

Clarke, Mo

COLON

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-158583-00007-0000

Fecha: 2013-05-24 15:29:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 111 112

P-3159

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **11.158.583**
Solicitud de patente a nombre de **GILEAD PHARMASSET LLC**

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 A No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **GILEAD PHARMASSET LLC**, solicitante de la patente de la referencia, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nueva memoria descriptiva.

En cuanto a estas modificaciones, atentamente nos permitimos manifestar que las mismas no amplían de ninguna manera la materia originalmente presentada en la solicitud en estudio.

Atentamente acompañamos el recibo de caja con el cual queda cubierta la tasa por la modificación de la solicitud, y formulario de modificaciones debidamente diligenciado.

Señor Superintendente,

DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

CC. 41.654.882

TP 20824 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

P-3159

- / -

Z.

**N-[2'R)-2'-DESOXI-2'-FLUORO-2'-METIL-P-FENIL-5'-URIDILIL]-L-ALANINA 1 METILETIL
ÉSTER Y PROCESO PARA SU PRODUCCIÓN**

Reivindicación de Prioridad

Se reivindica el derecho de prioridad para la Solicitud de Patente Provisional de E.U.A. No. 61/179,923, presentada el 20 de mayo de 2009, y 61/319,513, presentada el 31 de marzo de 2010, la materia objeto de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

Campo de la Invención

Se describen en la presente fosforamidatos de nucleósido y su uso como agente para tratar enfermedades víricas. Estos compuestos son inhibidores de la replicación vírica de ARN dependiente de ARN y son útiles como inhibidores de polimerasa NS5B del VHC, como inhibidores de replicación del VHC y para tratamiento de infección de hepatitis C en mamíferos.

Antecedentes de la Invención

La infección del virus de la hepatitis C (HCV, por sus siglas en inglés) es un problema de salud principal que lleva a enfermedad del hígado crónica, tal como cirrosis y carcinoma hepatocelular, en un número sustancial de individuos infectados, estimado para ser del 2-15% de la población a nivel mundial. Existen un estimado de 4.5 millones de personas infectadas solo en los Estados Unidos, de acuerdo con el Centro de los E.U.A. para el Control de la Enfermedad. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen más de 200 millones de individuos infectados a nivel mundial, con al menos 3 hasta 4 millones de personas que sean infectado cada año. Una vez infectados, alrededor de 20% de las personas eliminan el virus, pero el resto puede portar el VHC el resto de sus vidas. Diez hasta veinte por ciento de individuos infectados crónicamente eventualmente desarrollan cirrosis o cáncer que destruye el hígado. La enfermedad vírica se transmite parenteralmente por sangre contaminada y productos de sangre, agujas contaminadas, o sexualmente y verticalmente de madres infectadas o madres portadoras a

su hijo. Los tratamientos actuales para la infección del VHC, los cuales se restringen a la inmunoterapia con interferón α recombinante solo o en combinación con la ribavirina análoga de nucleósido, son de beneficio clínico limitado. Por lo tanto, no existe vacuna establecida para el VHC. En consecuencia, existe una necesidad urgente para agentes
5 terapéuticos mejorados que combatan efectivamente la infección del VHC crónica.

El virión del VHC es un virus de ARN de hebra positiva envuelto con una secuencia genómica de oligoribonucleótido sencilla de alrededor de 9600 bases las cuales codifican una poliproteína de alrededor de 3,010 aminoácidos. Los productos de proteína del gen del VHC consisten
10 de las proteínas estructurales C, E1, y E2, y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A y NS4B, y NS5A y NS5B. Las proteínas no estructurales (NS, por sus siglas en inglés) se consideran que proporcionan la maquinaria catalítica para replicación vírica. La proteasa NS3 libera NS5B, la polimerasa de ARN dependiente de ARN de la cadena de poliproteína. La polimerasa NS5B del VHC se requiere para la síntesis de un ARN de hebra doble de un ARN vírico de hebra sencilla que sirve como una plantilla en el ciclo de replicación del VHC. Por lo tanto, la polimerasa NS5B se considera para ser un componente esencial en el complejo de la replicación del VHC (K. Ishi, et al, *Heptology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118). La inhibición de polimerasa NS5B del VHC previene la formación del ARN del VHC de hebra doble y por lo tanto constituye un enfoque atractivo para el desarrollo de terapias antivíricas
15 específicas del VHC.

El VHC pertenece a una familia mucho más grande de virus que portan muchas características comunes.

Virus de Flaviviridae

La familia Flaviviridae de los virus comprende al menos tres
20 géneros distintos: *pestiviruses*, los cuales provocan enfermedad en ganado y cerdos; *flaviviruses*, los cuales son la causa primaria de las

enfermedades tales como fiebre por dengue y fiebre amarilla; y *hepaciviruses*, cuyo único miembro es el VHC. El género *flavivirus* incluye más de 68 miembros separados en grupos en la base de relaciones serológicas (Calisher et al., *J. Gen. Virol*, 1993, 70, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica (*Fields Virology*, Editores: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, PA, 1996, Capítulo 31, 931-959). Los *Flaviviruses* de interés mundial que se asocian con enfermedad humana incluyen los virus de Fiebre Hemorrágica por Dengue (DHF, por sus siglas en inglés), virus de fiebre amarilla, síndrome de choque y virus de la encefalitis Japonesa (Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med*, 1988, 319, 641-643).

El género *pestivirus* incluye virus de diarrea vírica en bovinos (BVDV, por sus siglas en inglés), virus de fiebre de cerdo clásico (CSFV, por sus siglas en inglés, también nombrada virus de cólera de cerdo) y virus de la enfermedad de la frontera (BDV, por sus siglas en inglés) de oveja (Moennig, V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Las infecciones de *pestivirus* de ganado domesticado (reses, cerdos y ovejas) provocan pérdidas económicas importantes a nivel mundial. El BVDV provoca enfermedad de la mucosa en reses y es importancia económica significativa para la industria del ganado (Meyers, G. and Thiel, H.J., *Advances in Virus Research*, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al, *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Los *pestiviruses* humanos no se han caracterizado extensivamente como los *pestiviruses* animales. Sin embargo, las inspecciones serológicas indican exposición a *pestivirus* considerables en humanos.

Los *pestiviruses* y *hepaciviruses* son grupos de virus relacionados estrechamente dentro de la familia *Flaviviridae*. Otros virus relacionados estrechamente en esta familia incluyen el GB de virus A, GB de agente tipo virus A, GB de virus B y GB de virus C (también nombrados virus de hepatitis G, HGV, por sus siglas en inglés). El grupo *hepacivirus* (virus de la hepatitis C; VHC) consiste de un número

de virus relacionados estrechamente pero distinguibles genotípicamente que infectan humanos. Existen al menos 6 genotipos del VHC y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre los pestiviruses y hepaticiviruses, combinados con la pobre capacidad de hepaticiviruses para crecer eficientemente en el cultivo celular, el virus de diarrea vírica en bovinos (BVDV) se usa a menudo como un sustituto para estudiar el virus VHC.

La organización genética de pestiviruses y hepaticiviruses es muy similar. Estos virus de ARN de hebra positiva poseen una estructura de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) grande sencilla que codifica todas las proteínas víricas necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que se co- y post-procesa traduccionalmente por proteinasas que codifican tanto el virus como celulares para proporcionar las proteínas víricas maduras. Las proteínas víricas responsables para la replicación del ARN genómico vírico se ubican dentro de aproximadamente la terminal carboxi. Dos tercios de las ORF son proteínas no estructurales (NS) terminadas. La organización genética y el procesamiento de poliproteína de la porción de proteína no estructural de la ORF para pestiviruses y hepaticiviruses son muy similares. Para tanto los pestiviruses como hepaticiviruses, las proteínas no estructurales (NS) maduras, en orden secuencial de la terminal amino de la región que codifica la proteína no estructural para la terminal carboxi de la ORF, consisten de p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B.

Las proteínas NS de pestiviruses y hepaticiviruses portan dominios de secuencia que son característicos de las funciones de la proteína específica. Por ejemplo, las proteínas NS3 de virus en ambos grupos poseen porciones de secuencia de aminoácidos característicos de las serina proteinasas y de helicasas (Gorbalenya et al., *Nature*, 1988, 333, 22; Bazan and Fletterick *Virology*, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya et al., *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3889-3897). Similarmente, las proteínas NS5B de pestiviruses y hepaticiviruses tienen las porciones características de polimerasas de ARN dirigidas al ARN (Koonin, E.V.

and Dolja, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Los papeles y funciones actuales de las proteínas NS de pestiviruses y hepaciviruses en el ciclo de vida de los virus son análogos directamente. En ambos casos, la serina proteínasa NS3 es responsable para todo el procesamiento proteolítico de los precursores de poliproteína cadena abajo de su posición en la ORF (Wiskerchen and Collett, *Virology*, 1991, 184, 341-350; Bartenschlager et al., *J. Virol.* 1993, 67, 3835-3844; Eckart et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993, 192, 399-406; Grakoui et al., *J. Virol.* 1993, 67, 2832-2843; Grakoui et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 10583-10587; Hijikata et al., *J. Virol.* 1993, 67, 4665-4675; Tome et al., *J. Virol.*, 1993, 67, 4017-4026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager et al., *J. Virol.* 1994, 68, 5045-5055; Failla et al., *J. Virol.* 1994, 68, 3753-3760; Xu et al., *J. Virol.*, 1997, 71:53 12-5322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, 215, 160-166; Jin and Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 323, 47-53; Warrenner and Collett, *J. Virol.* 1995, 69, 1720-1726). Finalmente, las proteínas NS5B de pestiviruses y hepaciviruses tienen la actividad de polimerasas de ARN dirigidas de ARN predichas (Behrens et al., *EMBO*, 1996, 15, 12-22; Lechmann et al., *J. Virol.*, 1997, 71, 8416-8428; Yuan et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997, 232, 231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; Zhong et al., *J. Virol.*, 1998, 72, 9365-9369).

Actualmente, existen opciones de tratamiento limitadas para individuos infectados con el virus de la hepatitis C. La opción terapéutica aprobada actualmente es el uso de inmunoterapia con interferón α recombinante solo o en combinación con la ribavirina análoga de nucleósido. Esta terapia se limita en su efectividad clínica y solamente 50% de pacientes tratados responden a la terapia. Por lo tanto, existe una necesidad importante para terapias más efectivas y novedosas para dirigir la necesidad médica no cumplida que presenta la infección del VHC.

Un número de objetivos moleculares potenciales para el desarrollo del fármaco de antivirales de acción directa como terapéuticos anti-VHC se han identificado ahora incluyendo, pero no limitado a, la autoproteasa NS2-NS3, la proteasa N3, la helicasa N3 y la polimerasa NS5B. La polimerasa de ARN dependiente de ARN es absolutamente esencial para la replicación del genoma de ARN, de sentido positivo, de hebra sencilla y esta enzima ha obtenido un interés importante entre los químicos medicinales.

Los inhibidores de NS5B del VHC como terapias potenciales para la infección del VHC se han revisado: Tan, S.-L., et al., *Nature Rev. Drug Discov.*, 2002, 1, 867-881; Walker, M.P. et al., *Exp. Opin. Investigational Drugs*, 2003, 12, 1269-1280; Ni, Z.-J., et al., *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2004, 7, 446-459; Beaulieu, P. L., et al., *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2004, 5, 838-850; Wu, J., et al., *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2003, 3, 207-219; Griffith, R.C., et al., *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 2004, 39, 223-237; Carrol, S., et al., *Infectious Disorders-Drug Targets*, 2006, 6, 17-29. El potencial para la emergencia de cepas del VHC resistentes y la necesidad para identificar agentes con cobertura del genotipo amplio soporta la necesidad para continuar los esfuerzos para identificar nucleósidos novedosos y más efectivos como los inhibidores NS5B del VHC.

Los inhibidores de nucleósido de la polimerasa NS5B pueden actuar ya sea como un sustrato no natural que resulta en la terminación de cadena o como un inhibidor competitivo el cual compete con el nucleótido enlazado a la polimerasa. Para funcionar como un terminador de cadena el análogo nucleósido deberá tomarse por la célula y convertirse *in vivo* a un trifosfato para competir por el sitio enlazado al nucleótido de polimerasa. Esta conversión al trifosfato está comúnmente mediada por cinasas celulares las cuales imparten requerimientos estructurales adicionales en un inhibidor de polimerasa de nucleósido potencial. Desafortunadamente, esto limita la evaluación directa de los nucleósidos como inhibidores de replicación del VHC para

ensayos con base en células capaces de la fosforilación *in situ*.

En algunos casos, la actividad biológica de un nucleósido se dificulta por sus características de sustrato pobres para una o más de las cinasas que necesitan convertirse a la forma de trifosfato activa. La formación del monofosfato por un nucleósido cinasa se visualiza
 5 generalmente como la velocidad que limita la etapa de los tres eventos de fosforilación. Para sortear la necesidad para la etapa de fosforilación inicial en el metabolismo de un nucleósido para el análogo trifosfato activo, se ha reportado la preparación de profármacos de fosfato estables. Los profármacos de fosforamidato de
 10 nucleósido se han mostrado para ser precursores del trifosfato nucleósido activo y para inhibir la replicación vírica cuando se administran a células enteras infectadas víricas (McGuigan, C., et al., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., et al., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., et al., *Proc. National Acad Sci USA*, 1996, 93, 7295-7299; Siddiqui, A. Q., et al., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4122-4128; Eisenberg, E. J., et al., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, 20, 1091-1098; Lee, W.A., et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49, 1898); US 2006/0241064; y WO 2007/095269.

También se limita la utilidad de los nucleósidos como agentes terapéuticos viables algunas veces por sus propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas pobres. Estas propiedades pobres pueden limitar la absorción intestinal de un agente y limitar la absorción en el tejido o célula objetivo. Para mejorar en sus propiedades se han empleado
 15 profármacos de nucleósidos. Se ha demostrado que la preparación de fosforamidatos de nucleósido mejora la absorción sistémica de un nucleósido y además, la porción de fosforamidato de estos "pronucleótidos" se enmascara con grupos lipofílicos neutrales para obtener un coeficiente de división adecuado para optimizar la absorción y transporte en la célula que potencia dramáticamente la concentración
 20 intracelular del análogo de monofosfato de nucleósido relativo para administrar el nucleósido precursor solo. La hidrólisis mediada por la

enzima de la porción de éster de fosfato produce un monofosfato de nucleósido en donde la velocidad que limita la fosforilacion inicial se innecesaria. Para este final, la Solicitud de Patente de E.U.A. 12/053,015, la cual corresponde a WO 2008/121634 y US 2010/0016251, describe un número de de profármacos de nucleósido de fosforamidato, muchos de los cuales muestran actividad en un ensayo del VHC. Diversos compuestos descritos en US 2010/0016251 se probaron como un candidato clínico potencial para la aprobación por el FDA.

Sumario de la Invención

Se describe en la presente un compuesto representado por la fórmula 4 y sus respectivos diaestereómeros basados en fósforo representados por las fórmulas S_P-4 and R_P-4 .

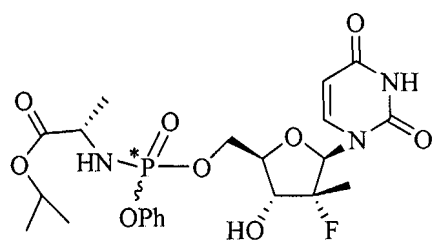
10

15

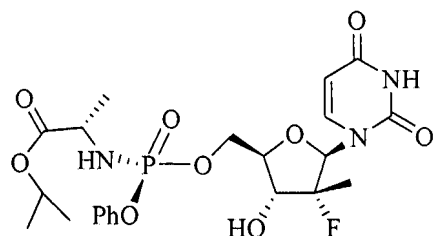
20

25

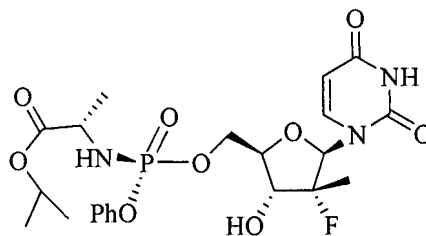
7.0



4



Sp-4



Rp-4

Breve Descripción de las Figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 10. Estructura de Cristal de Rayos X para **S_p-4** (Forma 1)

Figura 11. Estructura (Isotrópica) de Cristal de Rayos X para **S_p-4 · CH₂Cl₂** (Forma 2)

Figura 12. Estructura (Anisotrópica) de Cristal de Rayos X para **S_p-4 · CH₂Cl₂** (Forma 2)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Descripción Detallada de la Invención

Definiciones

La frase "el/la" o "un/una" entidad como se usa en la presente se refiere a uno o más de tal entidad; por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos o al menos un compuesto. Como tal, los términos "el/la" (o "un/una"), "uno o más", y "al menos uno" se pueden usar intercambiabilmente en la presente.

Los términos "opcional" u "opcionalmente" como se usa en la presente significa que un evento o circunstancia que se describe a continuación puede pero puede no presentarse, y que la descripción incluye casos donde el evento o circunstancia ocurren y casos en los que no lo hace. Por ejemplo, "enlace opcional" significa que el enlace puede o no estar presente, y que la descripción incluye enlaces sencillo, doble, o triple.

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

El término "purificado," como se describe en la presente, se refiere a la pureza de un compuesto dado. Por ejemplo, un compuesto se "purifica" cuando el compuesto dado es un componente importante de la composición, esto es, al menos 50% p/p puro. Así, "purificado" abarca al menos 50% p/p de pureza, al menos 60% p/p de pureza, al menos 70% de pureza, al menos 80% de pureza, al menos 85% de pureza, al menos 90% de pureza, al menos 92% de pureza, al menos 94% de pureza, al menos 96% de pureza, al menos 97% de pureza, al menos 98% de pureza, al menos 99% de pureza, al menos 99.5% de pureza, y al menos 99.9% de pureza, en donde

"sustancialmente puro" abarca al menos 97% de pureza, al menos 98% de pureza, al menos 99% de pureza, al menos 99.5% de pureza, y al menos 99.9% de pureza.

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

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

La expresión "sustancialmente como se muestra en..." un patrón XRPD especificado significa que las posiciones pico mostradas en el patrón XRPD son sustancialmente las mismas, dentro de la inspección visual o recurrir a listas pico seleccionadas ($\pm 0.2^\circ 2\theta$). Alguien de experiencia ordinaria entenderá que las intensidades pueden variar dependiendo de la muestra.

El término "sustancialmente anhidro" significa que una sustancia contiene como mucho 10% en peso de agua, preferiblemente como mucho 1% en peso de agua, más preferiblemente como mucho 0.5% en peso de agua, y más preferiblemente como mucho 0.1% en peso de agua.

Un solvente o anti-solvente (como se usa en las reacciones, cristalización, etc. o solventes de red y/o absorbidos) incluye al menos uno de un alcohol C_1 hasta C_8 , un éter C_2 hasta C_8 , un C_3 hasta C_7 cetona, un éster C_3 hasta C_7 , un clorocarbono C_1 hasta C_2 , un nitrilo C_2 hasta C_7 , un solvente diverso, un C_5 hasta C_{12} hidrocarburo saturado, y un hidrocarburo aromático C_6 hasta C_{12} .

El alcohol C_1 hasta C_8 se refiere a un alcohol recto/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número de carbonos. El alcohol C_1 hasta C_8 incluye, pero no se limita a, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, hexanol, y ciclohexanol.

El éter C_2 hasta C_8 se refiere a un éter recto/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número de carbonos. El éter C_2 hasta C_8 incluye, pero no se limita a, éter de dimetilo, éter de dietilo, éter de di-isopropilo, éter de di-n-butilo, éter de metil-t-butilo (MTBE),

tetrahidrofurano, y dioxano.

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

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

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

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

Un solvente diverso se refiere a un solvente comúnmente empleado en química orgánica, que incluye, pero no se limita a, dietilen glicol, diglima (dietilen glicol dimetil éter), 1,2-dimetoxi-etano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilen glicol, glicerina, hexametilfosforamida, triame de hexametilfósforo, N-metil-2-pirrolidinona, nitrometano, piridina, trietil amina, y ácido acético.

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

El término aromático C₆ hasta C₁₂ se refiere a hidrocarburos sustituidos y no sustituidos que tienen un grupo fenilo como su estructura. Los hidrocarburos preferidos incluyen benceno, xileno, tolueno, clorobenceno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, xilenos, con tolueno que es más preferido.

20 El término "halo" o "halógeno" como se usa en la presente, incluye cloro, bromo, yodo y fluoro.

El término "grupo de bloqueo" se refiere a un grupo químico que exhibe las siguientes características. El "grupo" se deriva de un "compuesto de protección." Los grupos que son selectivos para hidroxilos primarios sobre hidroxilos secundarios que se pueden poner bajo condiciones compatibles con la estabilidad del fosforamidato (pH 2-8) y difunden en el producto resultante substancialmente diferente de las propiedades físicas que se permiten para una separación más fácil del producto del grupo 3'-fosforamidato-5'-nuevo del compuesto deseado sin reaccionar. El grupo debe reaccionar selectivamente en buen rendimiento para dar un substrato protegido que es estable a las reacciones proyectadas (ver Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed. T. W. Greene and P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1999). Los ejemplos de grupos incluyen, pero no se limitan a: benzoil, acetil, fenil-benzoilo sustituido, tetrahidropiraniilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-il), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-il) o 9-(p-metoxifenil)xantina-9-il (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, tert-butildimetilsililo, tert-butildifenilsililo. Los acetales, tal como MOM o THP y similares se consideran posibles grupos. Los compuestos fluorados se contemplan también en la medida en que pueden enlazarse al compuesto y se pueden remover selectivamente al pasar a través de un medio de extracción de fase sólida de flúor (FluoroFlash®). Un ejemplo específico incluye un análogo de tritilo fluorado, 1-[4-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)fenil)-1,1-difenilmetanol de análogo de tritilo. Otros análogos fluorados de tritilo, BOC, FMOC, CBz, etc. se contemplan también. Los cloruros de sulfonilo tipo cloruro de p-toluensulfonilo pueden reaccionar selectivamente en la posición 5'. Los ésteres se podrían formar selectivamente tal como acetatos y benzoatos. Los anhídridos dicarboxílicos tales como anhídrido succínico y sus derivados se pueden usar para generar un éster ligado con un ácido carboxílico libre, tales ejemplos incluyen, pero no se limitan a oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, adipilo, pimelilo, superilo,

azelailo, sebacilo, ftalilo, isoftalilo, tereftalilo, etc. El ácido carboxílico libre aumenta drásticamente la polaridad y se puede también usar como una palanca para extraer el producto de reacción en fases acuosas moderadamente básicas tal como soluciones de bicarbonato de sodio. El grupo de fosforamidato es relativamente estable en medio
5 ácido, por lo que los grupos requieren condiciones de reacción ácidas, tal como, tetrahidropiranilo, también se podría usar.

El término "grupo protector" que se deriva de un "compuesto de protección," tiene sus significado simple y ordinario, esto es, al menos un grupo de protección o de bloqueo se enlaza a al menos un grupo funcional (por ejemplo, -OH, -NH₂, etc.) que permite modificación
10 química de al menos otro grupo funcional. Los ejemplos de grupos protectores, incluyen, pero no se limitan a, benzoilo, acetilo, fenilbenzoilo sustituido, tetrahidropiranilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritil), MMT (4-monometoxitritil), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-il), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-il) o 9-(p-metoxifenil)xantina-9-il (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, C(O)O(alquilo inferior), C(O)O(alquilenos inferior)arilo (por ejemplo, -C(O)OCH₂Ph), C(O)Oarilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, un grupo protector que comprende al menos uno átomo de silicio, tal como, tert-butildimetilsililo, tert-butildifenilsililo, Si(alquilo inferior)₂OSi(alquilo inferior)₂OH (tal como, -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH).

El término "compuesto de protección," como se usa en la presente y a menos que se defina de otra manera, se refiere a un compuesto que contiene un "grupo protector" y que es capaz de reaccionar con un
15 compuesto que contiene grupos funcionales que son capaces de protegerse.

El término "grupo de partida", como se usa en la presente, tiene el mismo significado para el experto artesano (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure-Fourth Edition by Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992 páginas 351-357) y representa un
20 grupo que es parte de y enlazado a una molécula de sustrato; en una reacción donde la molécula de sustrato se somete a una reacción de

desplazamiento (con por ejemplo un nucleófilo), el grupo de partida se desplaza luego. Los ejemplos de grupos de partida incluyen, pero no se limitan a: halógeno (F, Cl, Br, y I), preferiblemente Cl, Br, o I; tosilato, mesilato, triflato, acetato, canforsulfonato, ariloxido, y ariloxido sustituido con al menos un electrón que retira al grupo (por ejemplo, p-nitrofenóxido, 2-clorofenóxido, 4-clorofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, pentafluorofenóxido, etc.), etc. El término "electrón que retira al grupo" se registra su significado simple aquí. Los ejemplos de electrón que retira a los grupos incluye, pero no se limitan a, un halógeno, -NO₂, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)(arilo), -C(O)O(alquilo inferior), -C(O)O(arilo), etc.

El término "reactivo básico", como se usa en la presente, significa un compuesto que es capaz de desprotonación de un grupo hidroxilo. Los ejemplos de reactivos básicos incluyen, pero no se limitan a, un (alc inferior)óxido ((alquilo inferior)OM) en combinación con un solvente alcohólico, donde (alqu inferior)óxidos incluyen, pero no se limitan a, MeO⁻, EtO⁻, ⁿPrO⁻, ⁱPrO⁻, ^tBuO⁻, ⁱAmO⁻ (iso-amilóxido), etc., y donde M es un catión de metal alcalino, tal como Li⁺, Na⁺, K⁺, etc. Los solventes alcohólicos incluyen (alquilo inferior)OH,, tal como, por ejemplo, MeOH, EtOH, ⁿPrOH, ⁱPrOH, ^tBuOH, ⁱAmOH, etc. Las bases sin alcoxi se pueden también usar tal como hidruro de sodio, hexametildisilazano de sodio, hexametildisilazano de litio, diisopropilamida de litio, hidruro de calcio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, DBU, DBN, reactivos Grignard, tal como (alquilo inferior)Mg(halógeno), que incluye pero no se limitan a MeMgCl, MeMgBr, ^tBuMgCl, ^tBuMgBr, etc.

