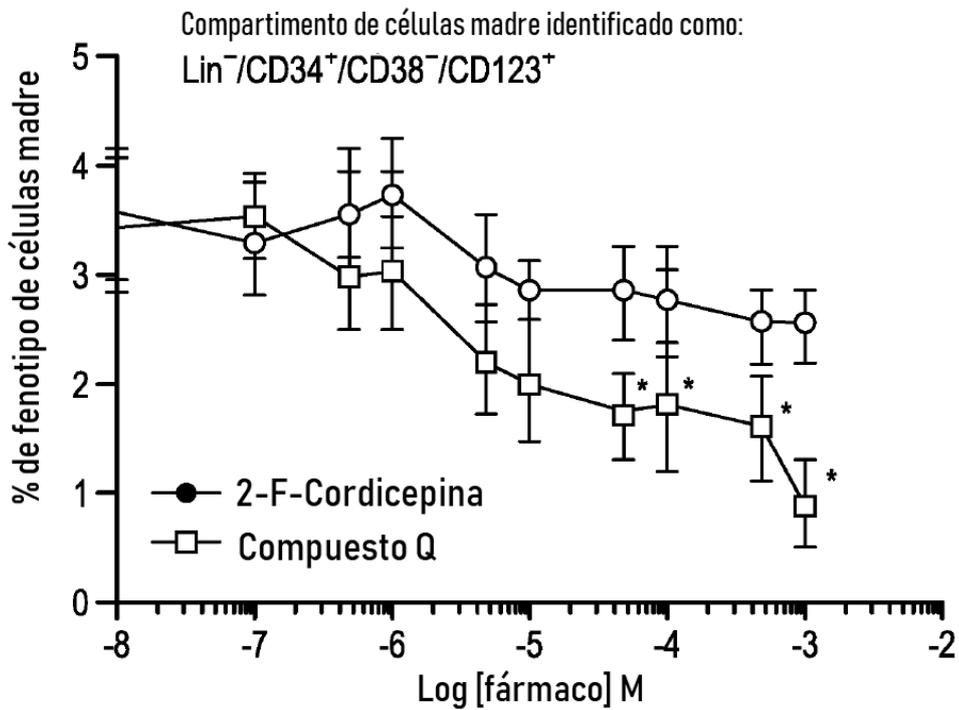
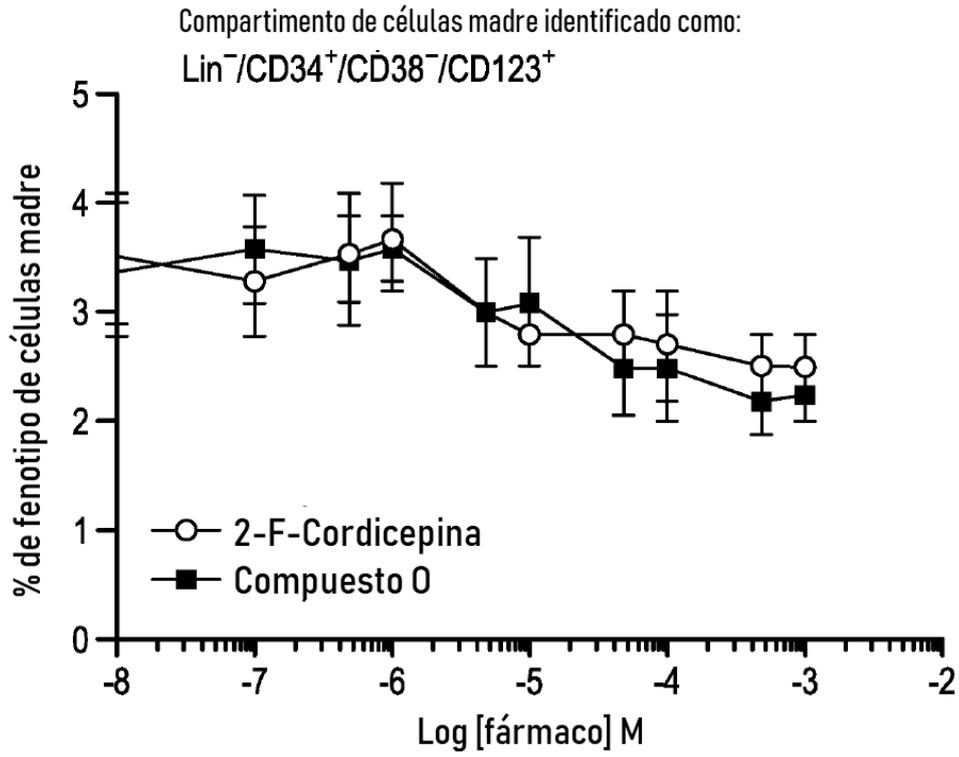


