



No. 11-158583- -00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO _____

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

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____ C07H 19/10

71. SOLICITANTE _____ PHARMASSET, INC.

DOMICILIO _____ Princeton, New Jersey, Estados Unidos de América

74. APODERADO _____ DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 11-158583- -00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: PHARMASSET, INC.

Dirección: 303A College Road East,
Princeton, New Jersey 08540, Estados Unidos
de América.

Nacionalidad o domicilio: Princeton, New
Jersey, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088

Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/035641 Fecha 20 de mayo de 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/135569 A1 Fecha 25 de noviembre de 2010

6

TÍTULO (54) N-[2'R)-2'-DESOXI-2'-FLUORO-2'-METIL-P-FENIL-5'-URIDILIL]-L-ALANINA 1 METILETIL ÉSTER Y PROCESO PARA SU PRODUCCIÓN.

7

Clasificación Internacional (51) C07H 19/10

8

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

(32) Fecha

20 de mayo de 2009

31 de marzo de 2010

(31) Número de Solicitud

61/179.923

61/319.513

9

Comprobante de pago No. 11-109614 // 11-104962 // 11-92755 // 11-105025 // 11- 109785

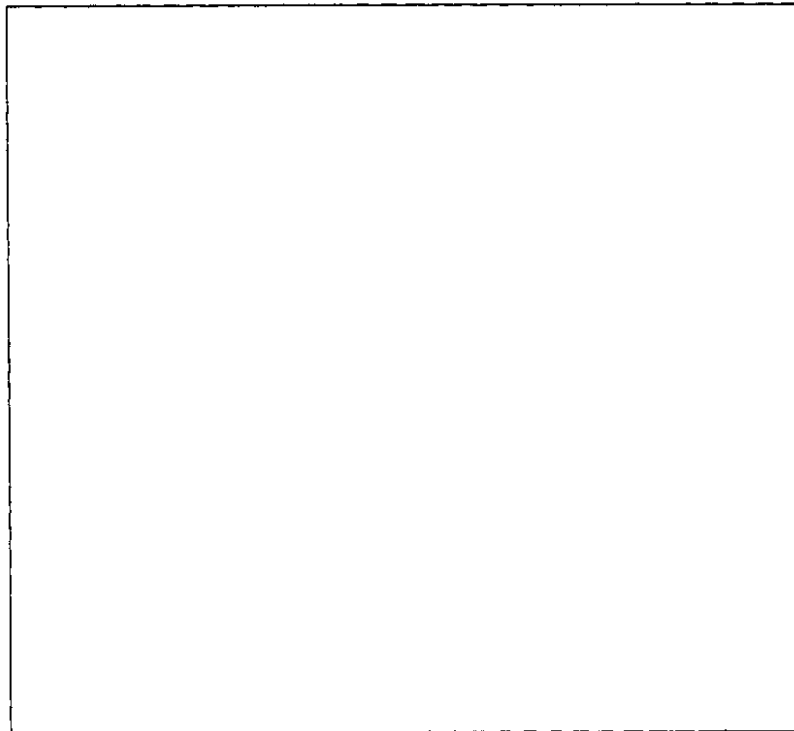
Fecha 09 de noviembre de 2011 // 26 de octubre de 2011.

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA: _____

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXO
INVENTORES

- 1.) **ROSS, Bruce, S.**
(8 Keppel Road, Plainsboro, New Jersey 08536, Estados Unidos de América);
- 2.) **SOFIA, Michael, Joseph**
(3066 Antler Road, Doylestown, Pennsylvania 18902, Estados Unidos de América);
- 3.) **PAMULAPATI, Ganapati, Reddy**
(4608 Hunters Glen Drive, Plainsboro, New Jersey 08536, Estados Unidos de América);
- 4.) **RACHAKONDA, Suguna**
(144 Burnet Crescent, Robbinsville, New Jersey 08691, Estados Unidos de América);
- 5.) **ZHANG, Hai-ren**
(8680 Manahan Drive, Ellicott City, Maryland 21043, Estados Unidos de América);
- 6.) **CHUN, Byoung-kwon**
(135 Heritage Street, Robbinsville, New Jersey 08691, Estados Unidos de América);
- 7.) **WANG, Peiyuan**
(20 Radburn Road, Glen Rock, New Jersey 07452, Estados Unidos de América).

000002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 109614

Bogotá D.C., Noviembre 09 de 2011 - 16:56:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325089214	09/11/2011	59.855.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-158583-00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

000003

8 3159

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Noviembre 9 de 2011 - 18:56:19

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 104962

Bogotá D.C., Octubre 26 de 2011 - 16:37:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427159961	26/10/2011	51.250.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.000.00	1.000.000.00
				\$1.000.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-158583- -00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

000004

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

. Octubre 26 de 2011 - 16:37:13

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0092755

Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:32:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353179256	21/09/2011	65.400.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. UNDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005-01-02	PRORROGAS Y RENOVACIONES	30	PRORROGAS Y RENOVACIONES
			819.000.00	819.000.00
				\$819.000.00
				=====

SON: **OCHOCIENTOS DIECINUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-158583- -00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

000005

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 21 de 2011 - 16:32:21

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 105025

Bogotá D.C., Octubre 26 de 2011 - 16:37:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427159961	26/10/2011	51.250.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	15.000.00	15.000.00
				\$15.000.00
=====				

SON: **QUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-158583- -00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 193

000006

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 26 de 2011 - 16:37:15

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 109785

Bogotá D.C., Noviembre 09 de 2011 - 16:56:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325089214	09/11/2011	59.855.000.00

*** Conceptos Pagados ***

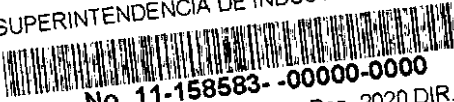
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LUNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	2.000.00	2.000.00
				\$2.000.00

SON: **DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-158583- -00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 193

000007

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Noviembre 9 de 2011 - 16:56:24

78
4

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
JOHNNA BENSON
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
JOHNNA BENSON, NOTARY

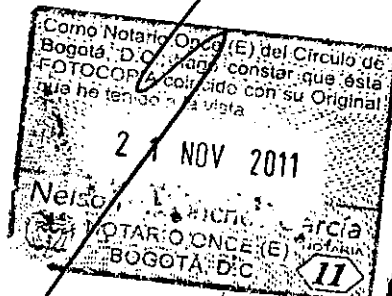
CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 22ND DAY OF JULY 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A334317
9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE



[Handwritten Signature]



0000003

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

Bryce A. Roberts

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

Pharmasset, Inc.