El término "base" abarca el término "reactivo básico" y significa ser un compuesto que es capaz de desprotonación de un protón que contiene compuesto, esto es, una base Bronsted. Además de los ejemplos recitados anteriormente, ejemplos adicionales de una base incluyen, pero no se limitan a piridina, colidina, 2,6-(alquilo inferior)-piridina, dimetil-anilina, imidazol, N-metil-imidazol, pirazol, N-metil-pirazol, trietilamina, di-isopropiletilamina, etc.

El término "electrón que retira al grupo" se registra su significado simple. Los ejemplos de electrón que retira a los grupos incluyen, pero no se limitan a, un halógeno (F, Cl, Br, o I), $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{alquilo inferior})$, $-\text{C}(\text{O})(\text{arilo})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{alquilo inferior})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{arilo})$, etc.

5 El término "co-cristalatos" incluyen co-cristalatos de **4**, R_p -**4**, o S_p -**4** en combinación con sales, que abarcan sales farmacéuticamente aceptables.

10 El término "sales," como se describe en la presente, se refiere a un compuesto que comprende un catión y un anión, que se puede producir por la protonación de una porción que acepta protón y/o desprotonación de una porción que dona protón. Se debe notar que la protonación de la porción que acepta protón resulta en la formación de una especie catiónica en la que la carga se equilibra por la presencia de un anión fisiológico, mientras que la desprotonación de la porción que dona el protón resulta en la formación de una especie aniónica en la que la carga se equilibra por la presencia de un catión fisiológico.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de adición ácida, formadas con ácidos orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromohídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietansulfónico, ácido bencensulfónico, ácido 4-clorobencensulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido camforsulfónico, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido salicílico, ácido mucónico, y
15 similares o (2) sales de adición básica formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos orgánicos enlistados
20

anteriormente, en donde las bases de conjugado comprenden un componente catiónico seleccionado de entre Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , $\text{NH}_3\text{R}'''_{4-g}^+$, en el cual R''' es un alquilo C_{1-3} y g es un número seleccionado de entre 0, 1, 2, 3, ó 4. Se debe entender que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de solvente (solvatos) o formas de cristal (polimorfos) como se define en la presente, de la misma sal de adición ácida.

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

El término "alquenilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo no sustituido que tiene desde 2 hasta 10 átomos de carbono que tiene uno o dos enlaces dobles olefínicos, preferiblemente un enlace doble olefínico. El término "alquenilo C_{2-N} " se refiere a un alquenilo que comprende 2 hasta N átomos de carbono, donde N es un entero que tiene los siguientes valores: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10. El término "alquenilo C_{2-10} " se refiere a un alquenilo que comprende 2

hasta 10 átomos de carbono. El término "alquenilo C₂₋₄" se refiere a un alquenilo que comprende 2 hasta 4 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alil) o 2-butenilo (crotilo).

El término "arilo," como se usa en la presente, y a menos que se especifique de otra manera, se refiere a fenilo sustituido o no sustituido (Ph), bifenilo, o naftilo, preferiblemente el término arilo se refiere a fenilo sustituido o no sustituido. El grupo arilo se puede sustituir con una o más porciones seleccionadas de entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, y fosfonato, ya sea no protegido, o protegido como sea necesario, como se conoce por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

El término "arilóxido," como se usa en la presente, y a menos que se especifique de otra manera, se refiere a fenóxido sustituido o no sustituido (PhO-), p-fenil-fenóxido (p-Ph-PhO-), o naftóxido, preferiblemente el término arilóxido se refiere a fenóxido sustituido o no sustituido. El grupo arilóxido se puede sustituir con una o más porciones seleccionadas de entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)O(alquilo inferior), amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, y fosfonato, ya sea desprotegido, o protegido como sea necesario, como se conoce por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Grupos in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

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

El término "excipiente" como se usa en la presente se refiere a

un compuesto que se usa para preparar una composición farmacéutica, y es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otra manera indeseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como uso farmacéutico humano.

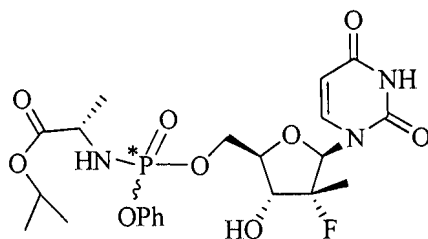
El término "cristalino" se refiere a una situación donde una muestra sólida de ya sea S_p-4 o R_p-4 tiene características cristalinas cuando se determina por difracción en polvo de rayos X o una técnica de rayos X de cristal sencillo.

El término "tipo cristal" se refiere a una situación donde una muestra sólida de ya sea S_p-4 o R_p-4 tiene características cristalinas cuando se determina por uno de los medios, por ejemplo, visualmente o por microscopía óptica o polarizada, pero no tiene características cristalinas cuando se determina por otros medios, por ejemplo, difracción en polvo de rayos X. Los métodos para determinar visualmente la cristalinidad de una muestra sólida por microscopía visual o por microscopía óptica o por microscopía polarizada se describen en USP <695> y <776>, ambos de los cuales se incorporan por referencia. Una muestra sólida de ya sea S_p-4 o R_p-4 que es "tipo cristal" puede ser cristalina bajo ciertas condiciones pero puede convertirse en no cristalina cuando se somete a otras condiciones.

El término "amorfo" se refiere a una situación donde una muestra sólida de ya sea S_p-4 o R_p-4 no es ni cristalina ni tipo cristal.

Modalidades

Una primera modalidad se dirige a un compuesto representado por la fórmula 4:

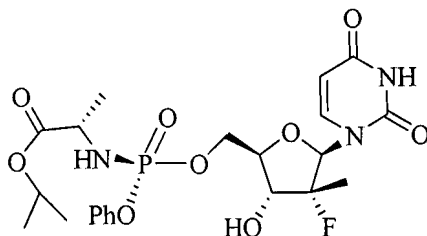


4

en donde P^* representa un átomo de fósforo quiral. Debido al átomo de fósforo quiral, el compuesto representado por la fórmula 4

comprende dos diaestereómeros designados como R_p-4 y S_p-4 . El compuesto representado por la fórmula 4 puede también ser parte de un solvato, un hidrato, o un solvato/hidrato mezclado. El solvato se designa como $4 \cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $4 \cdot mH_2O$, donde S es un solvente de red, n varía por una cantidad de entero o no de entero desde alrededor de 0 hasta alrededor de 3 y m varía por una cantidad de entero o no de entero desde alrededor de 0 hasta alrededor de 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula 4 podría no existir como un solvato o hidrato, pero tiene una cierta cantidad de ventaja de solvente adsorbido (S) o agua. En cuyo caso, la cantidad de S o agua puede variar desde alrededor de 0% en peso hasta alrededor de 10% en peso basado en el peso del compuesto representado por la fórmula 4. El compuesto representado por la fórmula 4 y sus solvatos e hidratos de los mismos es cristalino, tipo cristal, o amorfo.

Una segunda modalidad se dirige a un compuesto representado por la fórmula R_p-4 :



R_p-4

El compuesto representado por la fórmula R_p-4 puede también ser parte de un solvato, un hidrato, o un solvato/hidrato mezclado. El solvato se designa como $R_p-4 \cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $S_p-4 \cdot mH_2O$, donde S es un solvente de red, n varía por una cantidad de entero o no de entero desde alrededor de 0 hasta alrededor de 3 y m varía por una cantidad de entero o no de entero desde alrededor de 0 hasta alrededor de 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula R_p-4 podría no existir como un solvato, hidrato, o solvato/hidrato mezclado, pero tiene una cierta cantidad de ventaja de solvente adsorbido (S), agua, o ambos S y agua. En cuyo caso, la cantidad de S o agua puede variar desde alrededor de 0 % en peso hasta alrededor de 10 % en peso basado en el peso del compuesto representado

22

por la fórmula R_p-4 . El compuesto representado por la fórmula R_p-4 y sus solvatos e hidratos de los mismo es cristalino, tipo cristal, o amorfo.

Un primer aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 cristalino.

5 Un segundo aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^\circ$) en alrededor de: 6.6, 7.1, 9.0, 11.6, 17.9, 20.7, 24.1, 24.4, y 26.2.

10 Un tercer aspecto de la segunda modalidad se dirige a un R_p-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^\circ$) en alrededor de: 6.6, 7.1, 9.0, 11.0, 11.6, 12.0, 16.0, 17.9, 19.6, 20.7, 21.0, 21.7, 21.9, 22.2, 23.1, 24.1, 24.4, 26.1, 27.3, 27.7, y 28.2.

Un cuarto aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 cristalino que tiene un patrón de difracción XRPD substancialmente como se muestra en la Fig. 2.

Un quinto aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 que tiene los siguientes picos FT-IR (cm^{-1}): 1742, 1713, 1679, 1460, 1377, 1259, 1157, y 1079.

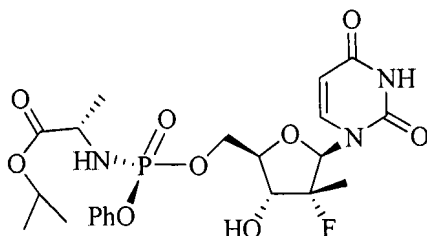
Un sexto aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 que tiene un espectro FT-IR substancialmente como se muestra en la Fig. 15.

Un séptimo aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 substancialmente puro.

Un octavo aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 cristalino substancialmente puro.

15 Un noveno aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_p-4 amorfo substancialmente puro.

Una tercera modalidad se dirige a un compuesto representado por la fórmula S_p-4 :



S_p-4

El compuesto representado por la fórmula S_p-4 puede también ser parte de un solvato, un hidrato, o un solvato/hidrato mezclado. El solvato se designa como $S_p-4 \cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $S_p-4 \cdot mH_2O$, donde S es un solvente de red, n varía en una cantidad de entero o no de entero desde alrededor de 0 hasta alrededor de 3 y m varía en una cantidad de entero o no de entero desde alrededor de 0 hasta alrededor de 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula S_p-4 podría no existir como un solvato o hidrato, pero tiene una cierta cantidad de ventaja de solvente adsorbido (S) o agua. En cuyo caso, la cantidad de S o agua puede variar desde alrededor de 0 % en peso hasta alrededor de 10 % en peso basado en el peso del compuesto representado por la fórmula S_p-4 . El compuesto representado por la fórmula S_p-4 y sus solvatos e hidratos de los mismos es cristalino, tipo cristal, o amorfo.

Un primer aspecto de la tercera modalidad se dirige a S_p-4 cristalino.

Un segundo aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino monoclinico, preferiblemente que tiene los siguientes parámetros de célula unitaria $a \sim 12.88 \text{ \AA}$, $b \sim 6.17 \text{ \AA}$, $c \sim 17.73 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 92.05^\circ$.

Un tercer aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino monoclinico, preferiblemente que tiene los siguientes parámetros de célula unitaria $a \sim 20.09 \text{ \AA}$, $b \sim 6.10 \text{ \AA}$, $c \sim 23.01 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 112.29^\circ$.

Un cuarto aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino monoclinico, preferiblemente que tiene los siguientes parámetros de célula unitaria $a \sim 12.83 \text{ \AA}$, $b \sim 6.15 \text{ \AA}$, $c \sim 17.63 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 91.75^\circ$.

Un quinto aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino monoclinico, preferiblemente que tiene los siguientes parámetros de célula unitaria $a \sim 12.93 \text{ \AA}$, $b \sim 6.18 \text{ \AA}$, $c \sim 18.01 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 96.40^\circ$.

Un sexto aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4

cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^{\circ}$) en alrededor de: 5.2, 7.5, 9.6, 16.7, 18.3, 22.2.

Un séptimo aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^{\circ}$) en alrededor de: 5.0, 7.3, 9.4, y 18.1.

5 Un octavo aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^{\circ}$) en alrededor de: 4.9, 6.9, 9.8, 19.8, 20.6, 24.7, y 26.1.

Un noveno aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^{\circ}$) en alrededor de: 6.9, 9.8, 19.7, 20.6, y 24.6.

10 Un noveno aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^{\circ}$) en alrededor de: 5.0, 6.8, 19.9, 20.6, 20.9, y 24.9.

Un décimo aspecto de la tercera modalidad se dirige a un S_p-4 cristalino que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^{\circ}$) en alrededor de: 5.2, 6.6, 7.1, 15.7, 19.1, y 25.0.

Un decimoprimer aspecto de la tercera modalidad se dirige a S_p-4 cristalino que tiene un patrón de difracción XRPD substancialmente como se muestra en cualquiera de la Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, y Fig. 8.

Un decimosegundo aspecto de la tercera modalidad se dirige a S_p-4 que tiene los siguientes picos FT-IR (cm^{-1}) en alrededor de: 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208, y 1082.

15 Un decimotercero aspecto de la tercera modalidad se dirige a S_p-4 que tiene un espectro FT-IR substancialmente como se muestra en la Fig. 7.

Un decimocuarto aspecto de la tercera modalidad se dirige a sustancialmente S_p-4 puro.

Un decimoquinto aspecto de la tercera modalidad se dirige a S_p-4 cristalino sustancialmente puro.

20 Un decimosexto aspecto de la tercera modalidad se dirige a S_p-4 amorfo sustancialmente puro.

Dosis, Administración, y Uso

Una cuarta modalidad se dirige a una composición para el tratamiento y/o profilaxis de cualquiera de los agentes víricos usando cualquiera de los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4. Los posibles agentes víricos incluyen, pero no se limitan a: virus de hepatitis C, virus de hepatitis B, virus de Hepatitis A, virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, virus de dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la diarrea vírica bovina, virus de encefalitis Japonesa, o aquellos virus que pertenecen a los grupos de Pestivirus, hepacivirus, o flavavirus.

Un aspecto de esta modalidad se dirige a una composición para el tratamiento de cualquiera de los agentes víricos descritos en la presente tal composición comprende un medio farmacéuticamente aceptable seleccionado de entre un excipiente, portador, diluyente, y medio equivalente y cualquiera de los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4, que se pretende incluir sus hidratos, solvatos, y cualquiera de las formas cristalinas de cualquiera de los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4 o sus hidratos y solvatos de los mismos.

Los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4 se pueden formular independientemente en una amplia variedad de formas de dosificación de administración oral y portadores. La administración oral puede ser en la forma de tabletas, tabletas recubiertas, capsulas de gelatina dura y suave, soluciones, emulsiones, jarabes, o suspensiones. Los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4 son eficaces cuando se administra por la administración de supositorio, entre otras vías de administración. La manera más conveniente de administración es generalmente oral usando un régimen de dosificación diaria conveniente que se puede ajustar de acuerdo a la severidad de la enfermedad y la respuesta del paciente a la medicación antiviral.

Los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4 junto con uno o más excipientes convencionales, portadores, o diluyentes, se pueden poner en la forma de composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias. Las

composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitarias se pueden comprender de ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos activos adicionales y las formas de dosificación unitarias pueden contener cualquier cantidad efectiva adecuada del ingrediente activo en relación con el rango de dosificación diaria pretendido a emplearse. Las composiciones farmacéuticas se pueden emplear como sólidos, tal como comprimidos o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o líquidos tal como suspensiones, emulsiones, o cápsulas rellenas para uso oral; o en la forma de supositorios para administración rectal o vaginal. Una preparación típica contendrá desde alrededor de 5% hasta alrededor de 95% de compuestos o compuesto activo (p/p).

Los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4 se pueden administrar solos pero generalmente se administran en mezcla con uno o más excipientes farmacéuticos adecuados, diluyentes o portadores seleccionados con respecto a la vía pretendida de administración y práctica farmacéutica estándar.

Las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, píldoras, capsulas, supositorios, y gránulos dispersables. Un portador sólido puede ser una o más sustancias que pueden también actuar como diluyentes, agentes saborizantes, solubilizadores, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservadores, comprimido de agentes desintegrantes, o un material de encapsulación. En polvos, el portador generalmente es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En comprimidos, el componente activo generalmente se mezcla con el portador que tiene la necesaria capacidad de enlace en proporciones adecuadas y compactado en la forma y tamaño deseado. Los portadores adecuados incluyen pero no se limitan a carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de baja fusión, manteca de cacao, y similares. Las

preparaciones en forma sólida pueden contener, además del componente activo, colorantes, saborizantes, estabilizadores, soluciones amortiguadoras, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares. Los ejemplos de formulaciones sólidas se ejemplifican en EP 0524579; US 2002/0142050; 5 US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360; US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; US 6,267,985; US 6,294,192; US 6,383,471; US 6,395,300; US 6,569,463; US 6,635,278; US 6,645,528; US 6,923,988; US 6,932,983; US 7,060,294; y US 7,462,608, cada una de las cuales se incorpora como referencia.

10 Las formulaciones líquidas también son adecuadas para administración oral incluyen formulación líquida que incluye emulsiones, jarabes, elixires y suspensiones acuosas. Estas incluyen preparaciones en forma sólida que se pretenden que se conviertan a preparaciones de forma líquida poco antes de su uso. Los ejemplos de formulación líquida se ejemplifican en las Patentes de E.U.A. Nos. 3,994,974; 5,695,784; y 6,977,257. Las emulsiones se pueden preparar en soluciones, por ejemplo, en soluciones de propilen glicol acuoso o pueden contener agentes emulsificantes tal como lecitina, monooleato de sorbitan, o acacia. Las suspensiones acuosas se pueden preparar al dispersar el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y otros agentes de suspensión bien conocidos.

15 Los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 se pueden formular independientemente para administración como supositorios. Una cera de baja fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso o manteca de cacao se funde primero y el componente activo se dispersa homogéneamente, por ejemplo, al agitar. La mezcla homogénea fundida se vacía luego en moldes de tamaño conveniente, permitidos para enfriar, y 20 para solidificar.

Los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 se pueden formular

independientemente para administración vaginal. Los pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles contienen además del ingrediente activo tales portadores como se conocen en la técnica por ser adecuados. Ciertas de estas formulaciones se pueden también usar en conjunto con un condón con o sin un agente espermicida.

5 Las formulaciones adecuadas junto con portadores farmacéuticos, diluyentes y excipientes se describen en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995*, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19a edición, Easton, Pensilvania, el cual se incorpora como referencia. Una formulación científica calificada puede modificar las
10 formulaciones dentro de las enseñanzas de la especificación para proporcionar numerosas formulaciones para una vía particular de administración sin interpretación de composiciones que contienen los compuestos contemplados en la presente inestables o que comprometen su actividad terapéutica.

Adicionalmente, los compuestos purificados **4**, R_p-4 , o S_p-4 se pueden formular independientemente en conjunto con liposomas o micelas. En cuanto a los liposomas, se contempla que los compuestos purificados se pueden formular en una manera como se describe en las Patentes de E.U.A. Nos. 4,797,285; 5,013,556; 5,077,056; 5,077,057; 5,154,930; 5,192,549; 5,213,804; 5,225,212; 5,277,914; 5,316,771; 5,376,380; 5,549,910; 5,567,434; 5,736,155; 5,827,533; 5,882,679; 5,891,468; 6,060,080; 6,132,763; 6,143,321; 6,180,134; 6,200,598; 6,214,375; 6,224,903; 6,296,870; 6,653,455; 6,680,068; 6,726,925; 7,060,689; y 7,070,801, cada una de las cuales se incorpora como referencia. En
15 cuanto a micelas, se contempla que los compuestos purificados se pueden formular en una manera como se describe en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,145,684 y 5,091,188, ambos de los cuales se incorporan por referencia.

La quinta modalidad se dirige a un uso de cualquiera de los compuestos **4**, R_p-4 , o S_p-4 en la fabricación de un medicamento para el
20 tratamiento de cualquier condición el resultado de una infección por cualquiera de los siguientes agentes víricos: virus de hepatitis C,

virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, virus de dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de hepatitis A, virus de la diarrea vírica bovina y virus de encefalitis Japonesa.

El término "medicamento" significa una sustancia usada en un método de tratamiento y/o profilaxis de un sujeto que necesita del mismo, en donde la sustancia incluye, pero no se limita a, una composición, una formulación, una forma de dosificación, y similares, que comprende cualquiera de los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4. Se contempla que el uso de cualquiera de los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4 en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de cualquiera de las condiciones antivíricas descritas en la presente, ya sea solo o en combinación con otro compuesto descrito en la presente. Un medicamento incluye, pero no se limita a, cualquiera de las composiciones contempladas por la cuarta modalidad descrita en la presente.

Una sexta modalidad se dirige a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto que necesita del mismo tal método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los compuestos 4, R_P-4, o S_P-4 al sujeto.

Se pretende que un sujeto que necesita del mismo es uno que tiene cualquier afección, el resultado de una infección por cualquiera de los agentes víricos descritos en la presente, que incluyen, pero no se limitan a, virus de hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, virus de dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de hepatitis A, virus de la diarrea vírica bovina o virus de encefalitis Japonesa, virus flaviviridae o pestivirus o hepaticivirus o un agente viral causando síntomas equivalentes o comparables a cualquiera de los virus enlistados anteriormente.

El término "sujeto" significa un mamífero, que incluye, pero no se limita a, ganado, cerdos, ovejas, pollos, pavos, búfalo, llama, avestruz, perros, gatos, y humanos, preferiblemente el sujeto es un humano. Se contempla que en el método para tratar a un sujeto del mismo de la novena modalidad puede ser cualquiera de los compuestos contemplados en la presente, ya sea solo o en combinación con otro

compuesto descrito en la presente.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente significa una cantidad requerida para reducir síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requisitos individuales en cada caso particular. Tal dosificación puede variar dentro de los amplios límites dependiendo de numerosos factores tal como la severidad de la enfermedad a tratarse, la edad y condición de salud general del paciente, otros medicamentos con los cuales el paciente se está tratando, la vía y forma de administración y las preferencias y experiencia del médico implicado. Para administración oral, una dosificación diaria de entre alrededor de 0.001 y alrededor de 10 g, que incluye todos los valores en entre, tal como 0.001, 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.125, 0.150, 0.175, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, y 9.5, por día debe ser apropiado en mono terapia y/o en terapia de combinación. Una dosis diaria particular es entre alrededor de 0.01 y alrededor de 1 g por día, que incluye todos los valores incrementales de 0.01 g (esto es, 10 mg) en el medio, una dosificación diaria preferida alrededor de 0.01 y alrededor de 0.8 g por día, más preferiblemente alrededor de 0.01 y alrededor de 0.6 g por día, y más preferiblemente alrededor de 0.01 y alrededor de 0.25 g por día, cada una de las cuales incluye todos los valores incrementales de 0.01 g en el medio. Generalmente, el tratamiento se inicia con una "dosis de carga" inicial grande para reducir rápidamente o eliminar el virus después de una disminución de la dosis a un nivel suficiente para prevenir la reaparición de la infección. Alguien de experiencia ordinaria en el tratamiento de enfermedades descritas en la presente será capaz, sin experimentación indebida y basándose en los conocimientos, experiencia y las descripciones de esta aplicación, para determinar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto descrito en la presente para un paciente y enfermedad dada.

La eficacia terapéutica se puede deducir de pruebas de función hepática que incluyen, pero no se limitan a niveles de proteína tal

J
25

como proteínas de suero (por ejemplo, albumina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (por ejemplo, transaminasa alanina, transaminasa de aspartato), 5'-nucleosidasa, γ -glutaminiltranspeptidasa, etc.), síntesis de bilirubina, síntesis de colesterol, y síntesis de ácidos biliares; una función metabólica del hígado, que incluye, pero no se limitan a, metabolismo de carbohidrato, metabolismo de aminoácido y amoníaco. Alternativamente la eficacia terapéutica se puede monitorear al medir HCV-RNA. Los resultados de estas pruebas permitirán la dosis a optimizarse.

Un primer aspecto de la sexta modalidad se dirige a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto que necesita del mismo tal método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto representado por cualquiera de los compuestos 4, R_p-4, o S_p-4 y una cantidad terapéuticamente efectiva de otro agente antivírico; en donde la administración es concurrente o alternativa. Se entiende que el tiempo entre administración alternativa puede variar entre 1-24 horas, lo que incluye cualquier sub-rango incluyendo entre, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, y 23 horas.

Los ejemplos de "otro agente antivírico" incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de proteasa HCV NS3 (ver EP 1881001, US 2003187018, US 2005267018, WO 2003006490, WO 200364456, WO 2004094452, WO 2005028502, WO 2005037214, WO 2005095403, WO 2007014920, WO 2007014921, WO 2007014922, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007015824, WO 2008010921, y WO 2008010921); Inhibidores HCV NS5B (ver US 2004229840, US 2005154056, US 2005-98125, US 20060194749, US 20060241064, US 20060293306, US 2006040890, US 2006040927, US 2006166964, US 2007275947, US 6784166, US20072759300, WO 2002057287, WO 2002057425, WO 2003010141, WO 2003037895, WO 2003105770, WO 2004000858, WO 2004002940, WO 2004002944, WO 2004002977, WO 2004003138, WO 2004041201, WO 2004065367, WO 2004096210, WO 2005021568, WO 2005103045, WO 2005123087, WO 2006012078, WO 2006020082, WO 2006065335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO 2007039142, WO 2007039145,

3-31

WO 2007076034, WO 2007088148, WO 2007092000, y WO2007095269); Inhibidores HCV NS4 (ver WO 2005067900 y WO 2007070556); Inhibidores HCV NS5a (ver US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251, y WO 2006120252); agonistas del receptor tipo Toll (ver WO 2007093901); y otros inhibidores (ver WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852, y WO 2004035571); y compuestos descritos en Solicitud de Patente de E.U.A. No. 12/053,015, archivado el 21 de marzo de 2008 (US 2010/0016251) (los contenidos de los cuales se incorporan como referencia), interferón- α , interferón- β , interferón- α pegilado, ribavirin, levovirin, viramidina, otro inhibidor de polimerasa HCV de nucleósido, un inhibidor de polimerasa sin nucleósido HCV, un inhibidor de proteasa HCV, un inhibidor de helicasa HCV o un inhibidor de fusión HCV.

Cuando cualquiera de los compuestos **4**, **R_P-4**, o **S_P-4** se administran en combinación con otro agente antivírico la actividad se puede incrementar sobre el compuesto original. Cuando el tratamiento es terapia de combinación, tal administración puede ser concurrente o secuencial con respecto al de los derivados de nucleósido. La "administración concurrente" como se usa en la presente incluye así administración de los agentes al mismo tiempo o en momentos diferentes. La administración de dos o más agentes al mismo tiempo se puede alcanzar por una formulación sencilla que contiene dos o más ingredientes activos o por administración sustancialmente simultánea de dos o más formas de dosificación con un agente activo sencillo.