FIG. 4

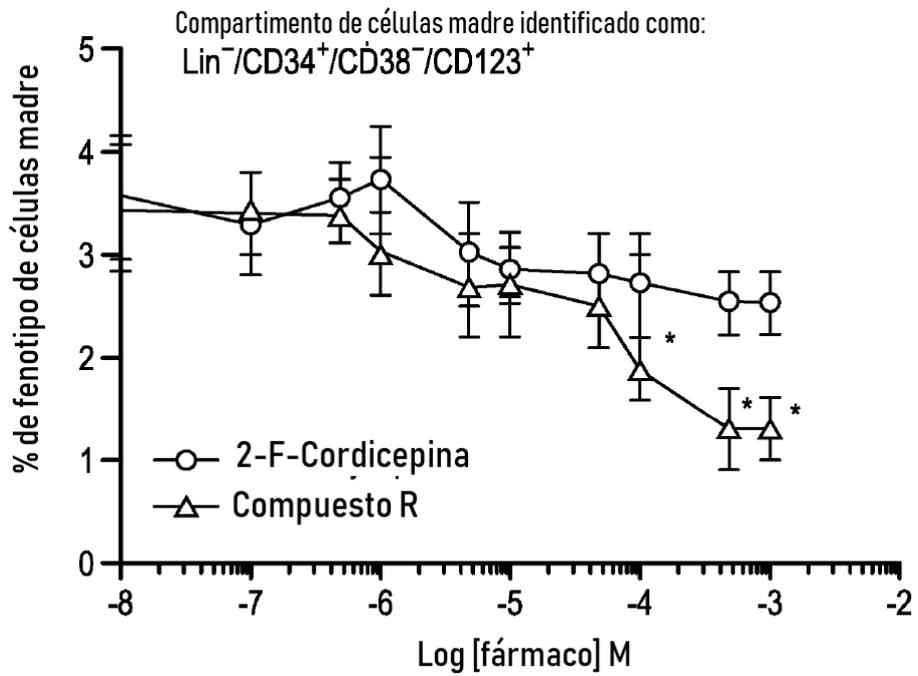
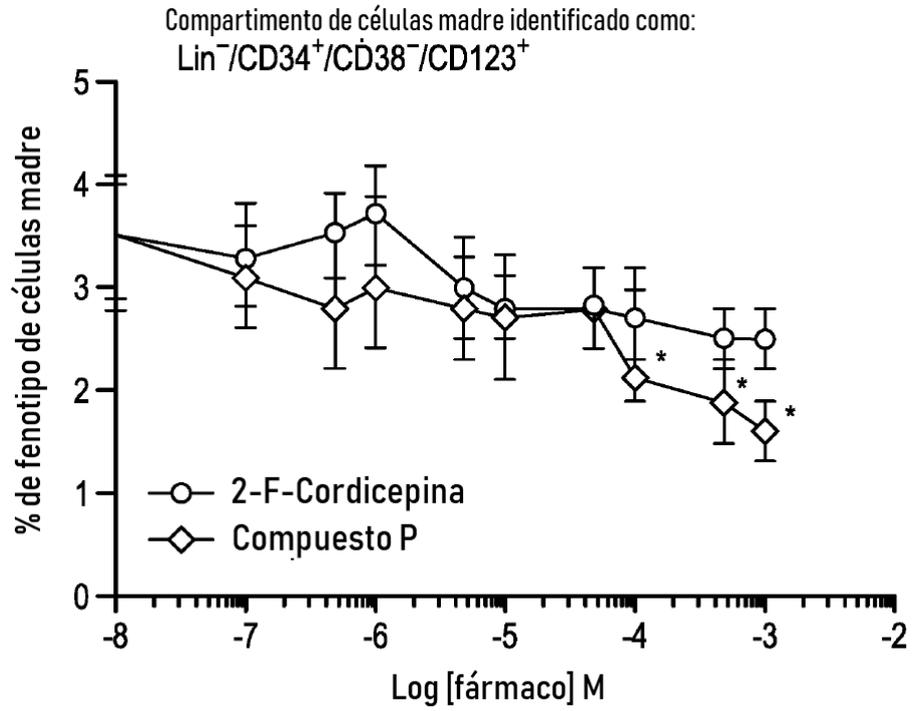


FIG. 4 (continuación)