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

Delaware

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

303A College Road East, Princeton, NJ 08540

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistirse, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en **Princeton, NJ, EUA**

a los **26** días de **Junio** de **2008**

Bryce A. Roberts
Firma / signature

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Bryce A. Roberts

legal representative(s) of

Pharmasset, Inc.

an organization existing under the laws of

Delaware

and in present execution of its business activity, domiciled at **303A College Road East, Princeton, NJ 08540**

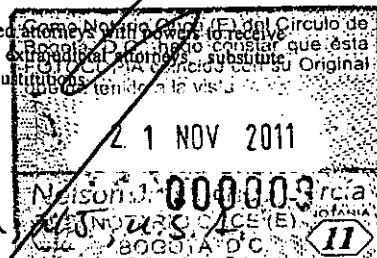
do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned proxy to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial substitutes for this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

PHARMASSET, INC.

Granted and signed at **Princeton**

on this **26th** day of **June**



CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los 26 días del mes de junio de 2008, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. Bryce A. Roberts
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en Princeton, NJ, EUA
firmó de su puño y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de secretario de la persona jurídica Pharmasset, Inc.

4. La citada persona jurídica con sede en Princeton, NJ, EUA está legalmente constituida, que tiene actualmente

existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los 26 días del mes de junio de 2008 de , el Notario que suscribe DA FE de que:

1. Bryce A. Roberts
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en Princeton, NJ, EUA
firmó en su presencia

el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA O POR APOSTILLA

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This 26th day of June, 2008
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Bryce A. Roberts
(name of the person who signs the power of attorney)

of Princeton, NJ U.S.A. legal age and domiciled in Princeton, NJ U.S.A. set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of secretary of the juridical person Pharmasset, Inc.

4. The mentioned juridical person with place of business in Princeton, NJ U.S.A.

is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this 26th day of June 2008
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Bryce A. Roberts
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at Princeton, NJ USA

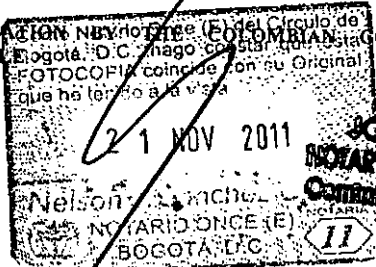
signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA O POR APOSTILLA



000010

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of July, A.D. 2008

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

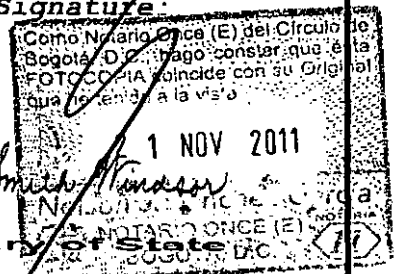
8. No. 0359417

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



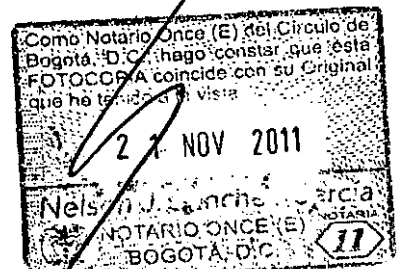
000011

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "PHARMASSET, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE TWENTY-FOURTH DAY OF JULY, A.D. 2008.



000012

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

3796672 8300

AUTHENTICATION: 6751064

080814953

DATE: 07-24-08

You may verify this certificate online at corp.delaware.gov/authver.shtml

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la **APOSTILLA** No. **A334317** de 22 de julio de 2008 expedida en Estados Unidos de América correspondiente a un documento de poder otorgado por la sociedad **PHARMASSET, INC.**, domiciliada en Princeton, Nueva Jersey, Estados Unidos de América con texto en inglés y su correspondiente en español (razón por la cual no se hace su traducción) y certificación notarial con texto en inglés y su correspondiente en español (razón por la cual no se hace su traducción) suscrito por la notario público Johnna Benson, notario público de Nueva Jersey, cuya comisión termina el 7/29/2010.

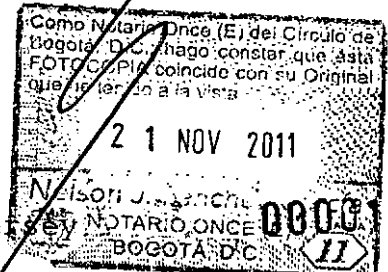
APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por:
Johnna Benson
3. Actuando en su calidad de:
Notario Público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello/estampilla de:
Johnna Benson, Notario

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 22 de julio de 2008
7. Por R. David Rousseau, Tesorero de Nueva Jersey
8. NO. A334317
9. Sello/Estampilla
(fdo) ilegible
Sello del Estado de Nueva Jersey
10. Firma



Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

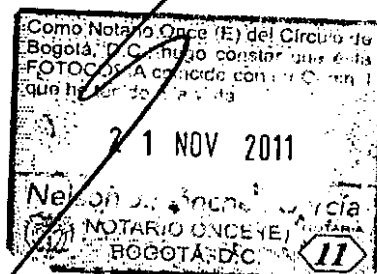
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

810773

2008 AGO 27 P 12:21

msc
JEFE DE LEGALIZACION
BOGOTA D.C.