Se entenderá que las referencias en la presente con el tratamiento se extienden a profilaxis así como al tratamiento de condiciones existentes. Además, el término "tratamiento" de una infección HCV, como se usa en la presente, también incluye tratamiento o profilaxis de una enfermedad o una afección asociada con o mediada por infección HCV, o los síntomas clínicos del mismo.

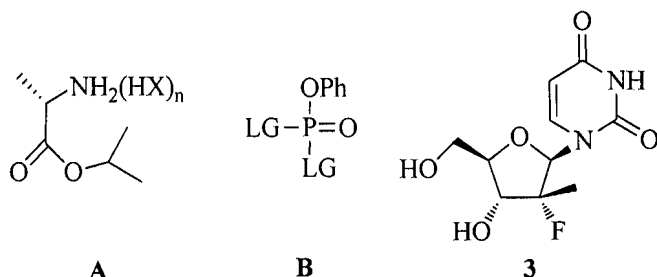
Preparación

Una séptima modalidad se dirige a un proceso para preparar

32

cualquiera de los compuestos **4**, R_P -**4**, o S_P -**4**, que comprenden: a) reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-LG-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende al menos uno de S_P -**4** y R_P -**4**

5



10

en donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y LG es un grupo de partida; b) reaccionar la primera mezcla con un compuesto de protección para obtener una segunda mezcla que comprende al menos uno de S_P -**4** protegido y R_P -**4** protegido; y c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener **4**, S_P -**4**, o R_P -**4**.

En un primer aspecto de la séptima modalidad, el alanato de isopropilo se presenta como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente, sustancialmente anhidro.

En un segundo aspecto de la séptima modalidad, la base es N-metilimidazol.

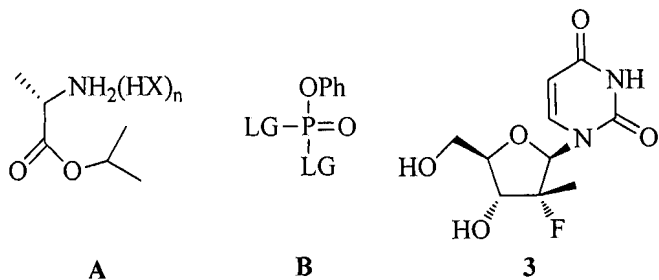
En un tercer aspecto de la séptima modalidad, la relación molar de **A**-a-**B**-a-**3** es alrededor de 1.6-a-1.3-a-1.

En un cuarto aspecto de la séptima modalidad, el compuesto de protección es t-butil-dimetil-silil-cloruro.

15

Una octava modalidad se dirige a un proceso para preparar S_P -**4** o R_P -**4**, que comprenden: a) reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-LG-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende al menos uno de S_P -**4** y R_P -**4**

20



25

33

en donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y LG es un grupo de partida; y b) opcionalmente sometiendo la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener S_p-4 o R_p-4 purificados.

5 Un primer aspecto de la octava modalidad para preparar R_p-4 adicionalmente incluye además purificar la segunda mezcla o el R_p-4 purificado al disolver o suspender la segunda mezcla o la mezcla de R_p-4 purificado en un solvente; opcionalmente después de sembrar con R_p-4 cristalino; y agregar suficiente anti-solvente para obtener R_p-4 cristalino.

10 Un segundo aspecto de la octava modalidad para preparar S_p-4 adicionalmente incluye además purificar la segunda mezcla o el S_p-4 purificado por d) disolver o suspender la segunda mezcla o el S_p-4 purificado en un solvente después de sembrar con S_p-4 cristalino en alrededor de temperatura ambiente; coleccionar un primer sólido la mayoría de los cuales comprenden S_p-4 ; disolver el primer sólido en un solvente en su temperatura de reflujo; y enfriar o agregar un anti-solvente para obtener un segundo sólido.

15 Un tercer aspecto de la octava modalidad para la preparación de S_p-4 , adicionalmente incluye además purificar S_p-4 por d) disolver o suspender la segunda mezcla o la mezcla de S_p-4 purificado en un primer solvente seguido al agregar un anti-solvente a fin de obtener una primera composición en la cual el solvente/anti-solvente residual se remueve por decantación para obtener un residuo; tratar el residuo con una solución que contiene el primer solvente y anti-solvente para proporcionar una segunda composición por lo que al reducirse la presión proporciona un primer sólido; disolver o suspender el primer sólido usando un segundo solvente a fin de obtener una tercera composición; agregar cristales de siembra de S_p-4 a la tercera composición; coleccionar un segundo sólido; disolver o suspender el segundo sólido en un tercer
20 solvente, opcionalmente calentar a la temperatura de reflujo del tercer solvente para obtener una cuarta composición, y, si es necesario,

3
2x

enfriar la cuarta composición para obtener un tercer sólido que comprende S_p-4 el cual se colecta por filtración.

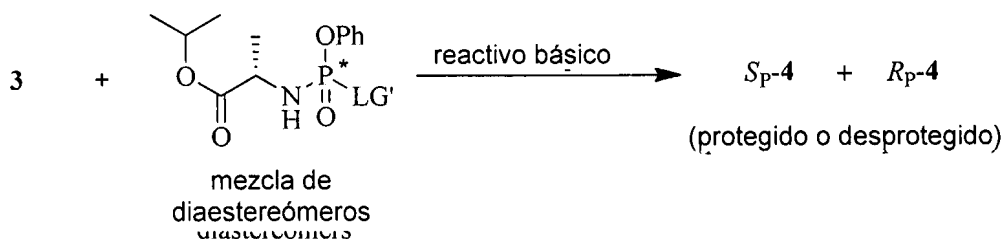
En un cuarto aspecto de la octava modalidad para la preparación de S_p-4 , S_p-4 se purifica además por la segunda mezcla o el S_p-4 purificado por d) agregar gel de sílice a la segunda mezcla o el S_p-4 purificado seguido por evaporación de solvente para proporcionar una mezcla espesa seca; agitar la mezcla espesa seca en una primera combinación de solvente/anti-solvente para obtener una primera mezcla espesa húmeda; decantar la primera combinación solvente/anti-solvente de la primera mezcla espesa húmeda para obtener una segunda mezcla espesa húmeda y una primera composición; agregar a la segunda mezcla espesa húmeda una segunda combinación solvente/anti-solvente seguido al agitar; decantar la segunda combinación solvente/anti-solvente de la segunda mezcla espesa húmeda para obtener una tercera mezcla espesa húmeda y una segunda composición; opcionalmente repetir las etapas g)-h) en la tercera mezcla espesa húmeda o mezclas espesas húmedas adicionales; evaporar el solvente de la segunda composición, y opcionalmente cualquier composición adicional obtenida de la etapa opcional i) para obtener un primer sólido; disolver o suspender el primer sólido en una solución que contiene un tercer solvente y opcionalmente un cuarto solvente para obtener una tercera composición; opcionalmente agregar cristales de siembra de S_p-4 a la tercera composición; obtener de la tercera composición un segundo sólido que comprende S_p-4 ; y opcionalmente recrystalizar el segundo sólido usando un tercer solvente para obtener un tercer sólido que comprende S_p-4 .

Alguien de experiencia ordinaria apreciará que los compuestos se pueden separar por extracción tradicional, cristalización tradicional o técnicas cromatográficas tradicionales. Las técnicas cromatográficas tradicionales incluyen, pero no se limitan a, cromatografía en gel de sílice (usando, por ejemplo, 3-5% metanol en DCM o 4-6% isopropanol en DCM) para producir niveles mejorados de un isómero (50-100%) y luego cristalizar. Alternativamente, alguien podría usar cromatografía de fase inversa (usando, por ejemplo, fase móvil acuosa de acetonitrilo 1-

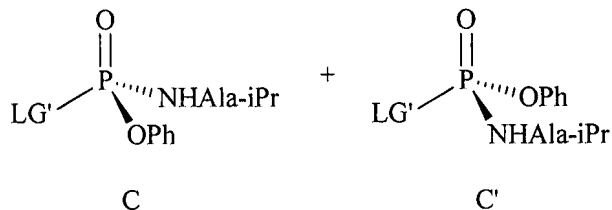
15/6/35

30%). Además los compuestos se pueden aislar por cromatografía de fluido supercrítico SFC con dióxido de carbono como el solvente principal y alcoholes tal como metanol como un modificador, preferiblemente usando el medio quiral apropiado, tal como, Daicel Chiralpack IA. Alternativamente, la cromatografía SMB se puede emplear usando el medio quiral apropiado, tal como, Daicel ChiralPack IA, usando una mezcla de solventes tal como hexanos/isopropanol o solventes sencillos tal como acetato de etilo.

Una novena modalidad se dirige a un proceso para preparar S_P-4 , que comprende: a) reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con un 3'-O-protegido o **3** sin proteger, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende S_P-4 protegido o desprotegido



en donde el isopropil-alanil-fosforamidato se comprende de una mezcla de diaestereómeros representados por las siguientes estructuras:



en donde la relación de **C:C'** es alrededor de 1:1.

En un primer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'** es mayor que o igual hasta alrededor de 1:1.

En un segundo aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'**; es mayor que alrededor de 1:1.

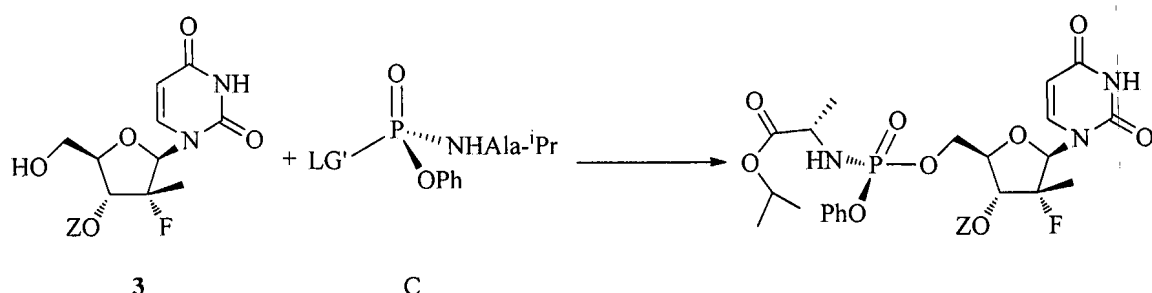
En un tercer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'** es al menos alrededor de 1.5:1, alrededor de 2.3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5.7:1, alrededor de

32-36

9:1, alrededor de 19:1, alrededor de 32.3:1, alrededor de 49:1, o alrededor de 99:1.

Un cuarto aspecto el LG' es p-nitrofenóxido, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio, y la relación de C:C' es al menos alrededor de 1.5:1, alrededor de 2.3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5.7:1, alrededor de 9:1, alrededor de 19:1, alrededor de 32.3:1, alrededor de 49:1, o alrededor de 99:1.

Un quinto aspecto para preparar S_p-4, comprende: a) reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato (C) con un 3'-O-protegido o 3 desprotegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende protegido o desprotegido S_p-4



en donde Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo de partida; y b) opcionalmente somete el S_p-4 protegido o desprotegido obtenido para cromatografía, extracción, o cristalización con objeto de obtener S_p-4 protegido o desprotegido purificado. En una sub-modalidad, LG' es tosilato, canforsulfonato, o un arilóxido sustituido con al menos uno electrón que retira al grupo; más preferiblemente, LG' se selecciona de entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, y pentafluorofenóxido. En una sub-modalidad adicional, cuando S_p-4 se protege, esto es, Z no es hidrógeno, el proceso de la novena modalidad se dirige además a S_p-4 protegido de desprotección. En una sub-modalidad adicional, la reacción se conduce en un solvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano u otro solvente etéreo ya sea uno que es solo o en combinación entre sí o con un nitrilo C₂ hasta C₇, tal como acetonitrilo.

15

El proceso de la novena modalidad además comprende 1) reaccionar (LG')P(O)(LG)₂, en donde LG, independiente de LG', es un grupo de partida, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener

20

Handwritten signature or mark.

5



15



20



5

10



20

5

10

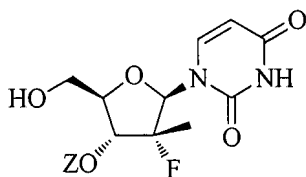


20

20

modalidad, la novena modalidad o la décima modalidad así como sus respectivos aspectos. Un aspecto de la undécima modalidad se dirige a una composición obtenida por cualquiera de las modalidades ejemplificadas descritas abajo. La composición así obtenida puede ser cristalina, tipo cristal, amorfa, o una combinación de los mismos.

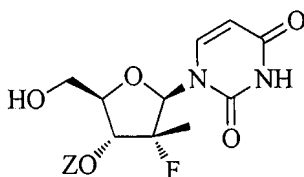
5 Una decimosegunda modalidad se dirige a un compuesto **3**



3

10 en donde Z es un grupo protector o hidrógeno; que es útil para la preparación de R_p-4 o S_p-4 .

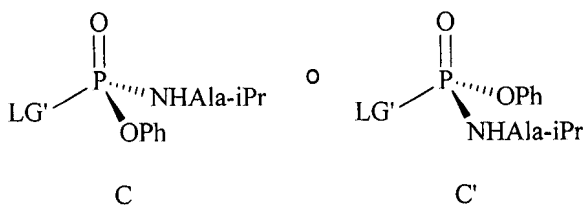
Un primer aspecto de la decimosegunda modalidad se selecciona de entre un compuesto que tiene la siguiente estructura



3a: $Z = -C(O)CH_2CH_2C(O)CH_3$

3b: $Z = -C(O)OCH_2Ph$

Una decimotercera modalidad se dirige a un compuesto, su sal, hidrato, solvato, o combinación de los mismos, representado por las siguientes estructuras



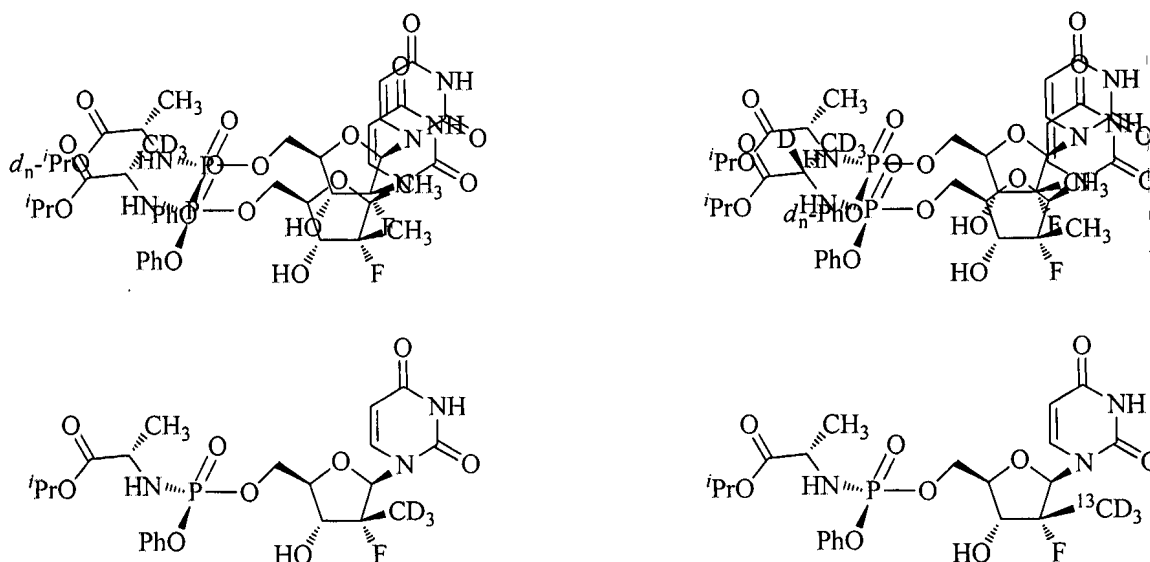
15 donde LG' es un grupo de partida, que es útil para la preparación de R_p-4 o S_p-4 .

20 En un primer aspecto de la decimotercera modalidad, LG' es tosilato, canforsulfonato, un arilóxido, o un arilóxido sustituido con al menos uno electrón que retira al grupo.

En un segundo aspecto de la decimotercera modalidad, LG' se

selecciona de entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, y pentafluorofenóxido.

Una decimocuarta modalidad se dirige a un análogo isotópicamente etiquetado de R_p-4 o S_p-4 . El término análogo "isotópicamente etiquetado" se refiere a un análogo de R_p-4 o S_p-4 que es un "análogo deuterado", un "análogo etiquetado ^{13}C ," o un "análogo deuterado/etiquetado ^{13}C ." El término "análogo deuterado" significa un compuesto descrito en la presente, mediante el cual un isótopo ^1H , esto es, hidrógeno (H), se substituye por un isótopo ^2H , esto es, deuterio (D). La substitución de deuterio puede ser parcial o completa. La substitución de deuterio parcial significa que al menos un hidrógeno se substituye por al menos un deuterio. Por ejemplo, para R_p-4 o S_p-4 , alguien de experiencia ordinaria puede contemplar al menos los siguientes análogos deuterados parciales (donde " d_n " representa número n de átomos de deuterio, tal como, para un grupo de isopropilo $n = 1-7$, mientras que para un grupo fenilo, $n = 1-5$), así como aquellos representados abajo.



Aunque los grupos de metilo representados anteriormente se muestran como que son completamente deuterados, alguien reconocerá que las variaciones deuteradas parciales son también posibles, tal como, -

23/2

CDH₂ y -CD₂H. Las etiquetas isotópicas en la furanosa y base también se contemplan. Igualmente, los términos "análogo etiquetado ¹³-C" y "análogo deuterado/etiquetado ¹³-C" se refiere a un compuesto descrito en la presente, por lo cual el átomo de carbono se enriquece con un isótopo ¹³C que significa que el grado de enriquecimiento excede la

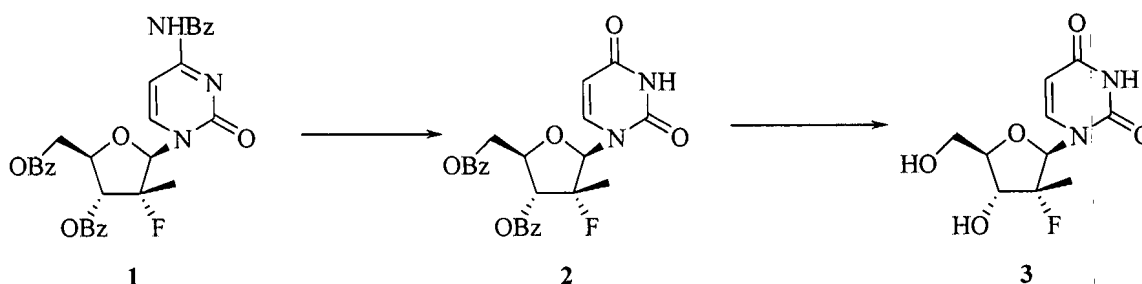
5 abundancia natural usual de alrededor de 1.1%.

Ejemplos

Sin limitarse por medio del ejemplo, los siguientes ejemplos sirven para facilitar un mejor entendimiento de la descripción.

Aspectos sintéticos

10 Con objeto de preparar el nucleósido de uridina, alguien podría tomar ventaja de un intermediario de citidina tribenzoilada avanzado en la síntesis de ciertos análogos 3',5'-diacilados de **3** (ver abajo) ya producidos eficientemente en una escala de planta piloto (ver WO 2006/031725 o US 2006/0122146, ambos de los cuales se incorporan por referencia en su totalidad). El siguiente método se encontró para ser escalable y rentable.

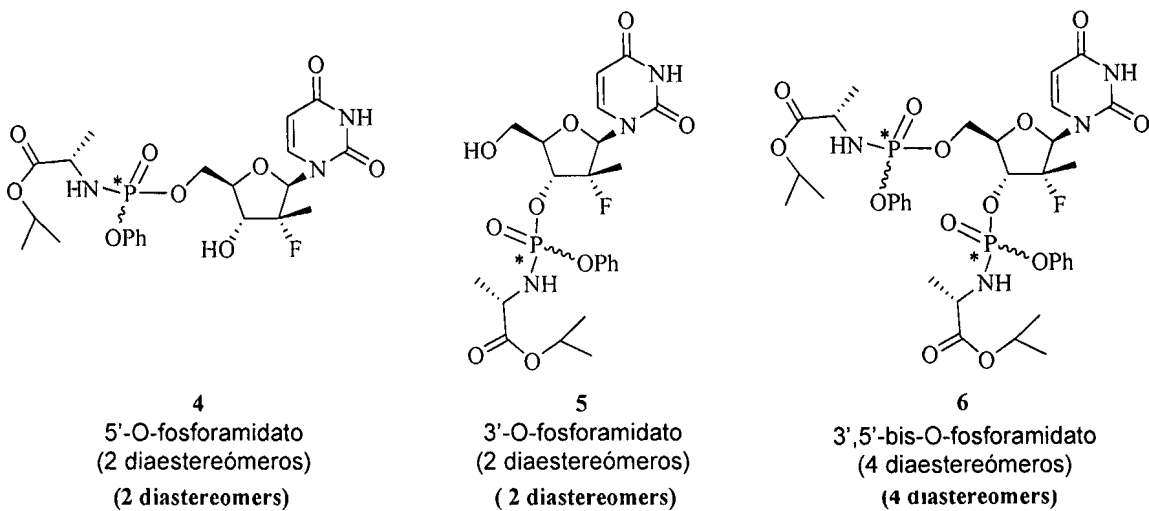


La 3',5'-O-dibenzoil-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina (**1**) se obtiene por un método descrito en WO 2006/031725 y WO 2008/045419 ambos de los cuales se incorporan como referencia en su totalidad. **1** se trata con ácido acético acuoso al 70% para formar 3',5'-O-dibenzoil-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (**2**). Los ésteres de benzoilo se pueden hidrolizar por un número de métodos así, por ejemplo, alcóxidos en solvente alcohólico, tal como metóxido de sodio en metanol, carbonato de potasio en metanol, o análogos de etanol, alquilaminas tal como metilamina en metanol, butilamina etc. El amoníaco metanólico se eligió para el trabajo de mayor escala. El

Handwritten signature or initials.

producto de uridina (3) se puede purificar por cristalización para proporcionar un rendimiento del 70% de la citidina tribenzoilada (1).

Numerosos procedimientos de la literatura detallan diferentes vías y condiciones para hacer fosforamidatos usando varias veces equivalentes de reactivos. Ver, por ejemplo, McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 3504-3515 and McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7215. Para el proceso de trabajo de escala, hay solamente un ejemplo actualmente conocido, que se describe en Lehsten et al., *Org. Process Res. Dev.* 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). En esta referencia, los autores introducen el concepto de un "procedimiento de una olla" en el cual una sal de clorohidrato de aminoácido y diclorofosfato de fenilo se reaccionan junto con N-metilimidazol en diclorometano. Más tarde el nucleósido se agrega para formar el producto 5'-O-fosforamidato deseado, que en el presente caso proporcionaría un compuesto representado por la fórmula 4. Desafortunadamente, el procedimiento de Lehsten sufre de inconvenientes. Por ejemplo, el procedimiento de Lehsten utiliza un exceso mucho mayor de reactivos que fue necesario lo cual se suma al costo y dificultad de purificación cromatográfica. Además, Lehsten sugiere que alguien podría controlar la reacción selectivamente en el 5'-hidroxilo sobre el 3'-hidroxilo comparado con una referencia de la literatura mediante el uso de temperaturas más bajas y adición lenta del nucleósido.



Usando el procedimiento de Lehsten para los compuestos descritos en la presente proporcionados por alrededor de 1-5% de diaestereómeros de 3'-O-fosforamidato mono-sustituidos (5) y alrededor de 10-30% del

producto bis-sustituido (6). Como la polaridad de los 3'-diaestereómeros fue muy similar a los 5'-diaestereómeros deseados (4), la separación cromatográfica fue un gran desafío. La expansión del proceso fue casi imposible sin descartar una porción sustancial de los 5'-diaestereómeros menos polares (4) o aceptar un nivel mayor de contaminación de los 3'-diaestereómeros (5). En un aumento de 50 g inicial, el producto resultante contiene una contaminación de 3'-diaestereómero (5) de alrededor de 3%, que co-eluyen con el menos polar del 5'-diaestereómero (4).

10 Se describen en la presente condiciones de reacción que usan cantidades menores de reactivos y un método para remover selectivamente la impureza de diaestereómeros de 3'-O-fosforamidato (5) con una más fácil separación cromatográfica de tal modo proporcionando los diaestereómeros de 5'-O-fosforamidato deseados en mucho mayor pureza (4).

Para la estereoquímica de reactivo, un estudio se hizo en el cual la estereoquímica de los reactivos se cambió sistemáticamente y los resultados se monitorearon por RMN de fósforo de la reacción cruda como había informado Lehsten. En los funcionamientos más acertados, el rendimiento aislado y la pureza del producto deseado se compararon. Se observó que el 5'-hidroxilo primario reacciona en una velocidad más rápida que el 3'-hidroxilo secundario. Esto crea una situación de competencia entre el progreso de la reacción de consumir todos los nucleósidos de partida y convertir productos 5'- y 3'-monosustituidos (4 y 5) a los productos 5',3'-bis sustituidos (6). El producto 3'-monosustituido convierte al producto bis en una velocidad más rápida que el producto 5'-monosustituido, así que es posible para reducir el nivel de contaminación de 3'-diaestereómero al resolver la reacción más a los productos bis-sustituidos. Sin embargo, con una forma efectiva para remover los 3'-diaestereómeros, la reacción se puede optimizar para producir más del 5'-diaestereómero deseado sin que tenga que sacrificar tanto que el 5'-diaestereómero que se convierte al bis-sustituido (6). Se observó también que el clorohidrato de aminoácido es

36
45

muy higroscópico. Como cualquier agua presente podría consumir una cantidad equivalente del reactivo de diclorofosfato de fenilo, se debe tomar cuidado para mantener el aminoácido sustancialmente anhidro o se debe hacer sustancialmente anhidro antes de su uso. En resumen, Lehsten había informado que la relación óptima de aminoácido a diclorofosfato de fenilo a nucleósido fue 3.5:2.5:1 respectivamente. Se encontró que la relación óptima de aminoácido a diclorofosfato de fenilo a nucleósido de alrededor de 1.6 hasta alrededor de 1.3 hasta alrededor de 1 es óptima bajo condiciones en las cuales el 3'-diaestereómero se puede remover efectivamente y cuando el clorohidrato de aminoácido es sustancialmente anhidro. Al usar una cantidad más pequeña de los reactivos, un ahorro de costes se realiza acoplado con una simplificación de la separación cromatográfica del producto deseado de los sub-productos de reactivo y del nivel reducido de bis diaestereómeros.