Yvonne Esder
FOTOCOPIA AGREGA EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



Resumen de la Invención

Se describen en la presente fosforamidatos de nucleósido de fórmula 4 y sus usos como agentes para tratar enfermedades víricas. Estos compuestos son inhibidores de replicación vírica de 5 ARN dependiente de ARN y son útiles como inhibidores de polimerasa HCV NS5B, como inhibidores de replicación HCV y para el tratamiento de infección de hepatitis C en mamíferos. También se describe un proceso para la preparación de un compuesto representado por la fórmula 4: (Fórmula 4) en donde P* representa un átomo de fósforo quirál, el cual comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, (fórmula A), un di-X'-fenilfosfato, (Fórmula B), 2'-desoxi-2f-fluoro-2'-C-metiluridina, (Fórmula 3), y una base para obtener una primera mezcla que comprende 4; en donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 ó 1, y X' es un halógeno, b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto protector para obtener una segunda mezcla que comprende 4; y c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción con el fin de obtener 4.

000014

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

5 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.

10 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,

000015

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 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 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

000016

(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 antiviricas 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 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

000017

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 hepaciviruses, combinados con la pobre capacidad de hepaciviruses 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 hepaciviruses 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

000013

necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una proliproteína 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 hepaciviruses son muy similares. Para tanto los pestiviruses como hepaciviruses, 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 hepaciviruses 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 hepaciviruses 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 proteinasa NS3 es responsable para todo el procesamiento proteolítico de los

000019

precusores 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. EUA* 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 pestivirus y hepacivirus 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.

000020

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 compite 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

000021

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 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 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

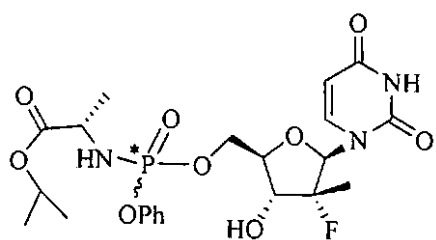
000022

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 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 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 fosforilación 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

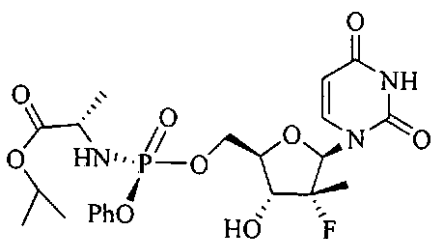
Se describe en la presente un compuesto representado por la fórmula 4 y sus respectivos diaestereómeros basados en fósforo representados por las fórmulas S_p-4 and R_p-4 .

000023

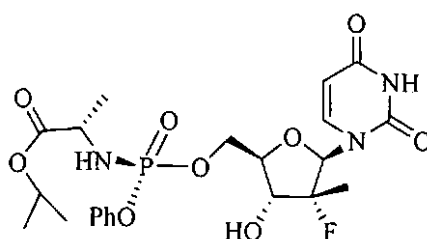


5

4



10

S_P-4*R_P*-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** (amorfo).

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

000024

Figura 11. Estructura (Isotrópica) de Cristal de Rayos X para $S_P-4 \cdot CH_2Cl_2$ (Forma 2)

Figura 12. Estructura (Anisotrópica) de Cristal de Rayos X para $S_P-4 \cdot CH_2Cl_2$ (Forma 2)

Figura 13. Estructura de Cristal de Rayos X para $S_P-4 \cdot CHCl_3$ (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"

000025

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.

000026

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 C_3 hasta C_7 se refiere a una cetona recta/ramificada y/o cíclica/acíclica que tiene tal número de carbonos. La cetona C_3 hasta C_7 incluye, pero no se limita a, acetona, metil etil cetona, propanona, butanona, metil isobutil cetona, metil butil cetona, y ciclohexanona.

El éster C_3 hasta C_7 se refiere a un éster recto/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número de carbonos. El éster C_3 hasta C_7 incluye, pero no se limita a, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de n-butilo, etc.

000027

El clorocarbono C_1 hasta C_2 se refiere a un clorocarbono que tiene tal número de carbonos. El clorocarbono C_1 hasta C_2 incluye, pero no se limita a, cloroformo, cloruro de metileno (DCM), tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, y tetracloroetano.

5 Un nitrilo C_2 hasta C_7 se refiere a un nitrilo que tiene tal número de carbonos. El nitrilo C_2 hasta C_7 incluye, pero no se limita a, acetonitrilo, propionitrilo, etc.

10 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.

El término hidrocarburo saturado C_5 hasta C_{12} se refiere a un hidrocarburo recto/ramificado y/o cíclico/acíclico. El hidrocarburo saturado C_5 hasta C_{12} incluye, pero no se limita a, n-pentano, éter de petróleo (ligroína), n-hexano, n-heptano, ciclohexano, y cicloheptano.

15 El término aromático C_6 hasta C_{12} 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.

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

20 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 seleccionados

000028

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'-
 5 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 Grupos in Organic Synthesis, 3nd ed. T. W. Greene and P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, New York,
 10 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
 15 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
 20 selectivamente tal como acetatos y benzoatos. Los anhídridos dicarboxílicos tales como anhídrido succínico y sus derivados se

000029

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 ácido, por lo que los grupos requieren condiciones de reacción ácidas, tal como, tetrahidropiraniilo, 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 química de al menos otro grupo funcional. Los ejemplos de grupos protectores, incluyen, pero no se limitan a, benzoilo, acetilo, fenil-benzoilo sustituido, tetrahidropiraniilo, 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(alquilenio 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

000030

compuesto que contiene un "grupo protector" y que es capaz de reaccionar con un 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 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, $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{alquilo inferior})$, $-\text{C}(\text{O})(\text{arilo})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{alquilo inferior})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{arilo})$, etc.