En un procedimiento alternativo, un derivado de 3'-hidroxibloqueado de **3** se preparó usando un grupo de bloqueo t-butildimetilsililo en dos etapas. Esto se convirtió luego a sus derivado de 5'-fosforamidato. El deseo es que el grupo sililo se podría luego remover y no habría 3' isómeros (**5**) o 3',5'-bis fosforamidatos (**6**). Un enfoque similar se demostró por Borch y Fries (Patente de E.U.A. 5,233,031) en un rendimiento global bajo en un fosforamidato de alquilo.

Otro enfoque alternativo fue para usar la síntesis directa y luego usar la química para ayudar a diferenciar las impurezas de 3'-diaestereómero **5** de los 5'-diaestereómeros deseados **4** para ayudar a la separación. Se deseó que un grupo podría selectivamente reaccionar con el hidroxilo primario libre de la impureza de 3'-O-fosforamidato **5** sobre el hidroxilo secundario libre del 5'-O-fosforamidato **4** deseado. Se deseó también que el grupo de bloqueo significativamente cambia la polaridad del producto 3'-O-fosforamidato de 5'-O-bloqueado resultante del 5'-O-fosforamidato **4** deseado. No habría etapa extra necesaria para remover el grupo de bloqueo como los 5'-diaestereómeros **4** deseados no

112
48

se cambiarían. Los 3'-diaestereómeros químicamente alterados podrían luego permitir separación cromatográfica más fácil o separación por soportes de barrido especial o por extracciones.

Especialmente, el grupo de bloqueo tert-butildimetilsililo (tBDMS) cumple estos criterios y fue el primero en demostrar y posteriormente usar en una escala de multi-kilogramo. Bajo ciertas condiciones tal como en piridina como solvente y base, el grupo tBDMS reacciona con selectivamente alto en la posición de hidroxilo primaria sobre la posición de hidroxilo 3' secundaria. La reacción de fosforamidato usa N-metilimidazol (NMI) como una base. En la presencia de NMI, la sililación es menos selectiva. Preferiblemente, la cantidad de NMI se podría reducir. Esto se puede lograr fácilmente después de la reacción de fosforamidato al lavar la solución de reacción con ácido clorhídrico 1 N. El NMI y el nucleósido de partida restante se remueven, dejando una mezcla cruda de productos mono y bis sustituidos y sub-productos de reactivo. Esto se disuelve luego en piridina y se trata con cloruro de tert-butildimetilsililo. El producto 3'-monosustituido **5** se convierte en pocas horas o menos al 5'-O-tBDMS-3'-O-fosforamidato **7**. El progreso de la reacción se puede supervisar por HPLC. La polaridad de este producto sililado **7** es menos que el bis-fosforamidato **6** y se remueve fácilmente por cromatografía. Usando este método, fue posible para reducir el nivel de 3'-monofosforamidato **5** a menos de 0.1% del 5'-producto **4** comparado con 1-3% sin el tratamiento de sililo. Similarmente, el tratamiento con cloruro de dimetoxitriifenilmetilo (DMT-Cl) bajo las mismas condiciones trabajado igual de bien. También fue más fácil para identificar el producto de reacción DMT por TLC como DMT que contiene mancha de moléculas color naranja brillante en calentamiento o exposición a ácido. Alguien puede también prever muchos otros grupos de bloqueo, como se señaló anteriormente.

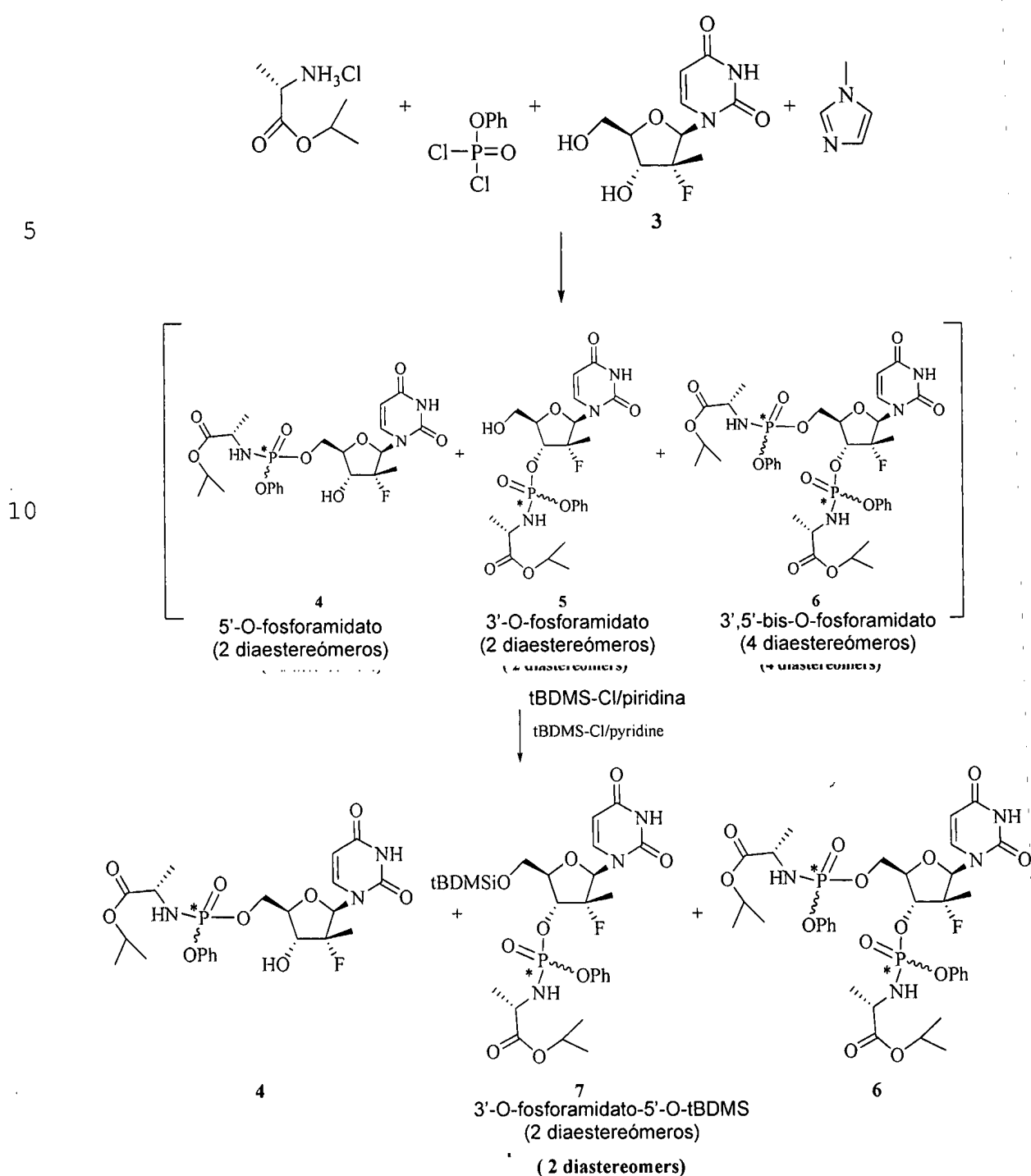
Tanto las condiciones de reacción y el barrido de la 3'-impureza son métodos generales y se podrían aplicar a la mayoría de los fosforamidatos de nucleósido con un 3' hidroxilo libre. La porción de

45
47

fosforamidato podría ser cualquier combinación de éster de aminoácido y alcohol aromático. La porción de nucleósido podría ser cualquier nucleósido en el cual un 5' fosforamidato podría llevar a un 5'-monofosfato y se podría además metabolizar a la forma 5'-trifosfato.

El siguiente esquema de reacción es el principal esquema de reacción ilustrado para hacer isopropil L-alanato fenil fosforamidato de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina con el producto principal como el 5'-O-fosforamidato deseado (4, dos diaestereómeros) y el producto menor como el 3'-O-fosforamidato (5, dos diaestereómeros) y el 3',5'-bis-O-fosforamidato (6, cuatro diaestereómeros). Los reactivos se agregan en las relaciones estequiométricas como se describe en el método de sección de preparación. La reacción se permite que continúe hasta que alrededor de 5% del material de partida restante como se juzga por la visualización UV en cromatografía de capa delgada (TLC). También UPLC/MS mostró que aproximadamente 10% del 3',5' bis-fosforamidato 6 se había formado comparado con el 5'-producto deseado. Después de apagar y un examen en el medio acuoso ácido, el residuo crudo de la capa orgánica se preparó para la sililación. Bajo las condiciones de reacción descritas, el grupo de sililo preferentemente reacciona con el 5'-hidroxilo libre del 3'-O-fosforamidato para formar 7. La reacción se continuó hasta que el 3'-O-fosforamidato no fue más detectable por UPLC/MS.

48



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

Método de Preparación

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

En un matraz de 10 L, se agregó 3',5'-O-dibenozil-2'-desoxi-2'-

50

fluoro-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina (500 g, 0.874 mol) y ácido acético acuoso al 70% (7.5 L). La solución se calentó hasta reflujo (110°C) durante 20 h. La CCD indica una reacción completa (Rf 0.6 en metanol al 5% en diclorometano (DCM)). La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y diluyó con agua (2 L). Después de la agitación durante 2 h, el precipitado resultante se colectó por filtración y el sólido se enjuagó con agua (5 L) y secó en la atmósfera a temperatura ambiente durante 12 h para proporcionar 360 g (88%). Este intermediario de dibenzoiluridina se usó directamente en la siguiente etapa al agregar todo para preparar de manera fresca amoniaco metanólico (5.4 L, ca 25%) a 0°C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 h y luego se permitió calentar hasta 15°C durante 24 h. La CCD indica una reacción completa (Rf 0.4 en metanol al 10% en DCM). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y concentró bajo presión reducida para dar el producto crudo (216 g). El producto crudo se agitó con acetato de etilo (325 mL) durante 3 h a temperatura ambiente. El sólido resultante se colectó por filtración y lavó con acetato de etilo (216 mL). El sólido se secó bajo vacío a temperatura ambiente durante 4h para proporcionar 160 g (78%) del producto deseado en 98.7% de pureza HPLC. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 11.44 (br s, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, C-6H), 5.97 (d, 1H, C-1'H), 5.64 (d, 1H, C-5H), 3.84-3.77 (m, 3H, C-5'-Ha, C-3'H. C-4'H), 3.63-3.60 (m, 1H, C5'-Hb), 1.23 (d, 3H, C-2'-CH₃). ES-EM M-1 259.

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

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

Un matraz de 3 cuellos de 5 L se fijó con un agitador mecánico, baño de hielo con salmuera, termómetro interno, y una atmósfera de nitrógeno. El matraz se cargó con clorohidrato de éster de L-alanina

57
5/6

isopropilo (82.0 g, 0.490 moles) y diclorometano anhidro (0.80 L). Aunque esto se agitó, diclorofosfato de fenilo (85.0 g, 0.40 moles) se agregó en un lote y agitó. Mientras se mantiene la temperatura interna entre -5 hasta 5°C, una solución de N-metilimidazol (NMI, 250 g, 3.07 moles) en diclorometano (250 mL) se agregó durante un periodo de una 5 media hora. La solución se permitió agitar durante 1 h en este intervalo de temperatura. La 2'-Desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (3, 80.0 g, 0.307 moles) se agregó a 0°C en una porción y luego el matraz de reacción se permitió calentar lentamente en el baño de salmuera. En 1 h, la temperatura interna fue hasta -2°C. CCD (Metanol al 5% en DCM) en 1 h muestra que más del 50% de nucleósido se consumió. 10 El baño se removió y el matraz de reacción alcanzó temperatura ambiente durante 1 h más. La CCD después de 3 h y en 5 h totales muestra que 95% del nucleósido de partida se consumió. La mezcla de reacción se apagó al agregar metanol (100 mL) y se agitó la reacción durante 5 minutos.

La mezcla de reacción se lavó con HCl 1N (2 X 500 mL) seguido por solución de bicarbonato de sodio saturado (2 X 500 mL). La capa orgánica separada se secó sobre sulfato de sodio anhidro (50 g) y filtró. La solución se evaporó bajo presión reducida y luego bajo alto vacío hasta sequedad para dar el producto crudo como un aceite viscoso (170 g). Los RMN del producto crudo (³¹P y ¹H) se descongelaron. El ³¹P-RMN indica alrededor de 1% de la integración del fósforo total fue debido a la presencia del isómero 3' 5.

Al producto crudo se agregó piridina anhidra (1700 mL). El 15 solvente se evaporó bajo presión reducida y luego bajo alto vacío con objeto de reducir el contenido de agua de la mezcla cruda a través de co-evaporación. El aceite resultante se volvió a disolver en piridina anhidra (500 mL) y luego se agregó en cloruro de t-butildimetilsililo en exceso (9.0 g, 60mM). La reacción se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó por UPLC/MS. Después de 3 20 horas, la impureza 3' 5 no puede detectarse más larga y la reacción se apagó por la adición de metanol (50 mL).

2
51

La reacción se evaporó bajo presión reducida hasta un aceite. El residuo se disolvió en acetato de etilo (1.5 L) y lavó con HCl 1N (2X 500 mL), seguido por solución de bicarbonato de sodio saturado (2 X 500 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro (50 g), filtró y evaporó bajo presión reducida para dar el producto crudo como un aceite amarillo pálido.

El aceite crudo se diluyó con el mismo volumen de diclorometano y cargó en un cartucho de gel de sílice de 2.5 Kg en un módulo de compresión radial a 7.03 kg/cm^2 (100 psi) de presión de aire. Usando una bomba de gradiente a 4.218 kg/cm^2 (60 psi) y una velocidad de flujo de 400 mL/min, el cartucho se lavó con cloruro de metileno (4L) seguido por un gradiente metanol al 1-4% en cloruro de metileno (48 L). La mayoría de las impurezas principales fosfato de (di-(isopropilalanil)fenil, 3',5'-bis fosforamidato (6), aducto 3'-fosforamidato-5'-TBDMS (7)) eluido con gradiente ~3%. El producto deseado eluido entre metanol al 3 y 4%. Las fracciones que contienen el producto se clasificaron en dos lotes. El primero contiene cantidades pequeñas de impurezas superiores y la última fue producto puro. El primer conjunto de fracción contienen cantidades pequeñas de impurezas menos polares (impurezas superiores) tales como el 3',5'-bis fosforamidato y el di-alanilfenil fosfato y un normalmente el diaestereómero R_p y requiere una segunda purificación de columna. (La terminología relativa, superior contra inferior se refiere a la elución en la cromatografía en gel de sílice fase normal, donde el "isómero superior" significa el primer isómero eluido.) El segundo conjunto de fracciones no tiene una cantidad importante de impurezas -apenas el R_p restante y normalmente de los diaestereómeros S_p . Se combinó después con las fracciones de columna dos veces. El solvente se evaporó bajo presión reducida y la espuma blanca resultante se secó además (0.20 mmHg) durante 1 h para dar 42 g del lote impuro (4:1 isómero superior e inferior con base de ^{31}P -RMN) y 38 g del lote puro (1:3 isómero superior e inferior). El lote impuro se volvió a colocar en columna en una manera similar para dar 3.8 g de 97% de isómero superior puro (lado

de la fracción) y 36 g de producto puro en una relación 4:1. Los dos lotes principales se disolvieron en DCM, combinaron, evaporaron bajo presión reducida y secaron (50°C, 0.2 mmHg, 24 h) para dar 74 g (45.7%) de producto puro **4** con una relación diaestereomérica de 48:51, como una espuma blanca, pf alrededor de 75-85°C.

5 Con objeto de producir un sólido amorfo de la mezcla diaestereomérica, 74 g de la espuma blanca se agitó con éster de metilo de t-butilo (750 mL) resultando en una solución parcial y un residuo sólido pegajoso. Mientras se agita, heptanos (750 mL) se agregaron lentamente y la suspensión se agitó mecánicamente durante 1 hora hasta que la mayoría de la goma se convirtió a un sólido blanco. El sólido se raspó con una espátula y la mezcla espesa resultante se filtró. El sólido se lavó con heptanos (4 X 50 mL) y secó bajo vacío (50°C, 0.2 mmHg, 24 h) para dar un polvo amorfo, blanco (64 g) con un intervalo de fusión amplio de ca 70-80°C. ¹H y ³¹P RMN se ajusta a la estructura y HPLC muestra una pureza de 99.8% con una relación diaestereomérica de 46:54 (también se ajusta por ³¹P RMN).

Método alternativo para hacer la mezcla sólida de **4**. Después de la cromatografía, el residuo se co-evaporó con diclorometano dos veces (5 mL/g) y secó durante 24 h a 35-40°C a 35-45 mTorr. El residuo de espuma se tamizó a través de un filtro de 250 micrones y secó además bajo las mismas condiciones hasta que el diclorometano residual cayó debajo de 400 ppm como se mide por GC de espacio frontal. El polvo amorfo blanco hasta blanco opaco fino resultante tiene un intervalo de temperatura de transición de vidrio de 53.7 hasta 63.5°C.

15 Caracterización de la mezcla de isómeros (**4**): ¹H-RMN (CDCl₃) δ 10.05 (br s, 1H, NH, S_P), 10.00 (br s, 1H, NH, R_P), 7.49 (d, 1H, C6-H, S_P), 7.36 (m, 5H, C6-H, R_P, aromático), 7.23-7.14 (m, 6H, R_P/S_P, aromático), 6.18 (br d, 2H, C1'-H, R_P/S_P), 5.63 (d, 1H, C5-H, S_P), 5.58 (d, 1H, C5-H, R_P), 5.01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂, R_P/S_P), 4.46-4.33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, R_P/S_P), 4.12 (m, 2 H, ala-CH-CH₃, R_P/S_P), 4.01-3.85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, R_P/S_P), 1.39-1.22 (m, 12H, all CH₃, R_P/S_P).

³¹P-RMN (CDCl₃) δ 3.60 (R_P), 3.20 S_P relativo a trifenilfosfato a -

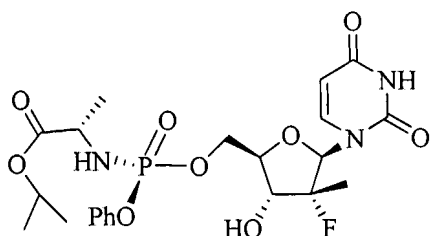
5/13

17.80 ppm. ES-EM M+1 530.2. Análisis Elemental: % Calculado (incluyendo agua al 0.29% como se encuentra por el análisis Karl Fisher) C, 49.75; H, 5.54; N, 7.90, F, 3.58, P, 5.84. % Encontrado: C, 49.50; H, 5.44; N, 7.85; F, 3.62; P, 6.05.

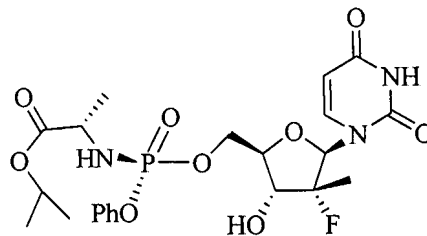
5 Discusión en separación de isómeros

El compuesto **4** debido a la quiralidad en el fósforo está comprendido de dos diaestereómeros, los cuales se designan como *S_P*-**4** y *R_P*-**4**. La asignación estereoquímica se hizo con base en el análisis de rayos X de cristal sencillo de *S_P*-**4**. Tanto *R_P*-**4** como *S_P*-**4** dan el producto cristalino.

Los procedimientos para cristalización se resumen a continuación.



S_P-**4**



R_P-**4**

Ejemplo 3. Cristalización del isómero *R_P*-**4**. La fracción cromatografiada que contiene el primer isómero *R_P*-**4** menos polar, eluido (3.8 g, 97% puro) se disolvió en isopropanol (36 g) y diluyó con heptanos hasta que fue turbia (72 g). La solución se sembró y agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El sólido resultante se colectó por filtración al vacío, lavó con heptanos (2x20 mL) y secó (50°C, 0.2 mm, 24 h) para 2.3 g de agujas blancas muy pequeñas pf 136.2-137.8°C. Pureza HPLC del material resultante se encontró para ser 99.02%.

R_P-**4**: ¹H-RMN (CDCl₃) δ 9.10 (br s, 1H, NH), 7.36 (m, 2H, o-aromático), 7.26-7.16 (m, 4 H, C6-H, m, p-aromático), 6.16 (br d, 1H, C1'-H), 5.58 (d, 1H, C5-H), 5.01 (sept, 1H, CH-(CH₃)₂), 4.52-4.47 (m, 2H, C-5'-H₂), 4.10 (d, 1H, C3'-H), 4.02-3.76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 1.37-1.20 (m, 12H, todo CH₃).

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

Método 1: Precipitación directa de crudo **4**: A una solución

55

agitada de clorohidrato de éster de L-alanina isopropilo (10.5g, 61.5mmol, azeotrópicamente seco, dos veces, con 50 mL de tolueno cada vez) en diclorometano (100 mL) se agregó fenidiclorofosfato (7.5 mL, 50 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió hasta -10°C y luego se agregó una solución de NMI (30.5 mL, 384.3mmol) en 30 mL de diclorometano durante un periodo de 30 min. Después de la terminación de la adición, la mezcla se agitó entre -10 y -15°C durante 1h. A la mezcla anterior se agregó 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3) (10g, 38.4mmol) en un lote y la mezcla se agitó a continuación -10°C durante 3h y luego lentamente se permitió calentar hasta 20°C (6h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante la noche (15h) y luego se apagó con 10 mL de metanol. El solvente se evaporó y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (200 mL). La capa EtOAc se lavó con agua (100mL), HCl 1N (3x75 mL), solución NaHCO₃ acuosa al 2% (50 mL) y salmuera (50mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, filtró y concentró. El residuo se secó bajo alto vacío durante 2h para dar la espuma blanca (22 g).

La espuma de arriba se disolvió en 33 mL de DCM y luego se agregó 65 mL de IPE (éter de isopropilo) para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de una almohadilla pequeña de Celite y el filtrado se agitó con semillas S_p-4 durante 72h a temperatura ambiente (alrededor de 22°C -nota que el enfriamiento de la suspensión hasta 0°C permite engrasar el producto crudo). El sólido blanco se filtró, lavó con IPE (20mL) y secó para dar 4.58g (mezcla ~85:15 de S_p-4:R_p-4 respectivamente como se determina por ³¹P RMN) de un polvo blanco. El sólido de arriba se suspendió en 23 mL de DCM y luego se puso a reflujo durante 3h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y agitó durante 15h. El sólido blanco se filtró, lavó con 4.5 mL de DCM frío y secó bajo alto vacío a 45°C para dar S_p-4 puro, pf 93.9-104.7°C, Pureza HPLC 99.74% (3.11g, 15.2% del nucleósido de uridina).

S_p-4 ¹H-RMN (CDCl₃) δ 8.63 (br s, 1H, NH), 7.47 (d, 1H, C6-H), 7.30 (m, 2H, o-aromático), 7.26-7.18 (m, 3H, m, p-aromático), 6.18 (br d, 1H, C1'-H), 5.70 (d, 1H, C5-H), 5.02 (sept, CH-(CH₃)₂), 4.53 (m,

107

2H, C-5'-H₂), 4.11 (d, 1H, C3'-H), 3.97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 3.77 (br s, 1H, ala-NH), 1.39 (d, 3H, C2'-CH₃), 1.37 (d, 3H, ala-CH₃), 1.24 (d, 6H, CH-(CH₃)₂).

Método 2: Lubricación del crudo **4**: A una solución agitada de clorohidrato de éster de L-alanina isopropilo (20.6g, 123mmol, azeotrópicamente seco, dos veces, con 75 mL de tolueno cada vez) en diclorometano (200 mL) se agregó fenidiclorofosfato (14.9 mL, 100 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió hasta -10°C y luego se agregó una solución de NMI (61.3 mL, 769 mmol) en 60 mL de diclorometano durante un periodo de 30 min. Después de la terminación de la adición, la mezcla se agitó entre -10°C y -15°C durante 1h. A la mezcla anterior se agregó 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**) (20g, 76.9mmol) en un lote y la mezcla se agitó a continuación -10°C durante 3h y luego lentamente se permitió calentar hasta 20°C (6h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante la noche (15h) y luego se apagó con 10 mL de metanol. El solvente se evaporó y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (400 mL). La capa EtOAc se lavó con agua (200 mL), HCl 1N (3x100 mL), solución NaHCO₃ acuosa al 2% (100 mL) y salmuera (50mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, filtró y concentró. El residuo se secó bajo alto vacío durante 2h para dar espuma blanca (43 g). La espuma de arriba se disolvió en 86 mL de EtOAc en un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con un agitador mecánico. Mientras se agita, 100 mL de heptano se agregó lentamente y la suspensión se agitó durante 1h. La capa superior se decantó y el residuo se agitó de nuevo con 50 mL de soluciones 2:3 EtOAc/heptano durante 10 min y luego se decantó. El residuo se secó bajo alto vacío para dar espuma blanca (31g).

La espuma de arriba se disolvió en 46 mL de DCM y luego se agregó 95 mL de IPE para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de una almohadilla pequeña de Celite y el filtrado se agitó con semillas S_p-4 durante 72h a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró, lavó con IPE (30mL) y secó para dar 7.33g (mezcla ~85:15 de S_p-4:R_p-4 respectivamente como se determina por ³¹P RMN) de polvo blanco.

5
25
26

El sólido de arriba se suspendió en 36 mL de DCM y luego se puso a reflujo durante 3h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y agitó durante 15h. El sólido blanco se filtró, lavó con 7.5 mL de DCM frío y secó bajo alto vacío a 45°C para dar >99% puro S_p-4 , (4.78g, 11.6% del nucleósido de uridina).

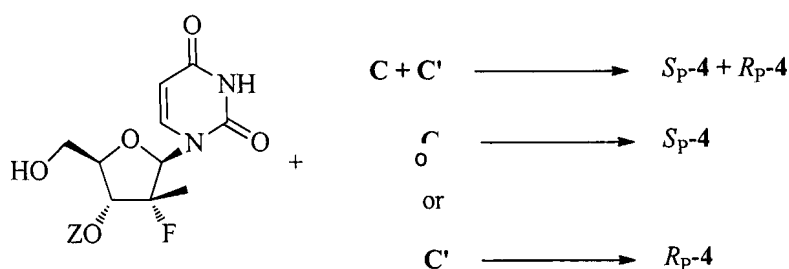
5 Método 3: Carga de gel de sílice de crudo **4**: 5.0 g de **4** crudo se produjo como en la misma manera que la mezcla de diaestereómeros justo antes de que la etapa de cromatografía de columna inicie con aproximadamente 2.5 g de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**). El crudo se disolvió en 10 mL de DCM y 10 g de gel de sílice se agregó a la solución. El solvente se evaporó para dar una mezcla espesa seca.
10 La mezcla espesa se agitó con 40 mL de EtOAc/hexanos al 50% durante 15 min y luego se filtró. El gel de sílice se lavó con 10 mL adicionales de EtOAc/hexanos al 50%. El gel de sílice luego se lavó con MeOH/DCM al 15% (100 mL) y colectó separadamente. El solvente se evaporó y secó bajo alto vacío para dar 4.0 g de residuo (espuma). El residuo se disolvió en DCM (6mL) y luego se agregó ~9mL de IPE para hacer una solución saturada. La mezcla luego se agitó suavemente durante la noche con semillas S_p-4 a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró y lavó con IPE (5 mL) para dar 1.28 g de producto. ^{31}P RMN revela que el producto anterior contiene mezcla 77:23 de S_p-4 : R_p-4 respectivamente. Esto se volvió a cristalizar de 20 mL de DCM para obtener 0.75 g de >99% puro S_p-4 (alrededor de 12% del nucleósido de uridina). Esta preparación de S_p-4 no requiere la etapa de sililación como se hace para la mezcla, así el procedimiento de reacción completo se muestra arriba. Los aspectos de las formas polimórficas y
15 cristalinas sencillas de S_p-4 se presentan a continuación.

20 Método 4: 40.0 g de mezcla 1:1 de **4** se disolvió en 90 mL de diclorometano. El éter de diisopropilo (70 mL) se agregó a la solución anterior para dar una solución saturada. (La cantidad de éter de diisopropilo puede variar con base en la pureza del producto.) La solución se sembró con S_p-4 puro (> 99%) y la mezcla se agitó suavemente con una barra agitadora a temperatura ambiente durante 20h

5
2
5

(se observó la formación del sólido después de 2h). El sólido se filtró, lavó con 40 mL de la mezcla de éter de diisopropilo/diclorometano (1:1) y secó para dar el sólido blanco (16.6 g, 89.35% puro S_P-4 por RMN). Este sólido se suspendió en 83 mL de diclorometano y se puso a reflujo durante 3h. La suspensión se enfrió hasta temperatura ambiente y agitó durante la noche. El sólido se filtró y lavó con 10mL de DCM frío. El sólido se secó bajo vacío para dar S_P-4 (13.1 g, 99.48% puro por HPLC). 11g de este sólido se volvió a disolver en 330 mL de DCM bajo condiciones calientes. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se dejó a esta temperatura durante la noche. El producto cristalino se filtró y secó para dar 10.5 g de S_P-4 (99.74 % por HPLC).

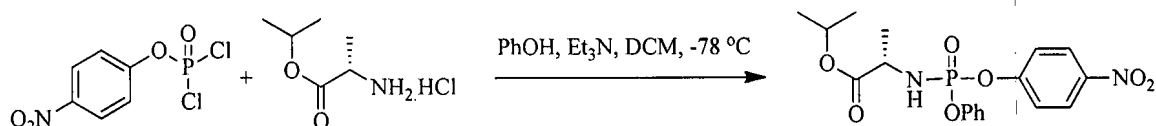
Los compuestos S_P-4 y R_P-4 pueden prepararse alternativamente, de acuerdo con la novena o decima modalidad, al hacer reaccionar el nucleósido (protegido o no protegido) **3** con un isopropil-alanil-fosforamidato (mezcla de **C** y **C'**, **C** o **C'**), como se muestra en la siguiente ecuación.



El P.D. Howes et al. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2003, Vol. 22, Nos. 5-8, pp. 687-689 ("Howes") describe 2'- y 5'-fosforamidatos obtenido por una reacción con cloruro de t-butilmagnesio. Allí, Howes describe que cuando un nucleósido de 3'-desoxi-citidina se hace reaccionar con éster de metilo del ácido (S)-2-[cloro-fenoxi-fosforilamino]propiónico en la presencia de 1.2 equivalentes de cloruro de t-butilmagnesio, fosforilación selectiva en la posición 2' ocurrida, pero con un equivalente adicional de fosforilación selectiva de cloruro de t-butilmagnesio en la posición 5' ocurrida. Esta descripción deberá contrastarse con aquella que se describe en el Esquema de Reacción 1.

5/12/21

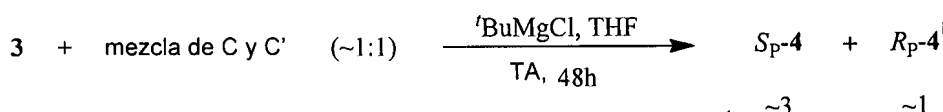
Ejemplo 5-1. Preparación de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico



10 A una solución agitada de fosforodicloridato de 4-nitrofenilo (12.8g, 50 mmol) en diclorometano (100 mL) se agregó una solución de fenol y trietilamina (7.7 mL, 55 mmol) en diclorometano (100 mL) a -78°C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contiene clorohidrato de éster de L-alanina isopropilo (8.38g, 50 mmol) en diclorometano (100 mL) a 0°C. A la mezcla se agregó una segunda porción de trietilamina (14.6 mL, 105 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1h y luego el solvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (150 mL) y el sólido blanco se filtró completamente. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar un aceite amarillo pálido. El compuesto crudo se procesó por cromatografía usando gradiente de acetato de etilo/hexanos al 0-20% para dar el producto (17g, 83% de rendimiento) como una mezcla de diaestereómeros en alrededor de la relación 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0.31, -0.47; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.31-8.27 (m, 2H), 7.51-7.37(m, 4H), 7.27-7.19(m, 3H), 6.70-6.63(m, 1H), 4.85-4.78(m, 1H), 3.97-3.86(m, 1H), 1.21-1.19(m, 3H), 1.11-1.09 (m, 6H); EM (ESI) m/z 407 (M-1)⁺. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -2.05, -2.10; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (d, J = 9.2Hz, 2H), 7.41-7.33(m, 4H), 7.26-7.18(m, 3H), 5.05-4.96(m, 1H), 4.14-4.05(m, 1H), 3.93-3.88(m, 1H), 1.38(d, J = 6.8Hz, 3H), 1.22 (dd, J = 6.2 & 3.0Hz, 6H); EM (ESI) m/z 407 (M-1)⁺.

15

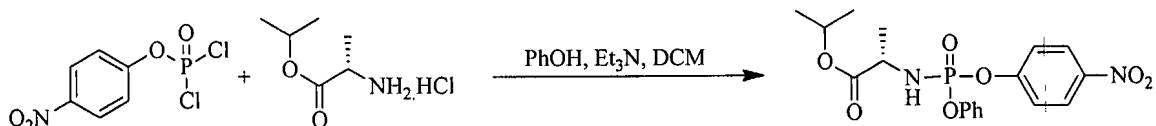
Ejemplo 5-2. Preparación de S_p-4/R_p-4.



60
39

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroxi-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (130 mg, 0.5 mmol) en THF seco (1.5 mL) se agregó una solución 1.0M de cloruro de tert-butilmagnesio (1.05 mL, 1.05 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un periodo de 5 min. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (1:1 mezcla de isómeros, 408 mg, 1 mmol) en THF (1.5 mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 5 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 48h y luego se apagó con NH₄Cl acuoso saturado (20 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo (50 mL) y agua (20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, filtró y concentró bajo presión reducida para dar un residuo amarillo pálido. La cromatografía de columna del residuo usando gradiente de MeOH/diclorometano al 0-2% da un sólido de espuma blanca (125 mg, 47% de rendimiento, mezcla de S_p-4/R_p-4 en alrededor de la relación 3.05:1.0).

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



El clorohidrato de éster de L-alanina isopropilo (330 g, 1.97 mol) se pre-secó por co-evaporación con tolueno (2 x 400 mL) bajo presión reducida y luego se secó en un horno al vacío (50°C, 0.2 mmHg, 17 h). A una solución agitada de fosforodichloridato de 4-nitrofenilo (500.0 g, 1.953 mol) en diclorometano anhidro (3.0 L) se agregó una solución de fenol (183.8 g, 1.953 mol) y trietilamina (300 mL, 2.15 mol) en diclorometano (900 mL) a -60°C temperatura interna durante un periodo de 3 horas. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min adicionales y luego se permitió calentar hasta -5°C durante 2.5

6,
60

horas. El éster de aminoácido pre-secado se agregó a $-5\sim 0^{\circ}\text{C}$ bajo una atmósfera de nitrógeno durante 10 mins. El residuo de sal de éster de amino en el matraz de adición se transfirió a la mezcla de reacción por medio del enjuague con diclorometano (2 x 100 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 40 mins y una segunda porción de trietilamina (571 mL, 4.10 mol) se agregó durante un periodo de 40 mins a 0°C . La mezcla se agitó a $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ durante 3 h y luego el sólido blanco (clorohidrato de trietilamina) se filtró completamente y enjuagó con diclorometano (3 x 300 mL). El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo se trituroó con éter de metil t-butilo (MTBE, 4 L). La sal sólida adicional así formada se filtró completamente y enjuagó con MTBE (3 x 150 mL). El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el aceite color café ligero claro. El residuo se co-evaporó con hexanos (2 x 140 mL) para remover cualquier MTBE residual y secó además bajo vacío a 40°C durante 2 horas. El residuo seco se mezcló con éter de diisopropilo (IPE, 1.1 L) y agitó a 5°C en un baño de agua con hielo. La cantidad pequeña de semillas de cristal del isómero S_p deseado del producto se agregó a la solución y la mezcla se agitó a 5°C durante sobre 22 h para formar una mezcla espesa media. Esto se dejó reposar en un congelador (-10°C) durante 44 h. El producto precipitado se colectó por medio de filtración y enjuagó con solventes mezclados pre-enfriados de IPE y hexanos (1:1, 3 x 190 mL). El sólido se secó bajo vacío (0.5 mm Hg) a temperatura ambiente hasta que un peso constante se obtuvo para dar 227.23 g (rendimiento: 28.5%) como un sólido en polvo blanco. La relación de dos diaestereómeros $S_p:R_p$ fue 9.65/1 con base en ^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6 , δ -0.31 (S_p), -0.47). El producto se volvió a cristalizar al disolver en IPE (840 mL) mientras que se calienta en un baño a 60°C . La solución anterior se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego una cantidad pequeña de semillas de isómero S_p de cristal se agregó. El sólido en polvo blanco se formó dentro de 2 horas y el matraz se almacenó en un congelador (-10°C) durante 16 horas. Un sólido cristalino fino y blanco obtenido se filtró, lavó con IPE pre-enfriado (3x 50 mL) y secó

52
62

bajo vacío (ambiente, 0.5 mm Hg) a un peso constante para dar el sólido suave blanco (177.7 g, 22% de rendimiento general o 44% de rendimiento general con base en el rendimiento teórico del isómero S_P) con relación diaestereomérica de 48/1 con base en ^{31}P -RMN. Pf 62-66°C.

5 ^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.31; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.49(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.41-7.37(m, 2H), 7.23-7.19 (m, 3H), 6.66 (dd, $J=13.6$, 10.0Hz, 1H), 4.86-4.78 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.19 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.10(d, $J=6.4\text{Hz}$, 6H);

10 ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3): δ -2.05; (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.31; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.22 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.41-7.33 (m, 4H), 7.26-7.18(m, 3H), 5.05-4.96(m, 1H), 4.14-4.05 (m, 1H), 3.93-3.88(m, 1H), 1.38(d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H), 1.22 (dd, $J=6.2$ & 3.0Hz, 6H); ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.49(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.41-7.37(m, 2H), 7.23-7.19 (m, 3H), 6.66 (dd, $J=13.6$, 10.0Hz, 1H), 4.86-4.78 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.19 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.10(d, $J=6.4\text{Hz}$, 6H)

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

La estereoquímica de **8** (isómero S_P) se ha confirmado por cristalografía de rayos X de cristal sencillo, ver detalles proporcionados a continuación.

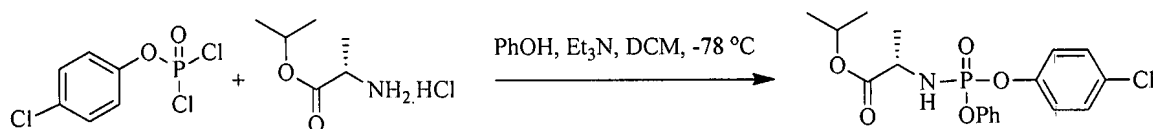
Ejemplo 7. Separación de la mezcla diaestereomérica de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico por SFC

15 Una muestra de la mezcla de diaestereómeros (4.8 g) enriquecida con el isómero R_P se sometió a SFC usando una columna ChiralPak AD-H (2x15 cm) y eluyó con isopropanol al 35% en dióxido de carbono a 100 bar. Una carga de inyección de 4 mL de la muestra a una concentración de 17 mg/mL de metanol se usó. El isómero R_P [éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] se eluye primero. Las fracciones
20 apropiadas de las corridas múltiples se combinaron y concentraron bajo presión reducida para dar 2.9 g del isómero R_P [éster de

isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] como un aceite viscoso amarillo ligero y 1.9 g del isómero S_p [éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] como un sólido blanco. Los datos analíticos del isómero R_p son similares al producto aislado por el método de cristalización anterior.

Datos analíticos para éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero R_p): ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0.47; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.46-7.38 (m, 4H), 7.27-7.20 (m, 3H), 6.68 (dd, J=13.8, 10.2Hz, 1H), 4.86-4.77 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.20 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.10 (dd, J=6.2, 2.2Hz, 6H); **EM (ESI)** m/z 407 (M-1)⁺.

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



A una solución agitada de fosforodichloridato de 4-cloro-fenilo (2.45 g, 10.0 mmol) en diclorometano (20 mL) se agregó una solución de fenol (0.94 g, 10 mmol) y trietilamina (1.56 mL, 11 mmol) en diclorometano (20mL) a -78°C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contiene clorohidrato de éster de L-alanina isopropilo (1.67 g, 10 mmol) en diclorometano (50 mL) a 0°C. A la mezcla se agregó un segundo lote de trietilamina (2.92 mL, 21 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1h y luego el solvente se evaporó. El residuo se trituro con acetato de etilo (30 mL) y el sólido blanco se filtró completamente. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el aceite amarillo pálido. El compuesto crudo se procesó por cromatografía usando gradiente de acetato de etilo/hexanos al 10-20% para dar el producto (2.0 g, 50% de rendimiento) como una mezcla de diaestereómeros en alrededor de relación 1:1.

65
63

³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -1.58, -1.62; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.06-7.51 (m, 8H), 7.15-7.28 (m, 2H), 7.29-7.47 (m, 2H), 4.0-4.10 (m, 1H), 3.82-3.88 (m, 3H), 1.35-1.36 (dd, 6H); 1.19-1.22 (m, 3H). **EM (ESI)** m/z 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización, o cromatografía, como se anota arriba.

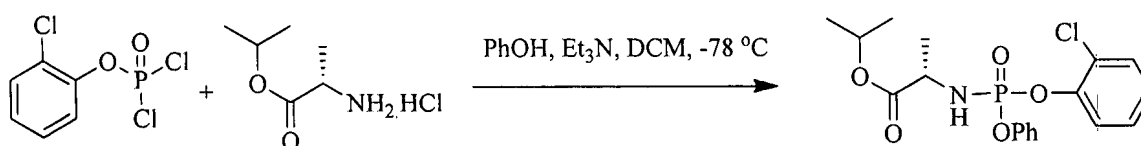
5

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

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroxiometil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (**3**, 2.6 g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (12.4 mL, 21 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, una solución de **éster de isopropilo del ácido (2-[(4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico** racémico (4.08g, 10 mmol) en THF (15mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 10min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 72. CCD co-mancha con producto auténtico muestra que alrededor de 5% del producto deseado se ha formado comparado con el nucleósido de partida.

10

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



15

A una solución agitada de fosforodichloridato de 2-cloro-fenilo (9.8 g, 40 mmol) en diclorometano (80 mL) se agregó una solución de fenol (3.76 g, 40 mmol) y trietilamina (6.16 mL, 44 mmol) en diclorometano (80 mL) a -78°C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contiene clorohidrato de éster de L-alanina isopropilo (6.7 g, 40 mmol) en diclorometano (150 mL) a 0°C. A la mezcla se agregó una segunda porción de

20

25

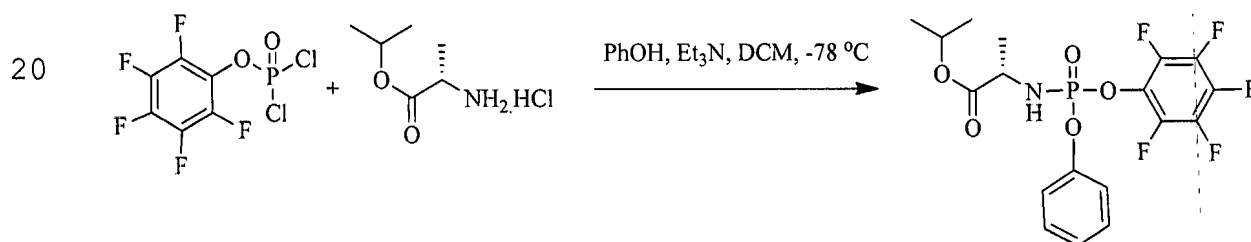
65
64

trietilamina (11.6 mL, 84 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1h y luego el solvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (100 mL) y el sólido blando se filtró completamente. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el aceite amarillo pálido. El compuesto crudo se procesó por cromatografía usando gradiente de acetato de etilo/hexanos al 10-20% para dar el producto (11.3g, 72% de rendimiento) como una mezcla de diaestereómeros en alrededor de la relación 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -1.58, -1.61; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.06-7.51 (m, 8H), 5.02-5.94 (m, 1H), 4.10-4.16 (m, 1H), 3.31-3.94 (m, 1H), 1.18-1.35 (m, 3H), 1.38-1.40 (dd, 6H); EM (ESI) m/z 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización, o cromatografía, como se anota arriba.

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

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (3, 2.6 g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (12.4 mL, 21 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (2-[(2-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (racémico 4.08 g, 10 mmol) en THF (15 mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 10 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 72h. La CCD co-mancha con producto auténtico muestra que alrededor de 5-10% del producto deseado se ha formado comparado con el nucleósido de partida.

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



66
67

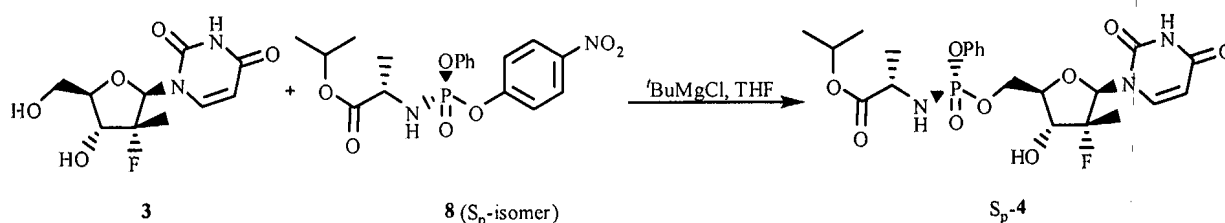
A una solución agitada de fosforodichloridato de pentafluorofenilo (6.0 g, 20 mmol) en diclorometano (40 mL) se agregó una solución de fenol y trietilamina (3.08 mL, 22 mmol) en diclorometano (40 mL) a -78°C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contiene clorohidrato de éster de L-alanina isopropilo (3.35 g, 20 mmol) en diclorometano (100 mL) a 0°C. A la mezcla se agregó un segundo lote de trietilamina (5.84 mL, 42 mmol) durante un periodo de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1h y luego el solvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (60 mL) y el sólido blanco se filtró completamente. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el aceite amarillo pálido como una mezcla de diaestereómeros en alrededor de la relación 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ - 0.49, -0.58. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización, o cromatografía, como se anota arriba.

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

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (**3**, 2.6g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se agregó una solución 1.7M de cloruro de tert-butilmagnesio (12.4mL, 21mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, una solución de **éster de isopropilo del ácido (2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico** racémico crudo (4.08g, 10mmol) en THF (15mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 10 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 72h. La CCD en co-mancha con producto auténtico muestra que alrededor de 40-50% del producto deseado se ha formado comparado con el nucleósido de partida.

La preparación y purificación de **C** o **C'** se proporciona para acceso directo a ya sea **S_p-4** o **R_p-4**, como se ilustra en los siguientes ejemplos.

52
66



5

Ejemplo 11. Preparación de *S_p*-4 (escala de 32 mg): A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona **3** (32 mg, 0.12 mmol) en THF seco (1 mL) se agregó una solución 1M de cloruro de tButilmagnesio (0.26 mL, 0.26 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un periodo de 3 min. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero *S_p*) en THF (0.5mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 3 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 42h y luego se apagó con NH₄Cl acuoso saturado (10 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo y agua. El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro y concentró. El residuo se procesó por cromatografía usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-4% para dar *S_p*-4 como sólido espumoso (29mg, 44.5% de rendimiento). ¹H y ³¹P RMN de acuerdo con lo que se describe en la presente.

Ejemplo 12. Preparación de *S_p*-4 (escala de 2.6 g, sin cromatografía): A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (2.6 g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (12.4 mL, 21 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero *S_p*, 4.08 g, 10 mmol) en THF (15 mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 10 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente por 60h y luego se apagó con NH₄Cl acuoso saturado (20 mL). La mezcla se dividió entre acetato

52
67

de etilo (150 mL) y secuencialmente, Na_2CO_3 acuoso al 10% (3 x 20 mL) y agua (20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, filtró y concentró bajo presión reducida para dar un residuo amarillo pálido (3.8 g). El residuo se disolvió en diclorometano (7.6 mL) y luego agitó durante 20h a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró, lavó con 1:1 IPE/diclorometano (5 mL) y secó bajo vacío para dar el producto puro como sólido blanco (1.85 g, 35% de rendimiento).

Ejemplo 13. Preparación de S_p -4 usando NaHMDS: A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (71 mg, 0.27 mmol) en THF seco (2.0 mL) se agregó una solución 2.0 M de bis(trimetilsilil)amida de sodio (NaHMDS) en THF (270 μL , 0.54 mmol) a -78°C durante un periodo de 2 min. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-Nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8**, isómero S_p , 111 mg, 0.27 mmol) en THF (1 mL) se agregó a la mezcla. La mezcla de reacción se permitió agitar a esta temperatura durante 2h y luego se calentó hasta -20°C a cuya temperatura se agitó durante 20h adicionales. La CCD indica ~30% de material de partida de nucleósido sin reaccionar. Por lo tanto, 0.5 equivalentes adicionales del reactivo (55 mg, 0.14 mmol) en THF (0.5 mL) se agregó a la mezcla de reacción y agitó durante otras 6 h. La mezcla de reacción se apagó con solución de cloruro de amonio acuoso saturado y luego se dividió entre acetato de etilo y agua. El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro y concentró para dar un residuo café ligero. La cromatografía de columna del producto crudo usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-5% da S_p -4 (22 mg, 15% de rendimiento), 3'-fosforamidato (**5**, isómero S_p , 11.5 mg, 16% de rendimiento) y bis fosforamidato (**6**, S_p , isómero S_p , 12.6 mg).

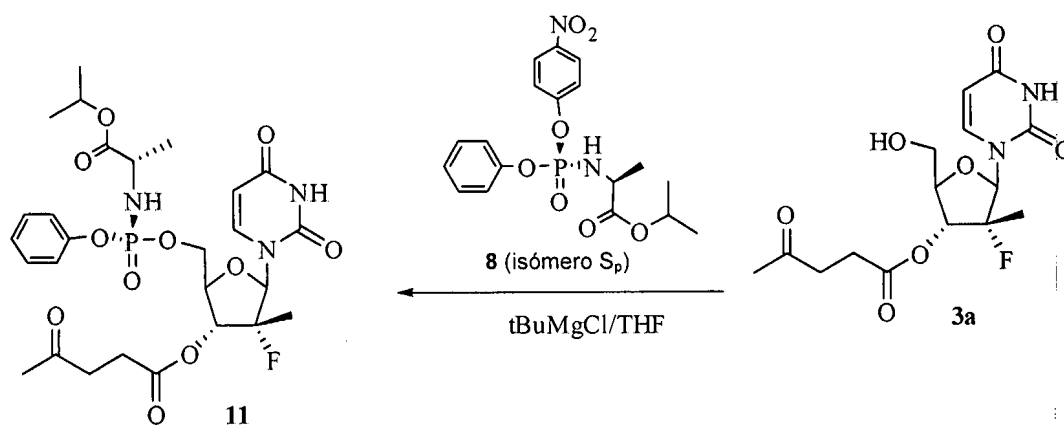
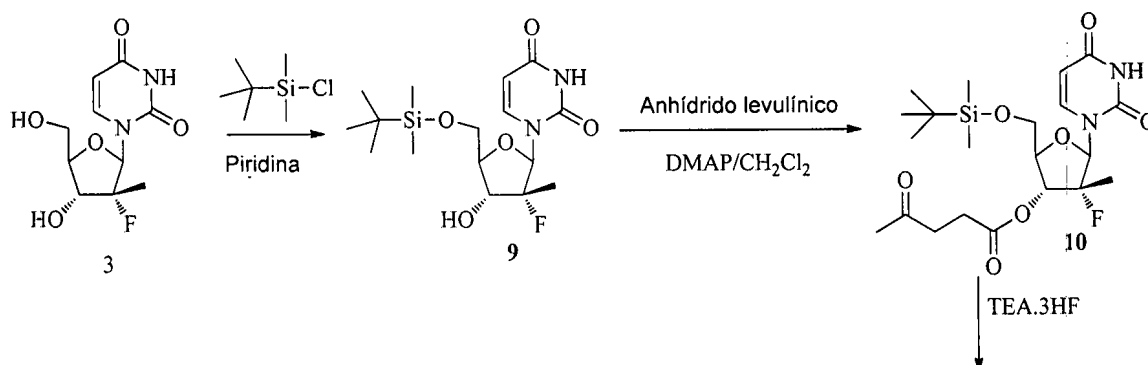
Ejemplo 14. Preparación de R_p -4 (escala de 260 mg): A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (260 mg, 1 mmol) en THF seco (6 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (1.23 mL, 2.1 mmol, 2.1 equiv) a temperatura ambiente

CS
OF

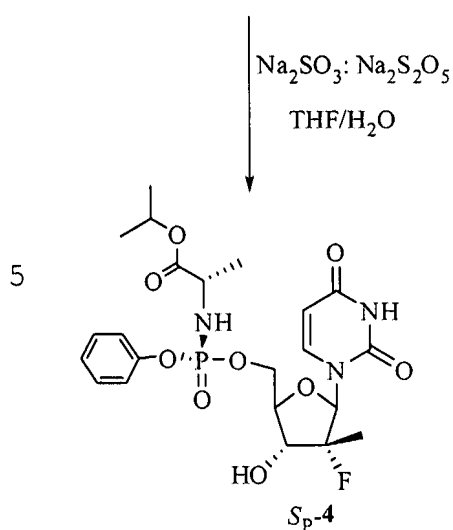
durante un periodo de 5 min. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero R_P) en THF (3 mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 3 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 96 h y luego se apagó con NH_4Cl acuoso saturado (10 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo (50 mL) y agua (2 x 20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, filtró y concentró bajo presión reducida para dar un residuo amarillo pálido (490 mg). El residuo se procesó por cromatografía usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-5% para dar el producto como un sólido blanco (160 mg, 30% de rendimiento).