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^- , $^n\text{PrO}^-$, $^i\text{PrO}^-$, $^t\text{BuO}^-$, $^i\text{AmO}^-$ (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

000031

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, diisopropiletetilamina, 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), -NO₂, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)(arilo), -C(O)O(alquilo inferior), -C(O)O(arilo), etc.

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.

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

000032

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 similares o (2) sales de adición básica formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos orgánicos enlistados anteriormente, en donde las bases de conjugado comprenden un componente catiónico seleccionado de entre Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , $\text{NH}_4\text{R}'''_{4-g}^+$, 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

000033

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 C_{2-4} " 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

000034

(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

000035

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.

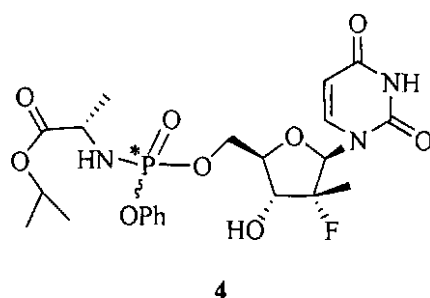
El término "amorfo" se refiere a una situación donde una muestra sólida de ya sea S_p-4 o R_p-4 no es ni cristalina ni tipo cristal.

20 Modalidades

Una primera modalidad se dirige a un compuesto representado

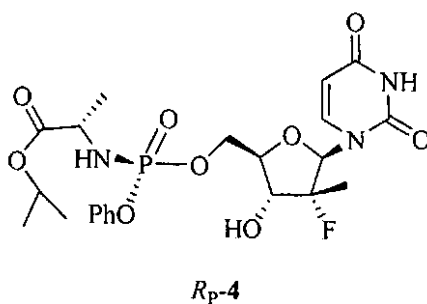
000036

por la fórmula 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:



000037

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 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.

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.

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

000038

que tiene los siguientes picos FT-IR (cm^{-1}): 1742, 1713, 1679, 1460, 1377, 1259, 1157, y 1079.

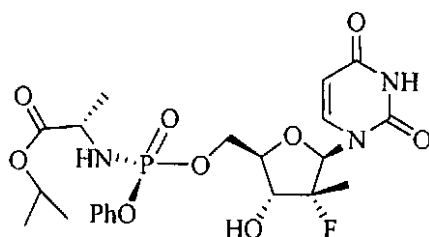
Un sexto aspecto de la segunda modalidad se dirige a R_P-4 que tiene un espectro FT-IR substancialmente como se muestra en la Fig. 15.

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.

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 $S_P-4 \cdot m\text{H}_2\text{O}$, 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

000033

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.

5 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 $\beta \sim 92.05^\circ$.

10 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 $\beta \sim 96.40^\circ$.

15 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.

20 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.

. 000040

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.

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.

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 substancialmente S_p -4 puro.

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

Un decimosexto aspecto de la tercera modalidad se dirige a S_p -4 amorfo substancialmente 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

000041

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

000042

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

000043

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
 5 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
 10 sólidas se ejemplifican en EP 0524579; US 2002/0142050; US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360; US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; US 6,267,985; US 6,294,192; US 6,383,471; US 6,395,300; US 6,569,463; US 6,635,278; US 6,645,528; US 6,923,988; US 6,932,983; US 7,060,294; y US 7,462,608, cada una de las cuales se incorpora como referencia.

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.

15 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
 20 acacia. Las suspensiones acuosas se pueden preparar al dispersar el componente activo finamente dividido en agua con material

000044

viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y otros agentes de suspensión bien conocidos.

Los compuestos 4, R_p-4 , o S_p-4 se pueden formular independientemente para administración como supositorios. Una
5 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 para solidificar.

10 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.

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
15 formulación científica calificada puede modificar las 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.

20 Adicionalmente, los compuestos purificados 4, R_p-4 , o S_p-4 se pueden formular independientemente en conjunto con liposomas o

000045

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 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 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

000046

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
5 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
10 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 hepacivirus 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
15 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
20 dosificación puede variar dentro de los amplios límites dependiendo de numerosos factores tal como la severidad de la

000047

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 como proteínas de suero (por ejemplo, albumina,

000048

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 amoniaco. 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

000049

2003010141, WO 2003037895, WO 2003105770, WO 2004000858, WO
 2004002940, WO 2004002944, WO 2004002977, WO 2004003138, WO
 2004041201, WO 2004065367, WO 2004096210, WO 2005021568, WO
 2005103045, WO 2005123087, WO 2006012078, WO 2006020082, WO
 2006065335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO
 2007039142, WO 2007039145, WO 2007076034, WO 2007088148, WO
 2007092000, y WO2007095269); Inhibidores 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

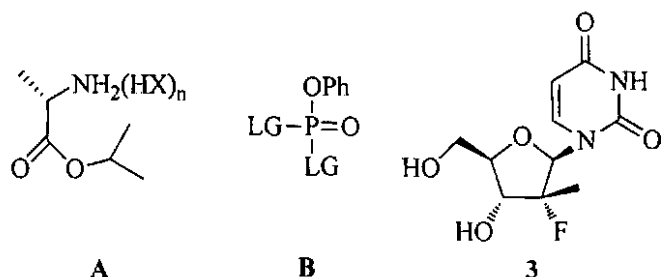
000050

ingredientes activos o por administración sustancialmente simultanea 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 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 .