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

Ejemplo 15. Preparación de S_P -4 como 3a como un Intermediario Sintético



20/09



10

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

A una solución agitada de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3, 81.1 g, 312 mmol) en piridina seca (750 mL) se agregó gota a gota una solución de TBDMSCl (103.19 g, 685.6 mmol) en piridina seca (500 mL) durante un periodo de 45 min a temperatura ambiente. La reacción se permitió agitar a temperatura ambiente durante 24 h. Metanol (85 mL) se agregó a la mezcla de reacción y se permitió agitar durante 10 min y luego los solventes se destilaron completamente bajo presión reducida. Agua caliente (45°C) (1 L) se agregó a la masa de reacción y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 500 mL), lavó con agua (1 x 500 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El acetato de etilo se diluyó completamente y el residuo

15 obtenido se co-evaporó con tolueno (2 x 500 mL) para dar el crudo 9 como una espuma blanca. Rendimiento = 116.9 g (cuantitativo). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.1 (s, 6H), 0.91 (s, 9H), 1.22 (d, 3H, J = 21 Hz), 2.50 (s, 2H), 3.75-4.05 (m, 4H), 5.54 (d, 1H, J = 9 Hz), 5.73 (s, 1H), 6.0 (d, 1H, J = 18 Hz), 7.81 (d, 1H, J = 9 Hz), 8.57 (br, s, 1H), 11.1 (s, 1H).

20

Ejemplo 15-2. Síntesis de 5'-O-(tert-Butildimetilsilil)-3'-O-

25

12
70

levulinil-2'-desoxi-2'-fluoro 2'-C-metil-uridina (10):

A una solución agitada de nucleósido **9** (116.9 g, 312.1 mmol) en DCM (1 L) se agregó DMAP (30.5 g, 249.7 mmol) y esto se permitió agitar a TA durante 20 min. Una solución de anhídrido levulínico (133.6 g, 642.3 mmol) en DCM (200 mL) se agregó a la mezcla y se permitió agitar durante 24 h. La CCD de la mezcla indica la terminación de la reacción. Agua fría (500 mL) se agregó y la mezcla se agitó durante 20 min. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con solución de bicarbonato de sodio saturado (2 x 250 mL), secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego el solvente se destiló bajo presión reducida para dar el aceite amarillo. Rendimiento crudo: 197.6 g (135%). El material se usó como es para la siguiente etapa. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.11 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 1.34 (d, 3H, $J = 21$ Hz), 2.22 (s, 3H), 2.6-2.89 (m, 4H), 3.72 (m, 1H), 4.01 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4.23 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 5.33 (dd, 1H, $J = 15$ Hz), 5.73 (d, 1H, $J = 6$ Hz), 6.26 (d, 1H, $J = 15$ Hz), 8.12 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 8.72 (br, s, 1H).

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

El crudo **10** (197.6 g, ~312.1 mmol) se disolvió en DCM (1 L) al cual se agregó TEA.3HF (50.3 g, 312.1 mmol) y se permitió agitar durante la noche a temperatura ambiente. La CCD de la mezcla indica alrededor de 50% de terminación de la reacción. Otro equivalente de TEA.3HF (50.3 g, 312.1 mmol) se agregó y la mezcla de reacción se permitió agitar durante 6 h. La CCD en este punto indica alrededor de 10% de material de partida sin reaccionar. Otros 0.25 eq de TEA.3HF (12.5 g, 78.0 mmol) se agregó y la mezcla de reacción se permitió agitar durante la noche. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad para dar el aceite amarillo. El crudo de todos los lotes se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (MeOH al 0-2% en DCM) para dar 124.1 g de 3'-levulinate como un sólido de espuma blanca (90% de rendimiento purificado durante tres etapas de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina). ^1H RMN: (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.55

27

(d, 3H, CH₃, J = 20 Hz), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.8-3.03 (m, 5H, CH₂CH₃), 3.91-3.96 (dd, 1H, CH''), 4.2-4.25 (m, 1H, CH'), 4.34 (dd, 1H, CH, J = 8 Hz), 5.25 (dd, 1H, J = 16 Hz), 5.93 (d, 1H, J = 8 Hz), 8.20 (d, 1H, J = 8 Hz), 9.18 (s, 1H).

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

10 A una solución del nucleósido (3a, 1.00 mmol, 358 mg) en 5 ml de THF anhidro que se enfrió hasta 0°C se agregó tBuMgCl (1.7 M en THF, 2 eq) y se permitió calentar hasta temperatura ambiente y agitó durante media hora. A esta mezcla se agregó el reactivo (ca. 97% de pureza quiral) éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero S_P) (408 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq.) en un lote y se permitió agitar a ta. Después de 16 h, se dejó ~30% del material de partida. La mezcla de reacción se apagó con solución de NH₄Cl saturada 10 ml, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x25 ml). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera y secó sobre sulfato de sodio anhidro y evaporó hasta sequedad para dar una espuma amarilla pálida (500 mg). Esto se purificó por cromatografía en gel de sílice usando metanol al 2-5% en cloruro de metileno para dar el producto como una espuma blanca (275 mg) de alrededor de 97% de pureza quiral P y material de partida sin reaccionar (162 mg). Con base en el material de partida consumido, el
15 rendimiento fue 76%. ³¹P RMN (CDCl₃, 162 MHz): 3.7 ppm; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.22 (dd, 6H, J = 6.4 Hz), 1.37 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.63-2.9 (m, 4H), 4.0 (d, 1H, J = 8 Hz), 4.2-4.33 (m, 1H), 4.57 (d, 1H, J = 8Hz), 4.96-5.00 (sept, 1H), 5.2 (dd, 1H, J = 9 Hz), 5.42 (d, 1H, J = 8Hz), 6.19 (d, 1H, J = 18Hz), 7.15-7.35 (m, 5H), 7.5 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 8.2 (br, s, 1H).

20

Ejemplo 15-5. Síntesis de éster de (S)-isopropilo del ácido (S)-2-

72

{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino}-propiónico (*S_P*-4)

Una solución de sulfito de sodio se preparó al agregar Na₂S₂O₃ (1.51 g) y Na₂S₂O₅ (0.57 g) en agua (25 mL). A una solución del levulinato (**11**, 250 mg, 0.40 mmol) en THF anhidro (2.5 mL) se agregó 1.0 ml de la solución de sulfito de sodio. Esto se permitió agitar a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se vació en agua (15 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3x25 mL) secó y evaporó para dar cuantitativamente un producto sólido blanco con alrededor de 97% de pureza quiral P que iguala las propiedades físicas y espectrales de *S_P*-4 producido directamente del nucleósido no protegido.

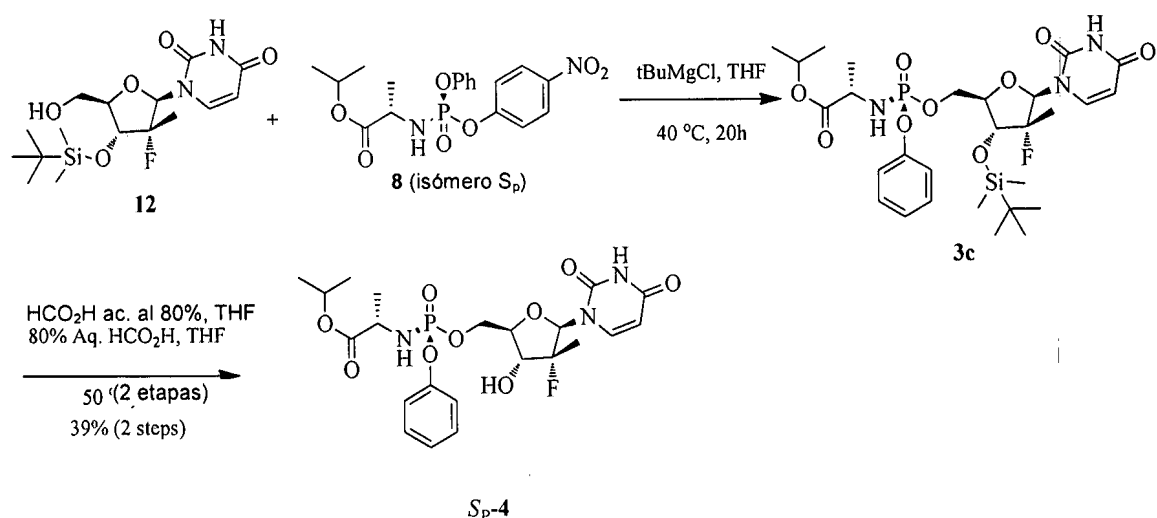
Ejemplo 16. Procedimiento alternativo para preparar *S_P*-4 de 3a.

A una solución agitada de éster de (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-fluoro-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ilo del ácido 4-oxo-pentanoico (**3a**, 210 mg, 0.59 mmol) en THF seco (1.5 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (1.07 mL, 1.82 mmol) a temperatura ambiente durante un periodo de 2 min. Inicialmente, un precipitado blanco se observó y después de 10 min la mezcla de reacción se volvió a la solución amarilla oscura. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8** (isómero *S_P*), 382 mg, 0.94 mmol) en THF (1.5mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 3min. La mezcla se calentó a 40°C durante 5h en cuyo tiempo CCD y ¹H RMN indican menos de 2% de material de partida sin reaccionar. La reacción se apagó con cloruro de amonio acuoso saturado y luego se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se lavó con solución de Na₂CO₃ acuoso al 10% (3 x 10 mL), seguido por agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y concentró para dar el residuo color café (410 mg). El producto crudo se disolvió en tetrahidrofurano (1.0 mL) y luego se agregó una solución acuosa de la mezcla de sulfito de sodio (37 mg,

74
75

0.295 mmol) y metabisulfito de sodio (224 mg, 1.18 mmol) en 1 mL de agua. La mezcla se calentó a 45°C durante 20 h en cuya etapa solamente alrededor de 10% de la conversión se observó por CCD, por lo tanto el sulfito de sodio adicional (74 mg) y metabisulfito de sodio (448 mg) se agregó y el calentamiento se continuó durante 52 h adicionales. En este tiempo, alrededor de 40% de la conversión se observa por CCD. La mezcla de reacción se dividió entre agua y acetato de etilo. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y concentró para dar un residuo café (210 mg). La cromatografía de columna del residuo usando gradiente de MeOH/DCM al 0-5% da material de partida sin reaccionar (89 mg) y *S_p*-4 (57 mg, 18% de rendimiento, 24% con base en el material de partida recuperado).

Ejemplo 17. Preparación de *S_p*-4 con 3c como un intermediario sintético



Ejemplo 17-1. Preparación de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-butildimetilsilaniloxy)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2,4-diona, 12.

A una solución de **3** (10.0g, 38.43 mmol) en piridina (50 mL) se agregaron diclorometano (50 mL). La solución se enfrió hasta 0°C. A la solución se agregó cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (14.32 g, 42.27 mmol) y la solución se agitó a 0°C durante 5 h. El metanol (5 mL) se agregó para apagar la reacción. La solución se concentró hasta sequedad bajo presión reducida y el residuo se dividió entre acetato de etilo (500 mL) y agua (50 mL). La solución orgánica se lavó con

25

salmuera (50 mL) y secó (sulfato de sodio, 4 g). El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (100 mL). A la solución se agregaron imidazol (7.83 g, 115 mmol) y cloruro de t-butildimetilsililo (8.68 g, 57.6 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El metanol se agregó para apagar la reacción (5 mL) y el solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se dividió entre acetato de etilo (500 mL) y agua (50 mL). La solución orgánica se secó (sulfato de sodio, 4 g) y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía de columna (EtOAc al 10-40% en Hexano) para dar el producto intermediario 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS. Esto a su vez se trató con ácido trifluoroacético al 1% en diclorometano (200 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1h. Agua (20 mL) se agregó y la solución se agitó a temperatura ambiente durante otra 1h. Metanol (5 mL) se agregó lentamente y la solución se agitó a temperatura ambiente durante otra 1h. El hidróxido de amonio se agregó para ajustar el pH de la solución hasta 7. La solución orgánica se separó, secó (sulfato de sodio, 4 g) y evaporó hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (1-5% metanol en diclorometano) para dar **12** como un sólido blanco 7.5g en 50% de rendimiento durante las tres etapas. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm) 11.48 (br s, 1H, NH), 7.94 (d, 1H, H-6), 6.00 (d, 1H, H-1'), 5.69 (d, 1H, H-5), 4.06 (dd, 1H, 3'-H), 3.85 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3.58 (br d, 1H, H-5'b), 1.27 (d, 3 H, 2-CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.12 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

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

A una solución agitada de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2,4-diona (**12**, 374 mg, 1 mmol) en THF seco (3 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (1.8

702

mL, 3.1 mmol)) a temperatura ambiente durante un periodo de 2 min. Inicialmente, un precipitado blanco se observó y después de 10 min la mezcla de reacción se volvió para aclarar la solución amarilla oscura. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-
5 [(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8**, isómero S_P , 653 mg, 1.6 mmol) en THF (2.5 mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 3 min. La mezcla se calentó a 40°C durante 20 h en cuyo tiempo CCD y ^1H RMN indican menos de 5% de material de partida sin reaccionar. La mezcla de reacción se apagó con cloruro de amonio acuoso saturado y luego se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa
10 orgánica se lavó con solución de Na_2CO_3 acuoso al 10% (3 x 10 mL), seguido por agua (20 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y concentró para dar el residuo café que contiene **3c** (850 mg). El producto crudo se disolvió en tetrahidrofurano (2 mL) y se agregó 0.8 mL de ácido fórmico acuoso al 80% a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 96h. Alrededor de 70% de conversión se observó por CCD. La mezcla de reacción se vació en bicarbonato de sodio acuoso saturado frío y luego se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y concentró para dar el residuo café (220 mg). La cromatografía de columna del residuo usando gradiente MeOH/DCM al 0-
5% da el material de partida sin reaccionar (21 mg) y S_P -**4** (77 mg, 35% de rendimiento, 39% de rendimiento con base en el material de partida recuperado).

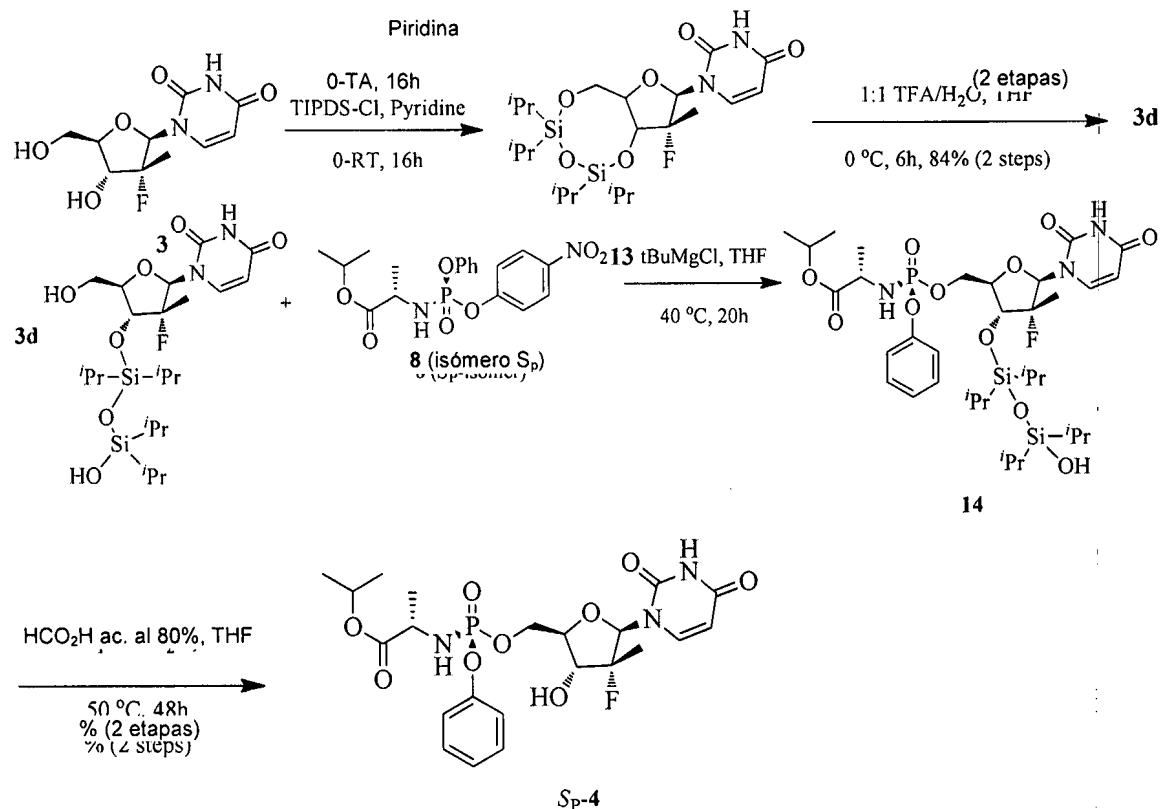
15

20

25

72
76

Ejemplo 18. Preparación de S_p -4 con 3d como un intermediario sintético



Ejemplo 18-1. Preparación de 3d

A una solución agitada de **3** en piridina (20 mL) a 0 °C se agregó TIPDS-Cl gota a gota durante un periodo de 15 min. La mezcla lentamente se permitió calentar hasta temperatura ambiente a cuya temperatura se agitó durante 16 h. La piridina se evaporó y el residuo se co-evaporó con tolueno (50 mL). El residuo luego se trituró con hexanos y el precipitado blanco se filtró completamente usando una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar un sólido espumoso (12.97 g). El producto crudo (**13**) se volvió a disolver en tetrahydrofurano (75 mL) y se agregó una solución acuosa de TFA (75mL, 1:1 TFA/agua) a 0 °C durante un periodo de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 6 h. CCD indica ~5% del material de partida. La mezcla de reacción se apagó con NaHCO₃ acuoso saturado hasta pH 8 y luego se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó con agua, secó y concentró para dar el sólido cristalino blanco. La trituración adicional del sólido con

27

hexanos (30 mL) da sólido blanco el cual se filtró y secó bajo alto vacío para dar **3d** (10.1 g, 84% de rendimiento durante 2 etapas). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.83 (bs, 1H), 7.94 (bd, J=6.0Hz, 1H), 6.10 (bd, J=18.4Hz, 1H), 5.71 (d, J=8.2Hz, 1H), 4.43 (bs, 1H), 4.36 (dd, J=22.6, 9.0Hz, 1H), 4.27 (bs, 1H), 4.10 (d, J=13.2Hz, 1H), 4.03 (d, J=9.2Hz, 1H), 3.92 (d, J=13.2Hz, 1H), 1.39 (d, J=22.0Hz, 3H), 1.11-0.92 (m, 28H).

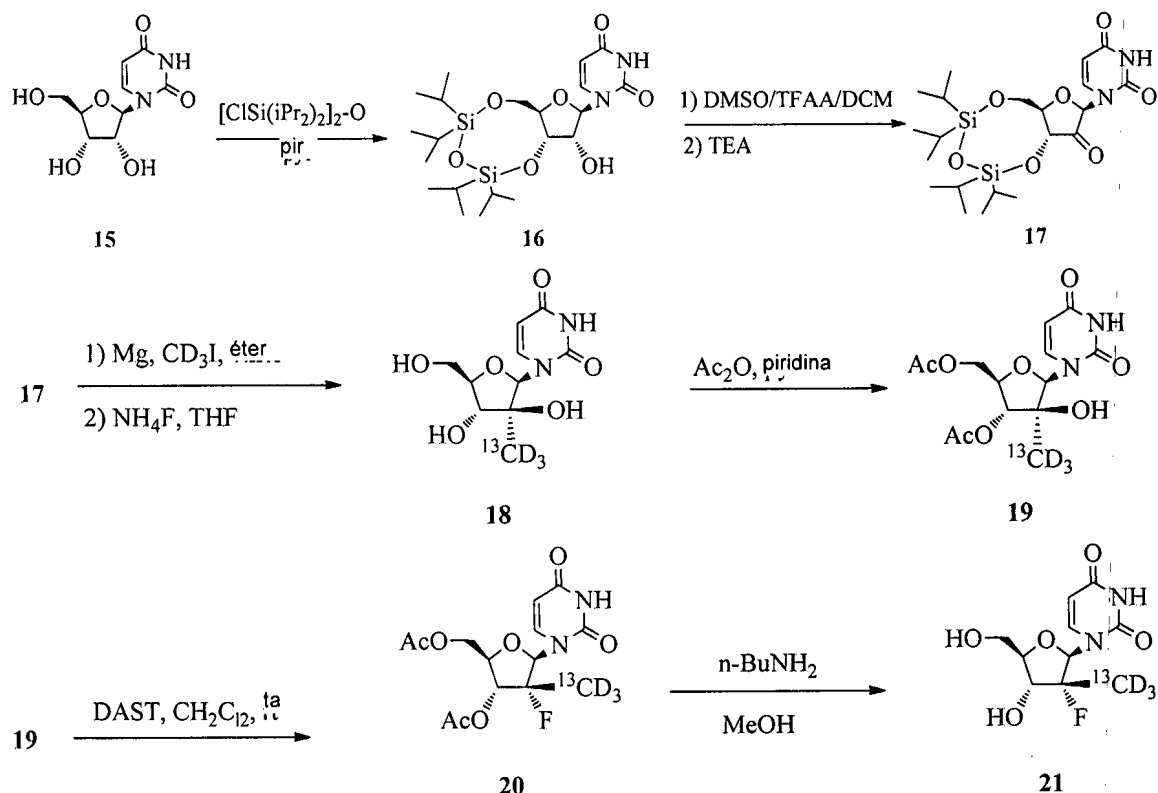
Ejemplo 18-2. Preparación de S_P-4

10 A una solución agitada de **3d** (520 mg, 1 mmol) en THF seco (5 mL) se agregó una solución 1.7M de cloruro de tert-butilmagnesio (1.8 mL, 3.1 mmol, 3.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un periodo de 15 min. Después de 30 min, una solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico (**8**, isómero S_P, 653 mg, 1.6 mmol) en THF (1 mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 3 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 60 h. ¹H y ³¹P RMN de la muestra cruda indica la mezcla de diaestereómeros en alrededor de 1:0.76. La mezcla de reacción se apagó con NH₄Cl acuoso saturado (20 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo (150 mL) y secuencialmente, Na₂CO₃ acuoso al 10% (3 x 20 mL) y agua (20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, filtró y concentró bajo presión reducida para dar un residuo amarillo pálido (**14**, 878 mg).

15 El compuesto anterior, **14**, se volvió a disolver en tetrahidrofurano (3 mL) y luego se agregó ácido fórmico acuoso al 80%. La mezcla se calentó a 55°C durante 20h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y luego se apagó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (pH 7.0). La mezcla de reacción luego se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y concentró para dar 560 mg del residuo. El residuo se procesó por cromatografía usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-5% para dar 20 material de partida sin reaccionar (**14**, 242mg) y S_P-4 (80mg, 15% de rendimiento) como un sólido blanco.

78

Ejemplo 19. Preparación de S_P-4 Etiquetado Isotópicamente



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

La uridina (15, 100.0 g, 409.5 mmol) se co-evaporó hasta sequedad con piridina anhidra (600 mL) y se volvió a suspender en piridina anhidra (700 mL). A esta suspensión fina agitada se agregó 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (135.7 g, 482.5 mmol) durante 60 min a temperatura ambiente. Después de agitar la suspensión fina durante 17 h a temperatura ambiente, la reacción se apagó al agregar metanol (20 mL) y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo se dividió entre acetato de etilo (1.5 L) y agua (2 L). La capa orgánica se lavó además con ácido clorhídrico al 5% (2 x 1 L), salmuera (500 mL), se secó sobre sulfato de sodio sólido (50 g), filtró y concentró bajo presión reducida para el producto crudo, ca 250 g. El residuo se sometió a una columna de filtración usando gel de sílice (1.75 kg) y un gradiente de acetato de etilo en hexanos 20-65%. Las fracciones del producto puro como se juzga por una CCD homogénea (Rf

22
79

0.55 en 1:1 hexanos-acetato de etilo) se combinaron y concentraron bajo presión reducida y secó (40°C, 0.2 mm Hg, 24 h) para proporcionar 145.5 g (76%) de **16** como un sólido de espuma blanca. Una fracción adicional (35 g) de ligeramente impuro **16** también se colectó. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm) 11.35 (s, 1H, NH), 7.66 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-6), 5.57 (d, 1H, J = 4.8 Hz, 2'-OH), 5.50-5.49 (m, 2H, 1'-H and H-5), 4.14-4.18 (m, 3H, 2', 3', 4'-H), 3.97-3.87 (m, 2H, 5'-Ha and Hb), 1.02-0.95 (m, 28H, CH(CH₃)₂).

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

A un matraz redondo de tres cuellos seco se agregaron DCM anhidro (600 mL) y DMSO (30.82 g, 394.5 mmol). La solución se enfrió hasta -78°C en un baño de hielo/acetona seco bajo una atmósfera de nitrógeno. El anhídrido trifluoroacético (puro, 77.7 g, 369.8 mmol) se agregó por medio de una jeringa durante 40 mins y proporciona una mezcla turbia. A la mezcla una solución del derivado de uridina **16** en DCM (600 mL) se agregó gota a gota durante 75 mins a -78°C por medio de un embudo de adición. La mezcla heterogénea se agitó durante 2 h a -78~-65°C y luego trietilamina anhidra (92 mL) se agregó por medio de una jeringa rápidamente para formar una solución amarilla ligera clara. Después de 1 h a temperatura baja, la reacción se completó como se muestra por CCD (EtOAc al 30% en hexanos). El baño de enfriamiento se removió y la mezcla de reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se apagó por la adición de NH₄Cl saturado (180 mL). Agua (200 mL) se agregó y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM (300 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (3x 400 mL), salmuera (150 mL), y secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del solvente proporciona un residuo café pegajoso.

El residuo de aceite crudo (contenido en trazas de DCM) se almacenó durante la noche en el congelado. Después de durante la

7,
80

noche, algo del sólido de cristal se observó en el aceite. El aceite se disolvió en 500 ml hexanos a temperatura ambiente. La solución se almacenó en el congelador durante 24 horas y más sólido se formó. El sólido se colectó por medio de filtración y enjuagó con DCM al 10% frío en hexanos (1 L) para remover la mayoría del color anaranjado. El sólido (**17**) se secó bajo vacío durante 2 h y luego se seco con aire durante 24 h. El sólido pesa 21 g después de secarse a 50°C bajo vacío. El filtrado se concentró y el residuo se purificó por medio de cromatografía de columna (acetato de etilo al 10-70% en hexanos) para proporcionar unos 37 g adicionales (rendimiento combinado de 97%) de **17** como un sólido anaranjado ligero.

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

El magnesio (3.53 g, 147 mmol), se lava con ácido clorhídrico acuoso al 5% y secó (50°C, 0.2mm Hg, 24 h), se colocó en un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con un agitador magnético y un condensador. El matraz se relleno con gas de argón y luego éter anhidro (80 mL) se agregó. Al magnesio en éter se agregó lentamente yoduro de perdeuterio-¹³C metilo (15.06 g, 110.3 mmol), el cual generó una reacción exotérmica. Después de que la mezcla de reacción se enfrió completamente, el sobrenadante se transfirió a una solución del compuesto seco **17** (50°C, 0.2 mm Hg, 15 h) (10.0 g, 20.63 mmol) en THF anhidro (1 L) a -50°C durante 20 min. La temperatura se permitió enjuagar hasta -40°C y la mezcla se agitó entre -40 hasta -25°C durante 4h. Durante la terminación de la reacción, la mezcla se diluyó con EtOAc (1L) a -50°C y luego salmuera (300 mL) se agregó lentamente. La capa orgánica se separó y luego lavó con solución de cloruro de amino saturado (300 mL x 2) y secó con sulfato de sodio. Después de la filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo se disolvió en MeOH (250 mL). El fluoruro de amonio (12 g) y TBAF (400 mg) se agregaron. La mezcla resultante se agitó a 90°C durante 7h y luego se concentró con gel de sílice (20 g)

27

bajo presión reducida. Después del secado al vacío cuidadoso, el residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice instantánea (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:20 hasta 1:10) da el compuesto **18** (5 g, 46%) como un sólido blanco. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm) 11.26 (s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-6), 5.77 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H-1'), 5.57 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-5), 5.46 (d, 1H, J = 5.2 Hz, HO-3'), 5.24 (d, 1H, J = 2.4 Hz, HO-2'), 5.14 (t, 1H, J = 5.6 Hz, HO-5'), 3.74-3.56 (m, 4H, H-3', 4', 5', 5'').

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

A una solución del compuesto **18** (5.00 g, 19.1 mmol) en piridina anhidra (100 mL) se agregó anhídrido acético (3 mL) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15h, diluyó con EtOAc (250 mL), lavó con agua (50 mL x 3), y secó con sulfato de sodio. Después de la filtración y concentración, el residuo se purificó por cromatografía de columna instantánea (MeOH 0 hasta 5% en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **19** (4.0 g, 68%) como un sólido gris.

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

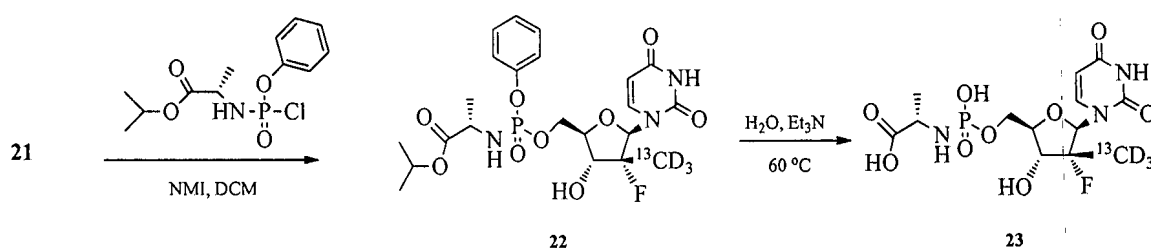
A una solución del compuesto **19** (2.33 g, 6.73 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (60 mL) se agregó DAST (1.33 mL, 10.1 mmol) a -78°C lentamente. La mezcla resultante se agitó durante 30 min después de exponerse a temperatura ambiente. Unas dos reacciones adicionales de escala 2.33 g y una reacción de escala 1.00 g se condujeron exactamente de la misma forma. Todas las cuatro mezclas de reacción se combinaron, diluyeron con CH₂Cl₂ (300 mL), y lavaron con agua con hielo (100 mL x 2) y luego solución NaHCO₃ de acuoso frío (100 mL x 2). Después del secado, filtración, y concentración, el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice instantánea (EtOAc 0% hasta 50% en hexanos, el

52
82

compuesto salió en alrededor de 48%) para dar el compuesto **20** (2.0 g, 24% de 7.99 g total del compuesto **19**) como un sólido blanco. ^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm) 8.27 (s, 1H, NH), 7.55 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-6), 6.17 (d, 1H, $J = 18.8$ Hz, H-1'), 5.78 (dd, 1H, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-5), 5.12 (dd, 1H, $J = 9.6, 21.6$ Hz, H-3'), 4.40-4.31 (m, 3H, H-4', 5', 5''), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.15 (s, 3H, CH_3).

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

A una solución del compuesto **20** (2 g, 5.74 mmol) en metanol (20 mL) se agregó n-butilamina (6 mL). La mezcla resultante se agitó a TA durante 15h y concentró con gel de sílice *in vacuo*. El residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice instantánea (MeOH 0 hasta 10% en CH_2Cl_2) para dar el compuesto **21** (1.3 g, 85%) como un sólido blanco. ^1H RMN (CD_3OD) δ (ppm) 8.08 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.13 (d, 1H, $J = 18.4$ Hz, H-1'), 5.70 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-5), 3.99 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, H-5'), 3.97-3.91 (m, 2H, H-3', 4'), 3.80 (dd, 1H, $J = 2.0, 12.8$ Hz, H-5''), ESEM (M+1) estimado 265, observado 265.



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

A una solución del nucleósido no protegido **21** (207 mg, 0.783 mmol) y N-metilimidazol (0.4 mL, 5 mmol) en THF (4 mL) se agregó el fosforocloridato pre-hecho en THF (1.0 M, 2.35 mL, 2.35 mmol) a 0°C gota a gota. La reacción lentamente se calentó hasta temperatura

ambiente durante 1 h y luego agua (1 mL) y EtOAc (5 mL) se agregaron. La solución orgánica se lavó con citrato de sodio mono básico acuoso saturado (2 x 2 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (1 x 2 mL), secó (MgSO₄) y concentró bajo presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía de columna de sílice usando ⁱPrOH al 0 hasta 5% en CH₂Cl₂ como eluyentes para dar el fosforamidato, **22** (216 mg, 52%, 1:1 mezcla de P-diaestereómeros) como un sólido blanco: ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.54 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.23-7.18 (m, 3 H), 6.14-5.96 (m, 2H), 5.89 (dd, *J* = 5.6, 25.6 Hz, 1H), 5.55 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.85 (dq, *J* = 1.6, 6.0 Hz, 1H), 4.44-4.32 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 4.06-3.98 (m, 1H), 3.86-3.70 (m, 2H), 1.30-1.08 (m, 9H); ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.90, 4.77; EMBR (ESI) [M + H]⁺ calculado para C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534.5, encontrado 534.4.

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

El fosforamidato **22** (147 mg, 0.276 mmol) se suspendió en trietilamina (2 mL) y agua (0.5 mL), y calentó a 60°C durante 30 h. Luego los componentes volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía de columna en sílice al eluir con ⁱPrOH al 50-70% en CH₂Cl₂ y luego, NH₄OH al 0 hasta 20% en ⁱPrOH para dar **23** como un sólido blanco (95 mg, 83%): ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 19.2 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.02-3.81 (m, 4H), 1.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12; EMBR (ESI) [M + H]⁺ calculado para C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₉P 416.3, encontrado 416.4.

Propiedades de las Muestras de R_p-4, 4, y S_p-4

Las muestras de R_p-4, 4, y S_p-4 se analizaron por Difracción en Polvo de Rayos X (XRPD, por sus siglas en inglés), Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN, por sus siglas en inglés), espectroscopia Infrarroja Transformada Fourier (FT-IR, por sus siglas

84
15

en inglés), Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC, por sus siglas en inglés), Análisis Gravimétrico Térmico (TGA, por sus siglas en inglés), Absorción de Vapor Gravimétrico (GVS, por sus siglas en inglés), Solubilidad Acuosa Termodinámica, y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

5

Ejemplo 20. Difracción en Polvo de Rayos X

Las muestras de R_p-4 , 4 , y S_p-4 se analizaron por Difracción en Polvo de Rayos X (XRPD) bajo el siguiente régimen.

a. Bruker AXS/Siemens D5000

10

Los patrones de Difracción en Polvo de Rayos X se colectaron en un difractómetro Siemens D5000 usando radiación $Cu\ K\alpha$ (40kV, 40mA), goniómetros $\theta-\theta$, divergencia de V20 y hendiduras de recepción, un monocromador secundario de grafito y un contador de escintilación. El instrumento es el desempeño verificado usando un estándar Corundum certificado (NIST 1976). El software usado para la colección de datos fue Diffrac Plus XRPD Commander v2.3.1 y los datos se analizaron y presentaron usando Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones Ambientales

15

Las muestras corridas bajo condiciones ambientales se prepararon como especímenes de plata plana usando polvo como se recibe. Aproximadamente 35 mg de la muestra se empaquetó suavemente en una cavidad cortada en obleas de silicio (510) de respaldo cero, pulidas. La muestra se giró en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la colección de datos son: intervalo angular: 2 hasta $42^\circ 2\theta$; tamaño de la etapa: $0.05^\circ 2\theta$; y tiempo de colección: 4 s.etapa^{-1} .

b. Bruker AXS C2 GADDS

20

Los patrones de Difracción en Polvo de Rayos X se colectaron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación $Cu\ K\alpha$ (40 kV, 40 mA), etapa XYZ automática, microscopio de video láser para el

posicionamiento de la auto-muestra y un detector de área dimensional HiStar 2. Los ópticos de rayos X consisten de un espejo de capa múltiple Göbel sencillo acoplado con un colimador de agujerito de 0.3 mm.

La divergencia del haz, esto es el tamaño efectivo del haz de rayos X en la muestra, fue aproximadamente 4 mm. Un modo de barrido continuo θ - θ se empleó con una distancia del detector de muestra de 20 cm la cual da un intervalo de 2θ efectivo de 3.2° - 29.7° . Típicamente la muestra deberá exponerse al haz de rayos X durante 120 segundos. El software usado para la colección de datos fue GADDS para WNT 4.1.16 y los datos se analizaron y presentaron usando Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones Ambientales

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

Difracción en Polvo de Rayos X (XRPD)

El **4** se encontró por XRPD para ser amorfo (ver **Fig. 1**). El análisis XRPD de alta resolución de **R_p-4** preparado de acuerdo con el Ejemplo 3 confirma un sólido cristalino que muestra un patrón en polvo diferente a aquel de **S_p-4** (preparado de acuerdo con el Ejemplo 4, Método 4), el cual también se confirmó para ser un sólido cristalino. La tabla de resultados XRPD para **R_p-4** y **S_p-4** se muestra en la **Tabla 1** con todos los picos que muestran una intensidad de $\leq 5\%$ (**R_p-4**) y $\leq 3\%$ (**S_p-4**) excluido.

Tabla 1. Datos XRPD para R_p-4 y S_p-4.

Datos XRPD para R _p -4		Datos XRPD para S _p -4 (Forma 1)	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
2-Teta °	%	2-Teta °	%

86

Datos XRPD para R_p-4		Datos XRPD para S_p-4 (Forma 1)	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
2-Teta °	%	2-Teta °	%
6.616	51.1	4.900	6.8
7.106	40.5	5.190	19.8
8.980	30.0	7.501	100.0
5 11.020	21.7	8.355	4.1
11.559	77.1	8.965	7.7
11.950	12.8	9.619	21.2
13.023	5.2	10.145	3.6
14.099	6.2	14.393	4.9
15.121	5.7	16.300	7.0
15.624	5.4	16.688	10.6
10 16.003	17.8	17.408	5.5
17.882	100.0	17.820	8.2
18.567	8.8	18.262	31.5
19.564	22.7	18.600	6.3
20.280	5.6	18.900	7.3
20.728	42.5	19.150	6.1
21.047	19.9	19.696	4.8
21.671	22.0	20.398	4.4
21.943	23.3	20.710	6.9
22.214	18.9	21.950	6.1
23.074	28.5	22.175	12.2
24.145	30.3	22.511	5.6
24.355	39.1	22.924	3.1
25.366	7.6	23.360	6.5
26.146	36.2	23.538	7.1
27.000	9.0	23.910	7.4
27.313	15.6	24.873	3.7
27.677	22.7	25.123	4.9
15 28.219	12.8	25.649	4.2
28.661	6.2	26.748	5.2
29.450	6.8	27.339	3.7
29.735	9.4	27.646	3.5
31.372	8.2	28.066	3.1
31.967	10.9	29.050	3.0
32.295	6.4	29.541	3.6
20 33.001	11.4	30.178	3.8
33.774	11.8	31.648	3.1

5
87

Datos XRPD para R _P -4		Datos XRPD para S _P -4 (Forma 1)	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
2-Teta °	%	2-Teta °	%
34.385	6.6	32.721	3.5
34.734	6.5	33.154	3.0
35.600	7.3	33.923	3.5
35.965	13.1	34.341	3.1
36.409	14.7	35.465	3.5
36.880	7.0	36.923	3.1
37.509	5.9	37.760	3.4
37.870	6.0	38.404	3.3
38.313	5.8	40.416	3.1
38.943	8.4		
40.093	6.6		
40.511	7.8		
41.429	6.5		

Una muestra de S_P-4 se molió con un mortero, y luego posteriormente pasa a través de tamices de 500 y 250 µm para proporcionar la muestra como un polvo fino. Esta muestra se volvió a analizar por XRPD de alta resolución, confirmando que el cambio de la forma no ha ocurrido.

Ejemplo 21. Estudios de Cristalización para S_P-4.

S_P-4 cristalino muestra polimorfismo. De esta manera, un aspecto se dirige a S_P-4 cristalino y sus formas polimórficas individuales. S_P-4 puede existir en al menos cinco forma polimórficas, designadas como Formas 1-5. Además, S_P-4 amorfo también puede prepararse. Una cristalización típica se proporciona para disolver alrededor de 100 mg de S_P-4 en un volumen apropiado del solvente de cristalización (acetonitrilo (5 vol), cloroformo (5 vol), acetato de n-butilo (7 vol), diclorometano (50 vol), anisol (7 vol), y 1:1 MTBE/heptano (50 vol)) y luego se permite para la evaporación de la solución a 5°C. Varias formas cristalinas se obtuvieron, pero cada forma, durante la filtración y/o secado, proporcionan la Forma 1.

Las formas 1, 2 y 3 son una forma no solvatada, 1:1 solvente DCM

25

y 1:1 solvato de cloroformo, respectivamente, como se confirmó por análisis XRPD y de rayos X de cristal sencillo. Las formas 4 y 5 se obtuvieron de la cristalización de S_p -4 de soluciones de acetonitrilo y anisol, respectivamente. Los datos suficientes no pueden colectarse para determinar si las Formas 4 y 5 están no solvatadas, hidratadas o solvatadas ya que los cristales sencillos de calidad suficiente no se obtuvieron. Las formas 4 y 5 se transforman para formar 1 en la filtración. Dos formas cristalinas adicionales se obtienen durante cristalización de S_p -4 del acetato de n-butilo (^{n} BuAc) y una solución que contiene éter de metil- ^{t} butilo (MTBE) y heptano; durante la filtración ambas de estas formas cristalinas se convierten para formar 1. Las formas 2 y 3 también se transforman para formar 1 en aislamiento. La forma 1 es una forma no solvatada que muestra una endotermia de fusión amplia con una temperatura de inicio de 94.3°C y ΔH_{fus} de 24.0 kJ mol^{-1} . Un patrón XRPD adicional de S_p -4 Forma 1 se describe en la **Figura 4**.

Ejemplo 21-1. S_p -4 Forma 1

Un listado pico de S_p -4 Forma 1 se presenta en la **Tabla 2**.

Ángulo 2-Teta °	% de intensidad %
5.0	74.8
7.3	100.0
7.8	2.2
8.2	6.8
8.8	9.3
9.4	23.5
10.0	8.4
11.4	4.2
13.3	3.0
14.2	6.1
14.9	3.5
16.1	7.9
16.6	13.2
17.3	15.4
17.7	10.1

20/8

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
18.1	42.6
18.4	7.6
18.7	11.4
18.9	5.7
19.3	5.0
19.6	2.9
20.2	8.5
20.5	11.5
20.8	3.6
21.8	7.2
22.0	14.5
22.4	9.6
23.2	5.3
23.4	5.8
23.5	4.6
23.8	7.4
24.0	3.1
24.7	2.5
25.0	13.0
25.5	3.1
26.6	4.5
27.2	3.2
27.5	2.2
28.1	2.9
30.0	3.2

Ejemplo 21-2. S_p -4 Forma 2

Un patrón XRPD de S_p -4 Forma 2 se describe en la **Figura 5**.

Un listado pico de S_p -4 Forma 2 se presenta en la **Tabla 3**.

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
4.9	44.1
5.1	19.1
6.9	62.1
8.7	6.8
9.8	28.6

8/90

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
10.1	10.4
13.7	7.0
16.7	3.1
19.5	8.9
19.8	45.5
20.1	18.6
20.4	3.6
20.6	25.6
20.9	15.9
21.1	10.9
22.1	3.4
24.6	38.7
24.7	100.0
25.1	61.2
26.1	53.3
39.0	6.3

Ejemplo 21-3. *S_p*-4 Forma 3

Un patrón XRPD de *S_p*-4 Forma 3 se describe en la **Figura 6**.

Un listado pico de *S_p*-4 Forma 3 se presenta en la **Tabla 4**.

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
5.0	10.0
6.9	23.3
9.8	22.6
19.7	34.8
20.6	100.0
21.8	10.5
24.6	65.3
34.7	4.1

Ejemplo 21-4. *S_p*-5 Forma 4

Un patrón XRPD de *S_p*-4 Forma 4 se describe en la **Figura 7**.

Un listado pico de *S_p*-4 Forma 4 se presenta en la **Tabla 5**.

52
91

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
5.0	29.8
6.8	100.0
8.2	4.8
8.7	5.2
9.9	3.8
13.7	1.7
14.9	4.8
19.9	22.5
20.4	2.1
20.6	20.0
20.9	20.0
24.7	3.4
24.9	29.9
25.1	1.5
36.8	3.1

Ejemplo 21-5. S_p -4 Forma 5

Un patrón XRPD de S_p -4 Forma 5 se describe en la **Figura 8**.

Un listado pico de S_p -4 Forma 5 se presenta en la **Tabla 6**.

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
5.2	52.9
6.6	100.0
7.1	25.9
9.7	12.1
10.4	16.4
13.4	11.4
15.7	25.8
19.1	31.1
19.9	12.9
20.0	9.0
21.3	3.5
25.0	22.3
25.6	2.3
26.3	5.9

53
92

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
26.9	2.0
31.7	2.1

Ejemplo 21-6. S_p -4 (Amorfo)

5

Un patrón XRPD para S_p -4 amorfo se describe en la **Figura 9**.

Ejemplo 22. Cristalografía de rayos X de Cristal Sencillo de S_p -4 y sus solvatos

10 Ejemplo 22-1. Cristalografía de Rayos X de Cristal Sencillo de S_p -4 (Forma 1)

La figura 10 muestra una estructura de cristal de rayos X para S_p -4 Forma 1. Allí, la figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 1 de la estructura de cristal que muestra el esquema de numeración empleado. Los elipsoides de desplazamiento atómicos anisotrópicos para los átomos sin hidrógeno se muestran en el 50% de nivel de probabilidad. Los átomos de hidrógeno se muestran con un radio arbitrariamente pequeño.

La solución de estructura se obtuvo por métodos directos, refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con peso $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0592P)^2 + (0.6950P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópicos, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\Sigma[w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \Sigma[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.0871$ para todos los
 15 datos, R_1 convencional = 0.0329 en valores F de 7090 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1.016$ para todos los datos y 870 parámetros. Δ/σ final(max) 0.001, Δ/σ (medio), 0.000. Mapa de diferencia final entre +0.534 y -0.36 e $\text{\AA}^{-3}$.

20

11/1/93

Tabla 7. Parámetros de Cristal Sencillo de la Forma 1

Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Peso molecular	529.45				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo de espacio	P2 ₁	a	20.0898(5)Å,	A	90°,
		b	6.10290(10)Å,	B	112.290(3)°,
		c	23.0138(6)Å,	γ	90°
V	2610.79(10)Å ³				
Z	4				
D _c	1.347g.cm ⁻¹				
μ	1.475mm ⁻¹				
Fuente, λ	Cu Kα, 1.54178Å				
F(000)	1112				
T	100(1)K				
Cristal	Placa sin color, 0.12 x 0.09 x 0.03mm				
Datos truncados para	0.80 Å				
θ _{max}	74.48°				
Totalidad	99.4%				
Reflexiones	14854				
Reflexiones únicas	7513				
R _{int}	0.0217				

Ejemplo 22-2. Cristalografía de Rayos X de Cristal Sencillo de S_p-4 (Forma 2)

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

La solución de estructura se obtuvo por métodos directos,

25
24

refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con peso $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0975P)^2 + (10.6969P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópicos, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\Sigma[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\Sigma[w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0.1883$ para todos los
5 datos, R_1 convencional = 0.0741 en valores F de 2525 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1.05$ para todos los datos y 158 parámetros. Δ/σ final (max) 0.000, Δ/σ (medio), 0.000. Mapa de diferencia final entre +1.388 y -0.967 e $\text{\AA}^{-3}$.

10

Tabla 8. Parámetros de Cristal Sencillo de la Forma 2

Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ FN ₃ O ₉ P				
Peso molecular	614.38				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo de espacio	P2 ₁	a	12.8315(3) Å,	A	90°,
		b	6.14530(10) Å,	B	91.752(2) °,
		c	17.6250(4) Å,	γ	90°
V	1389.14(5) Å ³				
Z	2				
D _c	1.469 g.cm ⁻¹				
μ	3.196 mm ⁻¹				
Fuente, λ	Cu-K, 1.54178 Å				
F(000)	640				
T	293(2) K				
Datos truncados para	0.80 Å				
θ _{max}	62.23°				
Totalidad	91.1%				
Reflexiones	3528				
Reflexiones únicas	2562				
R _{int}	0.0227				

15

20

Ejemplo 22-3. Cristalografía de Rayos X de Cristal Sencillo de S_P-4

2/9/95

(Forma 2)

La figura 12 describe una Estructura de Cristal de Rayos X (ORTEP - anisotrópico) S_p-4 (Forma 2). Una estructura de cristal del solvato de cloruro de metileno de S_p-4 (Forma 2), $C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$, proporciona un grupo de espacio monoclinico $P2_1$ (ausencias sistemáticas $0k0$: $k=\text{odd}$)

5 con $a=12.8822(14)$ Å, $b=6.1690(7)$ Å, $c=17.733(2)$ Å, $\beta=92.045(3)^\circ$, $V=1408.4(3)\text{Å}^3$, $Z=2$ y $d_{\text{calc}}=1.449$ g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se colectaron en un detector de área Rigaku Mercury CCD empleando radiación Mo- K_α monocromada de grafito ($\lambda=0.71073$ Å) a una temperatura de 143K. La indexación preliminar se realizó de una serie

10 de doce imágenes de rotación a 0.5° con exposiciones de 30 segundos. Un total de 648 imágenes de rotación se colectaron con un cristal para detectar la distancia de 35 mm, un ángulo 2θ balanceo de $\pm 12^\circ$, anchuras de rotación de 0.5° y exposiciones de 30 segundos: barrido no. 1 fue un ϕ -barrido de 315° hasta 525° a $\omega=10^\circ$ y $\chi=20^\circ$; barrido no. 2 fue un ω -barrido de -20° hasta 5° a $\chi=-90^\circ$ y $\phi=315^\circ$; barrido no. 3 fue un ω -barrido desde -20° hasta 4° a $\chi=-90^\circ$ y $\phi=135^\circ$; barrido no. 4 fue un ω -barrido desde -20° hasta 5° a $\chi=-90^\circ$ y $\phi=225^\circ$; barrido no. 5 fue un ω -barrido desde -20° hasta 20° a $\chi=-90^\circ$ y $\phi=45^\circ$. Las imágenes de rotación se procesaron usando CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), que produce un listado de valores F^2 y $\sigma(F^2)$ no promediados los cuales luego se pasaron a la CrystalStructure (CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigaku/MSD (2002)) paquete de programa para el procesamiento adicional

15 y solución de estructura en una computadora Dell Pentium III. Un total de 7707 reflexiones se midieron sobre los rangos $5.48 \leq 2\theta \leq 50.04^\circ$, $-14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$ proporcionando 4253 reflexiones únicas ($R_{\text{int}} = 0.0180$). Los datos de intensidad se corrigieron para efectos Lorentz y de polarización y para absorción usando REQAB (transmisión mínima y máxima 0.824, 1.000).