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

000051

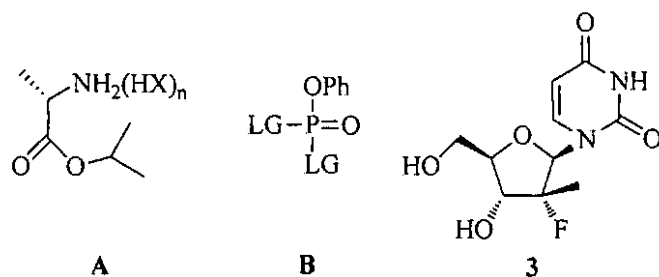
isopropilo se presenta como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente, sustancialmente anhidro.

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.

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



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.

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.

Un segundo aspecto de la octava modalidad para preparar S_P-4 adicionalmente incluye además purificar la segunda mezcla o el

000052

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.

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 solvente, opcionalmente calentar a la temperatura de reflujo del tercer solvente para obtener una cuarta composición, y, si es necesario, 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

000053

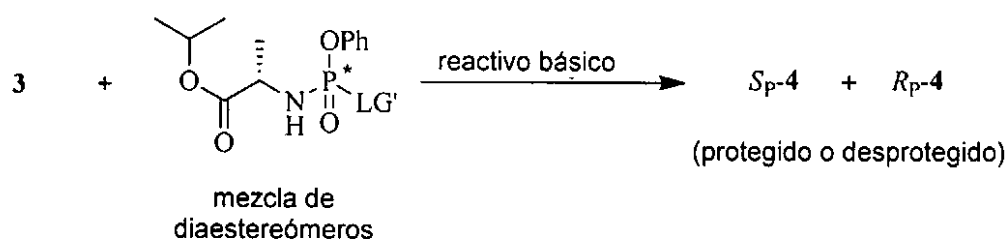
mezcla espesa seca en una primera combinación de solvente/anti-solvente para obtener una primera mezcla espesa húmeda; decantar la primera combinación solvente/anti-solvente de la primera mezcla espesa húmeda para obtener una segunda mezcla espesa húmeda y una primera composición; agregar a la segunda 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

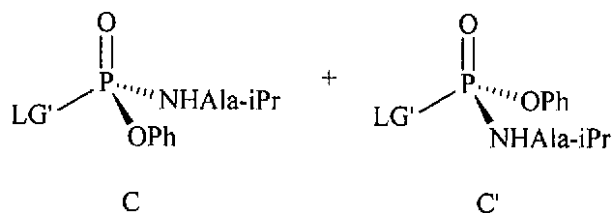
000054

acuosa de acetonitrilo 1-30%). 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

000055

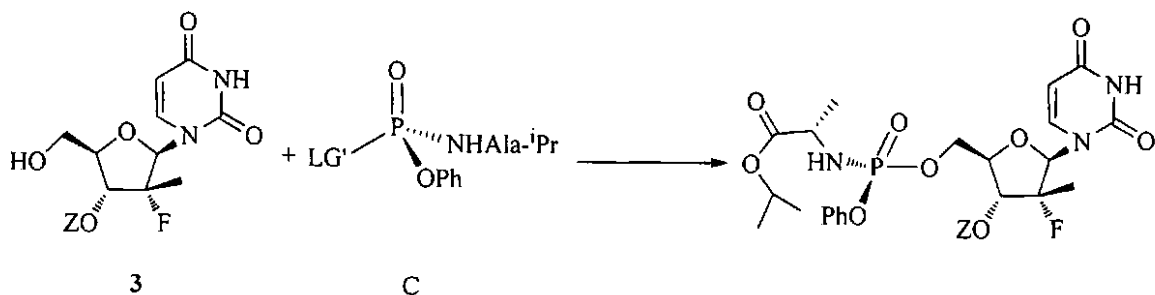
alrededor de 1:1.

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 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-**3** protegido o **3** desprotegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende protegido o desprotegido **S_P-4**

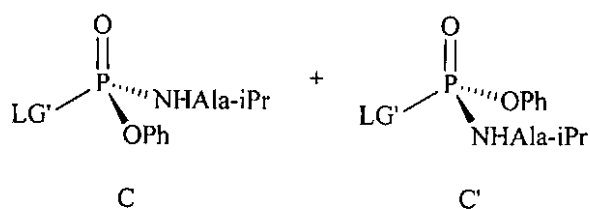


en donde Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo de partida; y b) opcionalmente somete el **S_P-4** protegido o desprotegido obtenido para cromatografía, extracción, o cristalización con objeto de obtener **S_P-4** protegido o desprotegido purificado. En una sub-modalidad, LG' es tosilato, canforsulfonato, o un arilóxido substituido con al menos uno electrón que retira al grupo; más preferiblemente, LG' se

000056

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 C_2 hasta C_7 , tal como acetonitrilo.

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 $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, (ii) fenol y una primera base para obtener $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ con isopropil-alanato y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, o (iii) combinar isopropil-alanato, fenol, y al menos un base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**; o 2) reaccionar $(PhO)P(O)(LG)_2$, en donde LG' , independiente de LG, es un grupo de partida, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido por la reacción $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ con un grupo de partida precursor y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,

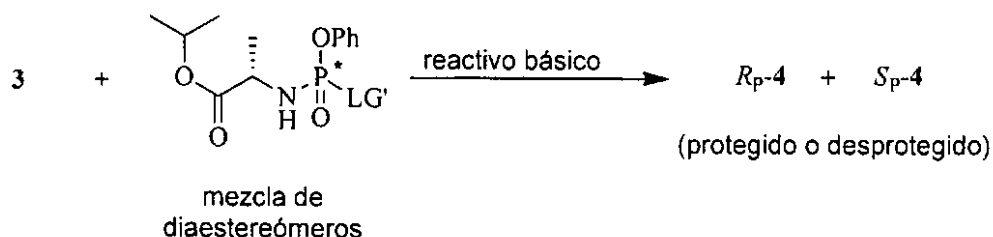


y someter la mezcla a cromatografía o cristalización de la mezcla para obtener **C**. En un aspecto de la novena modalidad, el alanato

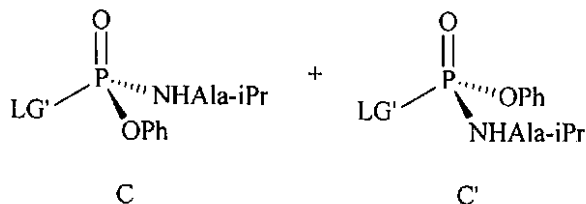
000057

de isopropilo se presenta como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente, sustancialmente anhidro.

Una décima modalidad se dirige a un proceso para preparar R_p-4 , que comprende: a) reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con un 3'-O-protegido o **3** desprotegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende R_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 $\text{C}':\text{C}$ es alrededor de 1:1.

En un primer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la relación de $\text{C}':\text{C}$ 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 $\text{C}':\text{C}$; es mayor que alrededor de 1:1.

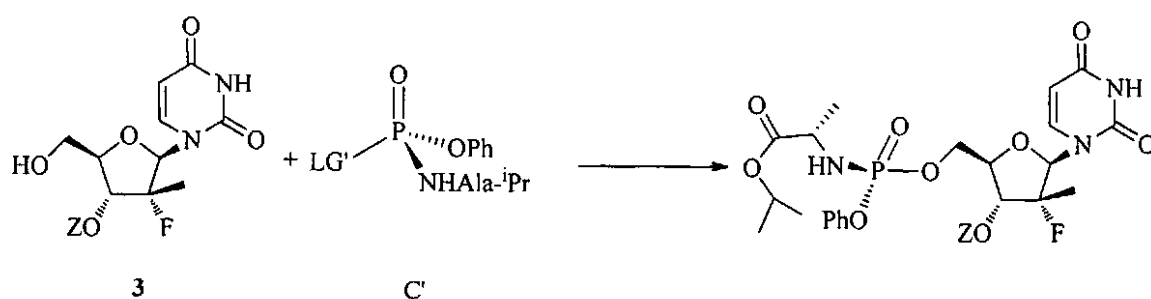
En un tercer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la relación de $\text{C}':\text{C}$ es al menos alrededor de 1.5:1, alrededor de 2.3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5.7:1, alrededor de 9:1, alrededor de 19:1, alrededor de 32.3:1,

000053

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.

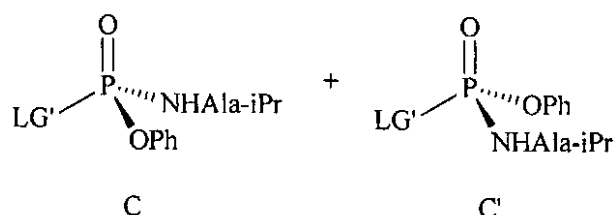
Un quinto aspecto para preparar R_p-4 , comprende: a) reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato (C') con un 3'-O-
protegido o 3 desprotegido, y un reactivo básico para obtener una
composición que comprende R_p-4 protegido o desprotegido



en donde Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo de partida; y b) opcionalmente somete el R_p-4 protegido o desprotegido obtenido para cromatografía, extracción, o cristalización con objeto de obtener R_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 R_p-4 se protege, esto es, Z no es hidrógeno, el proceso de la novena modalidad se dirige además a R_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 C_2 hasta C_7 , tal como acetonitrilo.

000059

El proceso de la décima 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 $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C', (ii) fenol y una primera base para obtener $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ con isopropil-alanato y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C', o (iii) combinar isopropil-alanato, fenol, y al menos una base para obtener una mezcla que comprende C y C'; o 2) reaccionar $(PhO)P(O)(LG)_2$, en donde LG', independiente de LG, es un grupo de partida, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido por la reacción $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ con un grupo de partida precursor y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C',



y someter la mezcla a cromatografía o cristalización de la mezcla para obtener C'. En un aspecto de la novena modalidad, el alanato de isopropilo se presenta como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente, sustancialmente anhidro.

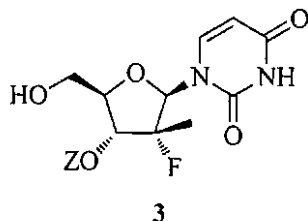
Una decimoprimer modalidad se dirige a una composición obtenida por los procesos recitados en la séptima modalidad, la octava modalidad, la novena modalidad o la décima modalidad así como sus respectivos aspectos. Un aspecto de la undécima modalidad se dirige a una composición obtenida por cualquiera de las modalidades ejemplificadas descritas abajo. La composición

000060

así obtenida puede ser cristalina, tipo cristal, amorfa, o una combinación de los mismos.

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

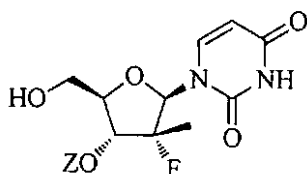
5



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

10

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



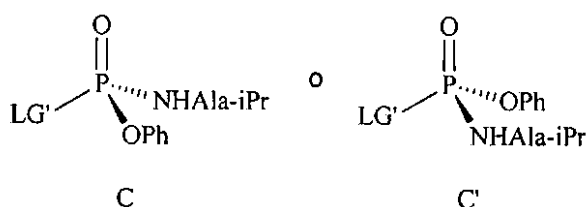
3a: Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃

3b: Z = -C(O)OCH₂Ph

3c: Z = -Si(Me)₂^tBu

3d: Z = -Si(^tPr)₂OSi(^tPr)₂OH .