20 La estructura se resolvió por métodos directos (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A.

OK
96

Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). *J. Appl. Cryst.*, **32**, 115-119). El refinamiento fue por mínimos cuadrados de matriz completa con base en F^2 usando SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.*, **A64**, 112-122). Todas las reflexiones se usaron durante el refinamiento. El esquema de peso usado fue $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + 0.0472P^2 + 0.4960P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los átomos sin hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de "soporte". El refinamiento converge a $R_1=0.0328$ y $wR_2=0.0817$ para 4046 reflexiones para las cuales $F > 4\sigma(F)$ y $R_1=0.0348$, $wR_2=0.0838$ y $GOF = 1.056$ para todas las 4253 reflexiones sin cero, únicas y 358 variables ($R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR_2 = \{ \sum w (F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2 \}^{1/2}$; $GOF = \{ \sum w (F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p) \}^{1/2}$; donde n = el número de reflexiones y p = el número de parámetros refinado). El Δ/σ máximo en el ciclo final de cuadrados mínimos fue 0.000 y los dos picos más prominentes en el diferencia final Fourier fueron +0.312 y -0.389 e/Å³. El parámetro de estructura absoluto Flack refinado para -0.06(6) así corrobora la estereoquímica del compuesto del título.

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

Tabla 9. Resumen de la Determinación de Estructura del Compuesto S_p -4·CH₂Cl₂.

Fórmula:	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ PO ₉ FCl ₂
Peso de la Fórmula:	614.38
Clase de cristal:	Monoclínico
Grupo de espacio:	P2 ₁ (#4)
Z	2
Constantes celulares:	

Ex
97

	a	12.8822(14) Å
	b	6.1690(7) Å
	c	17.733(2) Å
	β	92.045(3) °
	V	1408.4(3) Å ³
	μ	3.48 cm ⁻¹
5	Tamaño del cristal, mm	0.42 x 0.12 x 0.10
	D _{calc}	1.449 g/cm ³
	F(000)	640
	Radiación:	Mo-K α ($\lambda=0.71073$ Å)
	Intervalo 2 θ	5.48 - 50.04 °
	hkl colectado:	-14 $\leq$ h $\leq$ 15; -7 $\leq$ k $\leq$ 6; -19 $\leq$ l $\leq$
10		21
	No. de reflexiones medidas:	7707
	No. de reflexiones únicas:	4253 (R _{int} =0.0180)
	No. de reflexiones observadas	4046 (F>4 σ)
	No. de reflexiones usadas en el refinamiento	4253
	No. parámetros	358
	R índices (F>4 σ)	R ₁ =0.0328 wR ₂ =0.0817
	R índices (todos los datos)	R ₁ =0.0348 wR ₂ =0.0838
	GOF:	1.056
	Picos de diferencia Final, e/Å ³	+0.312, -0.389

Ejemplo 22-4. Cristalografía de Rayos X de Cristal Sencillo de S_p-4 (Forma 3)

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

La solución de estructura se obtuvo por métodos directos, refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con peso w^{-1}

= $\sigma^2(F_o^2) + (0.0512P)^2 + (0.6810P)$, donde $P = (F_o^2+2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópicos, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\Sigma[w(F_o^2-F_c^2)^2]/\Sigma[w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0.0796$ para todos los datos, R_1 convencional = 0.0294 en valores F de 2486 reflexiones con F_o
 5 > $4\sigma(F_o)$, $S = 1.068$ para todos los datos y 377 parámetros. Δ/σ final (max) 0.001, Δ/σ (media), 0.000. Mapa de diferencia final entre +0.211 y -0.334 e $\text{\AA}^{-3}$.

Tabla 10. Parámetros de Cristal Sencillo de la Forma 3

Fórmula molecular	$C_{23}H_{30}Cl_3F_1N_3O_9P_1$				
Peso molecular	648.82				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo de espacio	$P21$	a	$12.9257(4)\text{\AA}$,	α	90° ,
		b	$6.18080(10)\text{\AA}$,	β	$96.399(2)^\circ$,
		c	$18.0134(4)\text{\AA}$,	γ	90°
V	$1430.15(6)\text{\AA}^3$				
Z	2				
D_c	1.507g.cm^{-1}				
μ	3.977mm^{-1}				
Fuente, λ	Cu $K\alpha$, $1.54178\text{\AA}$				
$F(000)$	672				
T	$100(1)\text{K}$				
Cristal	Aguja incolora, $0.22 \times 0.03 \times 0.02\text{mm}$				
Datos truncados para	$0.80\text{\AA}$				
θ_{max}	74.41°				
Totalidades	69.1%				
Reflexiones	3062				
Reflexiones únicas	2607				
R_{int}	0.0198				

Ejemplo 23. Estabilidad a temperaturas elevadas y humedad relativa

Una muestra de R_p -4 se almacenó en una cámara de humedad a 40°C y 75% de humedad relativa durante una semana, y la muestra se volvió a analizar por XRPD. El patrón en polvo obtenido por R_p -4 no muestra cambio sustancial durante el curso del experimento, significando que

606
94

ningún cambio en la forma sólida se observó. Esto deberá contrastarse a una muestra de 4, la cual se convierte en líquido dentro de alrededor de 16 horas durante el almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa. Efectivamente, una ilustración de la naturaleza de la conversión en líquido de 4 se ilustra por lo siguiente. Una muestra de 4 se pasó a través de un tamiz 250 µm luego las muestras se almacenaron a 40°C / RH al 75% y 25°C / 53% de humedad relativa y las observaciones visuales se descongelaron a intervalos regulares. Los resultados se dan en la **Tabla 4.**

Tabla 11. Estabilidad de 4 para humedad relativa elevada.

Condiciones	t = 1.5 h	t = 4.5 h	t = 6.5 h	t = 8.5 h	t = 73 h
40°C/75%RH	Conversión en líquido	-	-	-	-
25°C/53%RH	Sin conversión en líquido	Sólido pegajoso	Conversión en líquido parcial	Casi conversión en líquido parcial	Conversión en líquido

Durante el almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa una muestra de S_p-4 se convierte en líquido dentro de 16 horas. Por ejemplo, una muestra de S_p-4 se molió con un mortero, y luego sucesivamente se pasó a través de tamices de 500 y 250 µm para proporcionar la muestra como un polvo fino. Las muestras de este material se almacenaron a 40°C y 75% de humedad relativa y 25°C y 53% de RH y las observaciones visuales se descongelaron a intervalos regulares. Los resultados se dan en la **Tabla 5.**

Tabla 12. Estabilidad de S_p-4 para humedad relativa elevada.

Condiciones	t = 1.5 h	t = 4.5 h	t = 104 h
40°C/75% RH	Sin conversión en líquido	Conversión en líquido	en -
25°C/53% RH	Sin conversión	Sin conversión	en Sin

10,
700!

en líquido

líquido

conversión en
líquido

El análisis XRPD de la muestra después del almacenamiento a 25°C y 53% de RH durante 104 horas no muestra cambios importantes en los difractogramas producidos que indican que no ha ocurrido cambio en la forma.

Ejemplo 24. Espectrometría de Transformación Fourier -Infrarrojo (FT-IR, por sus siglas en inglés)

Los datos se colectaron en un Perkin-Elmer Spectrum One fijado con un accesorio de muestra de Reflectancia Total Atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) universal. Los datos se colectaron y analizaron usando software Spectrum v5.0.1.

El espectro IR obtenido para **4**, **R_p-4**, y **S_p-4** se muestran en las Figs. 5-7, respectivamente. Los picos seleccionados, en números de onda (cm⁻¹) se recitan a continuación:

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

R_p-4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (Fig. 15); y

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

Ejemplo 25. Análisis Termo-Gravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) de Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC, por sus siglas en inglés)

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

La temperatura modulada DSC se llevo a cabo en típicamente 0.8-1.2 mg de cada muestra, en un refractario de aluminio agujerado con un alfiler, usando una velocidad de calentamiento fundamental de 2°C.min⁻¹ y parámetros de modulación de temperatura de ± 0.2 °C.min⁻¹ y 40 segundos. Una purga de nitrógeno seco a 50 ml.min⁻¹ se mantuvo sobre

102
101

la muestra.

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

5 Los datos DSC se colectaron en un Mettler DSC 823e equipado con un auto-muestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para energía y temperatura usando indio certificado. Típicamente 0.8-1.2 mg de cada muestra, en un refractario de aluminio agujerado con un alfiler, se calentó a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ desde 25°C hasta 250°C . Una purga de nitrógeno a $50\text{ ml}.\text{min}^{-1}$ se mantuvo sobre la muestra. El software de análisis de datos y control del instrumento fue STARe v9.20.

10 Los datos TGA se colectaron en un Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un auto-muestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró con temperatura usando indio certificado. Típicamente 8-12 mg de cada muestra se cargó en un crisol de aluminio pre-pesado y se calentó a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ desde temperatura ambiente hasta 350°C . Una purga de nitrógeno a $50\text{ ml}.\text{min}^{-1}$ se mantuvo sobre la muestra. El software de análisis de datos y control del instrumento fue STARe v9.20.

El análisis DSC de **4** muestra una endotermia amplia sencilla con un comienzo de 58.7°C (ΔH $14\text{ J}.\text{g}^{-1}$) confirmada para ser debido a la relajación molecular durante la transición del vidrio por análisis DSC modulado adicional (Fig. 17). El análisis TGA de **4** no muestra pérdida de peso antes de la descomposición arriba de 240°C , confirmando que el material no puede solvatarse. Como el análisis XRPD de **4** confirma el material para ser amorfo, el análisis DSC modulado se asumió en un intento para calcular la temperatura de transición de vidrio, la cual se encontró para ser 57°C .

15 El análisis DSC muestra una endotermia de forma sencilla con un comienzo de 136.2°C (ΔH $76\text{ J}.\text{g}^{-1}$) confirmado para ser una fusión por microscopia de etapa caliente. Ver Fig. 18. El análisis TGA de **R_p-4** no muestra pérdida de peso antes de la descomposición arriba de 240°C , confirmando que el material no se ha solvatado.

20 El análisis DSC de **S_p-4** muestra una endotermia amplia sencilla con

un comienzo de 93.9°C (ΔH 43 J.g⁻¹) confirmado para una fusión por microscopia de etapa caliente. Ver Fig. 19. El análisis TGA de S_p-4 no muestra pérdida de peso antes de la descomposición arriba de 240°C, confirmando que el material no se ha solvatado.

5 **Ejemplo 26. Absorción del Vapor Gravimétrico (GVS)**

SMS DVS Intrínseco

10

Las isotermias de absorción se obtuvieron usando un analizador de absorción de humedad SMS DVS Intrínseco, controlado por el software SMS Analysis Suite. La temperatura de muestra se mantuvo a 25°C por los controles del instrumento. La humedad se controló al mezclar corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con una velocidad de flujo total de 200 ml.min⁻¹. La humedad relativa se midió por una sonda Rotrónica calibrada (intervalo dinámico de 1.0-100% RH), ubicada cerca de la muestra. El cambio en peso, (relajación de masa) de la muestra como una función de %RH se monitoreó constantemente por el microbalance (exactitud ±0.005 mg).

Típicamente 5-20 mg de muestra se colocó en una canasta de acero inoxidable de malla de alquitrán bajo condiciones de ambiente. La muestra se cargo y descargó a 40% RH y 25°C (condiciones del ambiente típicas). Una isoterma de absorción de humedad se realizó como se resume a continuación (2 barridos dan 1 ciclo completo). La isoterma estándar se realizó a 25°C a intervalos RH al 10% sobre un intervalo de RH al 0.5-90%.

15

Tabla 13. Parámetros del Método para Experimentos SMS DVS Intrínsecos

20

Parámetros	Valores
Adsorción - Barrido 1	40 - 90
Desorción / Adsorción - Barrido 2	90 - 0, 0 - 40
Intervalos (%RH)	10
Número de barridos	2
Velocidad de flujo (ml.min ⁻¹)	200
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C.min ⁻¹)	0.2

102/103

Tiempo de absorción (horas)	6 hora de tiempo fuera
-----------------------------	------------------------

La muestra se recuperó después de la terminación de la isotermita y se volvió a analizar por XRPD.

El análisis GVS muestra R_p-4 para no ser higroscópico, que muestra la absorción reversible de aproximadamente 0.2% en peso de agua desde 0 hasta 90% de humedad relativa. El re-análisis de la muestra por XRPD después del experimento GVS no muestra cambio en la forma.

Una muestra de S_p-4 se molió con un mortero, y luego se pasó sucesivamente a través de tamices de 500 y 250 μm para proporcionar la muestra como un polvo fino que luego se analizó usando un método de ciclo sencillo modificado. La muestra se tomó desde RH al 40% (aproximadamente ambiente) hasta RH al 60%, en lugar de 90% para el método estándar, y luego se colocó en ciclo hasta 0% y regreso hasta RH al 40%. Este análisis muestra S_p-4 para no ser higroscópico hasta RH al 60%, con absorción reversible de ~0.2% en peso de agua desde 0 hasta 60% de RH.

Ejemplo 27. Estabilidad Acuosa Termodinámica

La solubilidad acuosa se determinó al suspender una cantidad suficiente de compuesto en agua para dar una concentración final máxima de $\geq 10 \text{ mg.ml}^{-1}$ de la forma libre precursora del compuesto. La suspensión se equilibró a 25°C durante 24 horas luego el pH se midió. La suspensión luego se filtró a través de un filtro C de fibra de vidrio en una placa de 96 pozos. El filtrado luego se diluyó por un factor de 101. La cuantificación fue por HPLC con referencia a una solución estándar de aproximadamente 0.1 mg.ml^{-1} en DMSO. Los volúmenes diferentes de las soluciones de muestra estándar, diluida y no diluida se inyectaron. La solubilidad se calculó usando las áreas de pico determinadas por integración del pico encontrado en el mismo tiempo de retención como el pico principal en la inyección estándar.

Tabla 14. Parámetros del Método HPLC para las Mediciones de

103
104

Solubilidad

5	Tipo de método:	Fase inversa con gradiente de elución		
	Columna:	Phenomenex Luna, C18 (2) 5µm 50 x 4.6 mm		
	Temperatura de la Columna (°C):	25		
	Inyecciones estándar (µl):	1, 2, 3, 5, 7, 10		
	Inyecciones de prueba (µl):	1, 2, 3, 10, 20, 50		
10	Detección: longitud de onda, amplitud de banda (nm):	260,80		
	Velocidad de flujo (ml.min ⁻¹):	2		
	Fase A:	TFA al 0.1% en agua		
	Fase B:	TFA al 0.085% en acetonitrilo		
	Tabla de tiempo:	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
		0.0	95	5
		1.0	80	20
		2.3	5	95
		3.3	5	95
		3.5	95	5
		4.4	95	5

El análisis se realizó bajo las condiciones anotadas arriba en un sistema en serie Agilent HP1100 equipado con un detector de configuración de diodo y usando software ChemStation vB.02.01-SR1.

15 **Tabla 15. Resultado de solubilidad acuosa para R_p-4, 4, y S_p-4.**

Muestra ID	pH de mezcla no filtrada	Solubilidad/ mg.ml ⁻¹	Comentarios
R _p -4	7.12	1.58	Suspensión
4	7.03	6.11	Sólido residual
S _p -4	6.88	5.65	Sólido residual

20

Ejemplo 28. Determinación de Pureza Química por HPLC

Varias condiciones HPLC pueden usarse para determinar la pureza

104
105

química de los compuestos descritos en la presente. Tal ejemplo se describe arriba en relación a los estudios de solubilidad acuosa termodinámica. Otro ejemplo se describe a continuación.

Condiciones HPLC:

5 **CL:** Módulo de Separaciones Waters Alliance 2695, detector Waters 2996 PDA y Software Waters Empower 2 (Versión 6.00)

Columna: Phenomenex Luna C18(2); 4.6 x 50mm; 3µm

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min

Volumen de inyección: 10µL

10 **Fase móvil:** Solvente A: agua al 95% con Metanol al 5% y acetato de amonio 10mM; pH~5.3

Solvente B: MeOH con acetato de amonio 10mM

Gradiente: mantenido a 0% B 3 min

0- B 3-4 min

mantenido a 47% B 4-10 min

47%-74% B 10-11min

mantenido a 74% B 11-13.5min

volviendo a 0% B 13.5-13.6 min

mantenido a 0% B 13.6-15.5 min

Bajo estas condiciones, la pureza de **4**, **R_p-4**, y **S_p-4** se determinó para ser ~99.6, ~99%, y ~99.5%, respectivamente. Se nota que las purzas superiores pueden realizarse al optimizar los métodos descritos arriba.

15 La inspección de los difractogramas XRPD muestra que los dos diaestereoisómeros sencillos cristalinos dan claramente patrones XRPD diferentes. Adicionalmente, existió una diferencia clara en el punto de fusión de los dos diaestereoisómeros cristalinos, con **R_p-4** que tienen un comienzo considerablemente superior que **S_p-4** (136°C contra 20 94°C).

Ejemplo 29. Métodos de Separación Adicionales

La siguiente separación SFC (condiciones enlistadas a continuación) proporciona separación adecuada de una mezcla de los diaestereómeros, *R_p*-4 y *S_p*-4.

5	Métodos Preparativo:	Métodos analítico:
	Chiralpak AS-H (2 x 25 cm) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25 x 0.46cm)
	Metanol al 20%/CO ₂ (100 bar)	Metanol al 20%/CO ₂ (100 bar)
	50 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
10	Conc.: 260mg/30ml metanol, vol. Iny.: 1.5ml	

La siguiente separación SFC (condiciones enlistadas a continuación) proporciona separación adecuada de una mezcla de los diaestereómeros, *R_p*-4 y *S_p*-4.

Métodos preparativo:	Método analítico:
Chiralpak IA(2 x 15 cm) 802091	Chiralpak IA(15 x 0.46 cm)
Isopropanol al 30% (DEA al 0.1%)/CO ₂ , 100 bar	Metanol al 40% (DEA)/CO ₂ , 100 bar
60 mL/min, 220 nm.	3 mL/min, 220 nm.
vol. iny.: 2 mL, 20 mg/mL de metanol	

Tabla 16. Resumen de los resultados de la caracterización del lote de *R_p*-4, 4, y *S_p*-4.

15	Análisis	<i>R_p</i> -4	4	<i>S_p</i> -4
	RMN de protones	Diaestereoisómero sencillo	Mezcla 1:1 de diaestereoisómeros	Diaestereoisómero sencillo
	XRPD	Cristalino-diferente de <i>S_p</i> -4	Amorfo	Cristalino-diferente de <i>R_p</i> -4
20	DSC	Endotermia; fusión -136°C	Endotermia; 59°C	Endotermia; fusión -94°C
	TGA	Sin pérdida de peso,	Sin pérdida de peso,	Sin pérdida de peso,

102
107

		descomposición	descomposición	descomposición
		>240°C	>240°C	>240°C
IR		Ver arriba	Ver arriba	Ver arriba
Solubilidad				
acuosa		1.58	6.11	5.65
(mg.ml ⁻¹)				
5	Pureza HPLC	96.9 %	99.6 %	99.5 %
	40°C/RH al	Sin cambio de la	Conversión en	Conversión en
	75%	forma	líquido dentro de	líquido dentro de
			1.5 h	4.5 h
	25°C / 53 %	-	Conversión	en Sin cambio de la
	RH		líquido	forma
	GVS	No higroscópico	-	No higroscópico
10		hasta RH al 90%		hasta RH al 60%

Ejemplo 30. Cristalografía de Rayos X de 8 (isómero S_P)

El compuesto **8** (isómero S_P), C₁₈H₂₁N₂PO₇, se cristaliza en el grupo de espacio monociclico P2₁ (ausencia sistemáticas 0k0: k=odd) con a=5.3312(4)Å, b=15.3388(8)Å, c=23.7807(13)Å, β=92.891(3)°, V=1942.2(2)Å³, Z=4, y d_{calc}=1.397 g/cm³. Los datos de la intensidad de rayos X se colectaron en un detector de área Bruker APEXII CCD que emplea radiación Mo-Kα monocromatada de grafito (λ=0.71073 Å) a una temperatura de 100(1)K. Las figuras 20A y 20B muestran moléculas enumeradas 1 y 2, respectivamente, de la unidad asimétrica.

La indexación preliminar se realizó de una serie de treinta y seis cuadros de rotación a 0.5° con exposiciones de 30 segundos. Un total de 3608 estructuras se colectaron con un cristal para detectar la distancia de 70.00 mm, amplitudes de rotación de 0.5° y exposiciones de 20 segundos:

Tipo de barrido	2θ	ω	φ	X	estructuras
φ	-35.50	279.40	27.32	48.96	725
φ	24.50	22.31	35.56	69.08	692
ω	-13.00	321.68	247.79	69.08	95
φ	34.50	204.08	28.21	-92.80	293
φ	-30.50	310.60	214.10	54.21	361
φ	32.00	304.67	24.47	50.72	722
φ	-35.50	122.14	316.59	-78.84	720

109
108

Las estructuras de rotación se integraron usando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EUA.) produciendo un listado de valores F_2 y $\sigma(F_2)$ no promediados los cuales luego se pasaron al paquete de programa SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EUA.) para procesamiento adicional y solución de estructura en una computadora Dell Pentium 4. Un total de 6909 reflexiones se midieron sobre los intervalos $1.58 \leq \theta \leq 25.09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$ proporcionando 6909 reflexiones únicas ($R_{int} = 0.0581$). Los datos de intensidad se corrigieron para efectos Lorentz y de polarización y para absorción usando SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Alemania.) (transmisión mínima y máxima 0.6093, 0.7452).

La estructura se resolvió por métodos directos (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64,112-122.)). El refinamiento fue por mínimos cuadrados de matriz completa con base en F_2 usando SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64, 112-122.)). Todas las reflexiones se usaron durante el refinamiento. El esquema de peso usado fue $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0000P)^2 + 14.0738P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los átomos sin hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de soporte. El refinamiento converge para $R_1 = 0.0847$ y $wR_2 = 0.1899$ para 6173 reflexiones observadas para los cuales $F > 4\sigma(F)$ y $R_1=0.0963$ y $wR_2=0.1963$ y $GOF = 1.119$ para todas las 6909 reflexiones sin cero, únicas y 512 variables ($R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR_2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2}$; donde n = el número de reflexiones y p = el número de parámetros refinados). El Δ/σ máximo en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0.000 y los dos picos más prominentes en la diferencia final Fourier fueron +0.402 y -0.559 e/Å³.

Tabla 17. Resumen de la Determinación de la Estructura del Compuesto 8 (isómero S_p)

Fórmula empírica	$C_{18}H_{21}N_2PO_7$
------------------	-----------------------

110
109

	Peso de la fórmula	408.34
	Temperatura	100(1) K
	Longitud de onda	0.71073 Å
	Sistema de cristal	Monoclínico
	Grupo de espacio	P2 ₁
	Constantes celulares:	
5	a	5.3312(4) Å
	b	15.3388(8) Å
	c	23.7807(13) Å
	β	92.891(3)°
	Volumen	1942.2(2) Å ³
	Z	4
10	Densidad (calculada)	1.397 Mg/m ³
	Coeficiente de absorción	0.185 mm ⁻¹
	F(000)	856
	Tamaño de cristal	0.40 x 0.10 x 0.08 mm ³
	Intervalo teta para la colección de datos	1.58 hasta 25.09°
	Intervalos del índice	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
	Reflexiones colectadas	6909
	Reflexiones independientes	6909 [R(int) = 0.0581]
	Totalidad para teta = 25.09°	99.6 %
	Corrección de absorción	Semi-empírica de los equivalentes
	Transmisión max. y min.	0.7452 y 0.6093
	Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F ²
	Datos/anclajes/parámetros	6909 / 1 / 512
	Bondad del ajuste en F ²	1.119
	Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0847, wR2 = 0.1899
15	Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0963, wR2 = 0.1963
	Parámetros de estructura absoluto	0.1(2)
	Pico y agujero diferente más grande	0.402 y -0.559 e.Å ⁻³

Ejemplo 31. Actividad Biológica

Las células que contienen replicón se sembraron en ya sea 3,000
células/pozo (50 µL) en placas blancas/opacas de 96 pozos, o 1,500
células/pozo (25 µL) en placas blancas/opacas de 384 pozos. 50 µL de
2X compuesto se agregaron en la placa de 96 pozos o 25 µL de 2X

111
110

compuesto se agregaron en la placa de 384 pozos. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera CO₂ al 5% húmeda durante 4 días. Después de la incubación, el reactivo Bright-Glo (50 µL para la placa de 96 pozos, o 25 µL para la placa de 384 pozos) se agregó para medir el reportero de luciferasa de luciérnaga para replicación del VHC. El porcentaje de inhibición se calculó contra el control sin fármaco.

Compuesto	Actividad del replicón del HCV (µM)
4	0.58
<i>R_p</i> - 4	2.87
<i>S_p</i> - 4	0.13

R_p-**4** y *S_p*-**4** se han mostrado para tener cobertura de genotipo amplia. Por ejemplo, ambos se han mostrado para ser activos con el virus de la hepatitis C, genotipos 1-4.

La materia objeto de la Solicitud de Patente de E.U.A. No. 12/053,015 y Solicitud de Patente Provisional de E.U.A. Nos. 61/179,923, presentada el 20 de mayo de 2009, y 61/319,513, presentada el 31 de marzo de 2010, se incorporan en la presente como referencia en sus totalidades. La materia objeto de todas las referencias citadas se incorpora en la presente como referencia. En el caso de que el significado de un término incorporado tenga conflicto con el significado de un término definido en la presente, el significado de los términos contenidos en la presente descripción controlan sobre el significado de los términos incorporados.

112
114