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



15

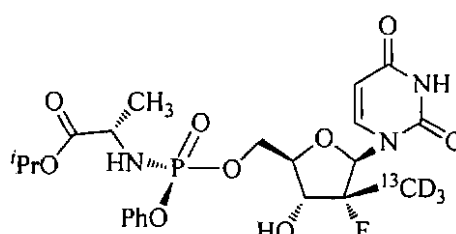
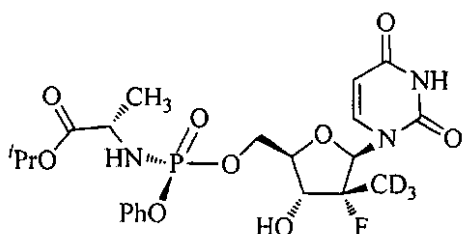
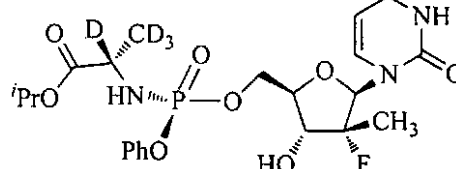
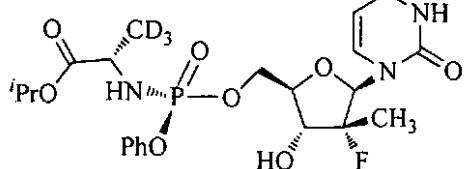
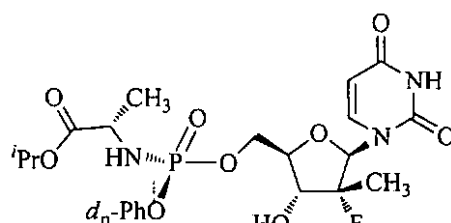
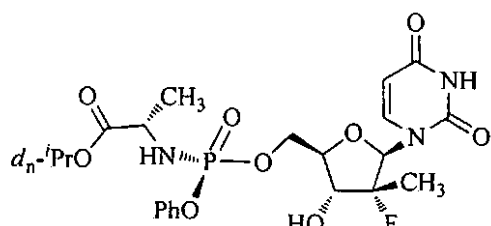
donde LG' es un grupo de partida, que es útil para la preparación de R_p -**4** o S_p -**4**.

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

000061

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 sustituye 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.



000062

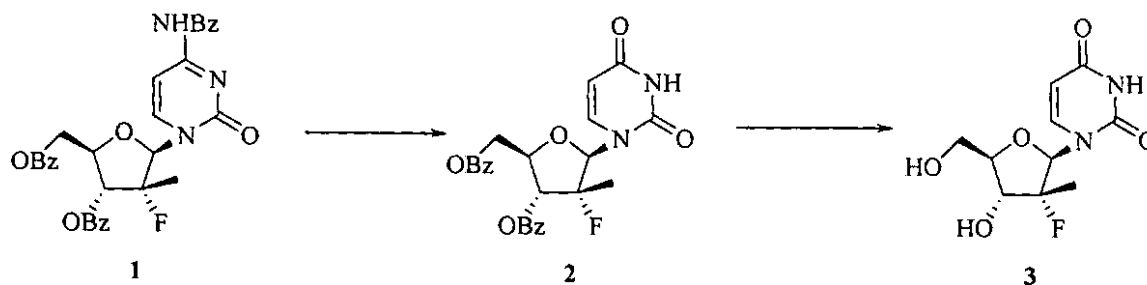
Aunque los grupos de metilo representados anteriormente se muestran como que son completamente deuterados, alguien reconocerá que las variaciones deuteradas parciales son también posibles, tal como, $-CDH_2$ y $-CD_2H$. Las etiquetas isotópicas en la furanosa y base también se contemplan. Igualmente, 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 ^{13}C que significa que el grado de enriquecimiento excede la 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

Con objeto de preparar el nucleósido de uridina, alguien podría tomar ventaja de un intermediario de citidina tribenzoilada avanzado en la síntesis de ciertas 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.



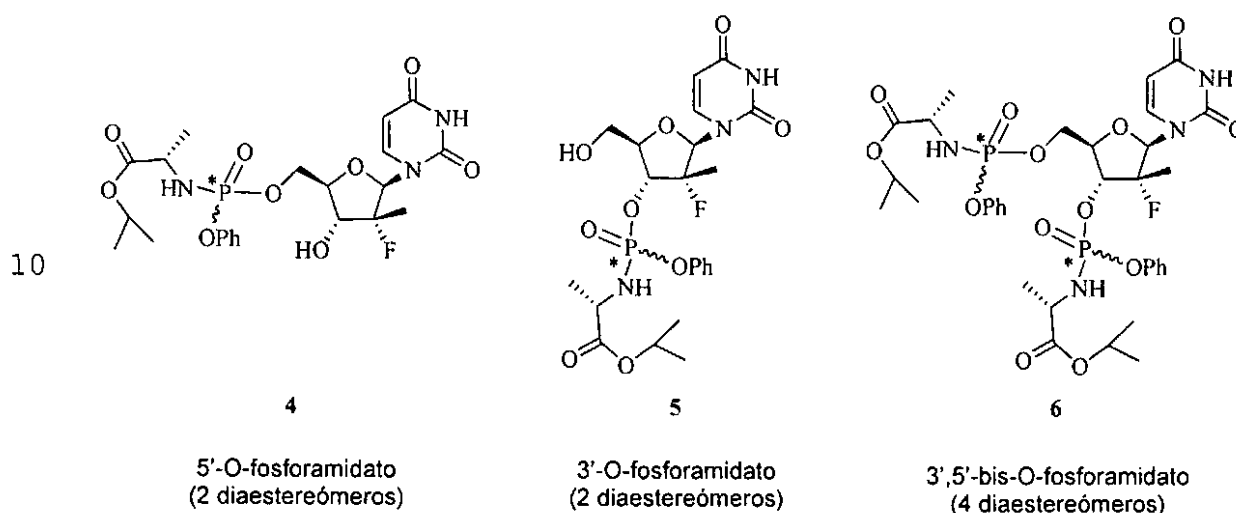
000063

La 3',5'-O-dibenozil-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-dibenozil-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 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

000064

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-sustituídos (5) y alrededor de 10-30% del producto bis-sustituído (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).

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-

000065

fosforamidato (5) con una más fácil separación cromatográfica de tal modo proporcionando los diaestereómeros de 5'-O-fosforamidato deseados en mucho mayor pureza (4).

5 Para la estereoquímica de reactivo, un estudio se hizo en el cual la estereoquímica de los reactivos se cambió sistemáticamente y los resultados se monitoréaron por RMN de fósforo de la reacción cruda como había informado Lehsten. En los
10 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'-monosustituídos (4 y 5) a los productos 5',3'-bis sustituídos (6). El producto 3'-monosustituído convierte al producto bis en una velocidad más rápida que el producto 5'-monosustituído, así que es posible para reducir el nivel de contaminación de 3'-diaestereómero al resolver la reacción más a los productos bis-sustituídos. 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-sustituído (6). Se observó también que el clorohidrato de aminoácido es muy
15 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
20 aminoácido a diclorofosfato de fenilo a nucleósido fue 3.5:2.5:1 respectivamente. Se encontró que la relación óptima de aminoácido

000066

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 alquiler.

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 se cambiarían. Los 3'-diaestereómeros químicamente alterados podrían luego permitir separación cromatográfica más

000067

fácil o separación por soportes de barrido especial o por extracciones.

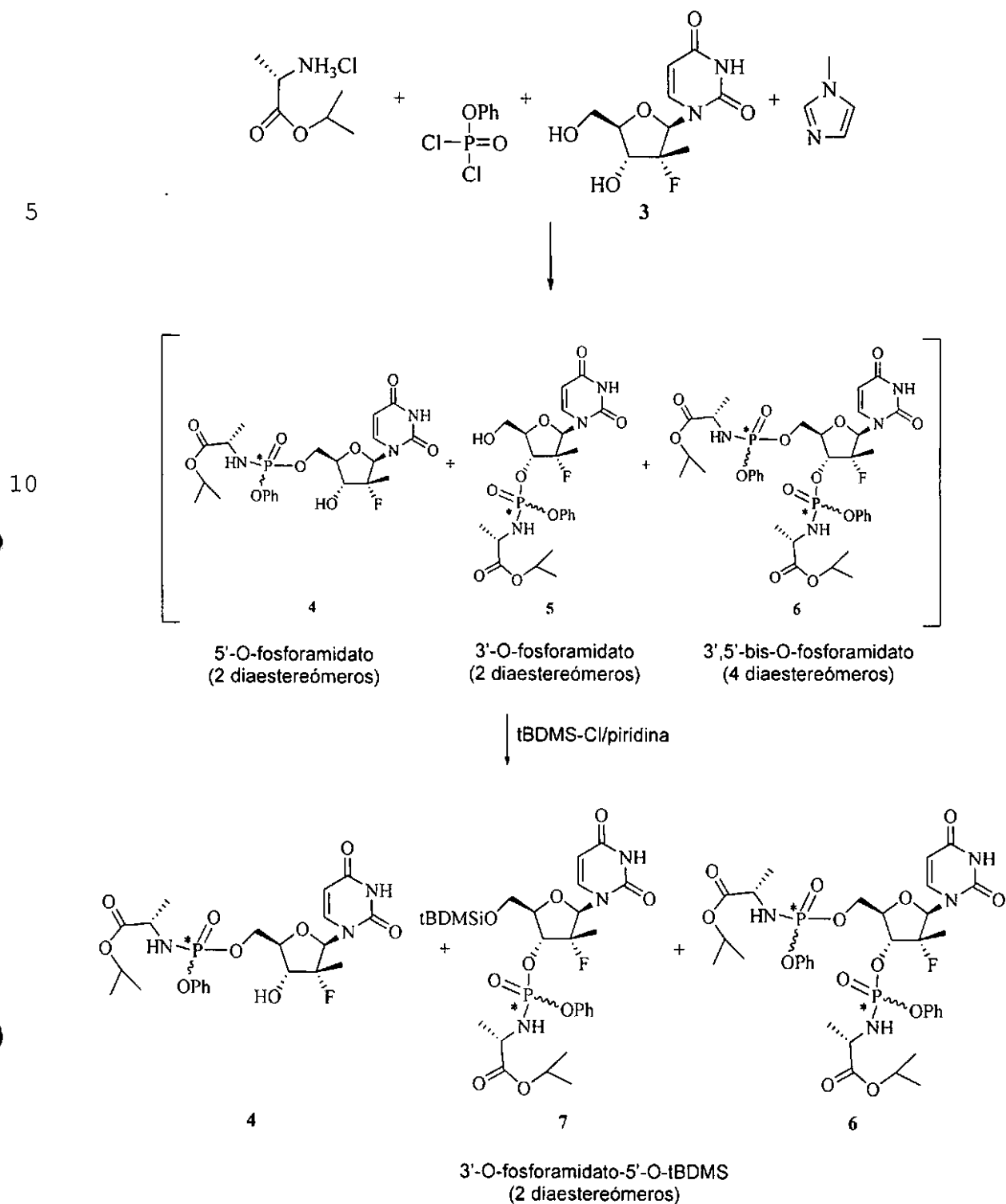
Especialmente, el grupo de bloqueo tert-butildimetilsililo (tBDMS) cumple estos criterios y fue el primero en demostrar y posteriormente usar en una escala de multi-kilogramo. Bajo
5 ciertas condiciones tal como en piridina como solvente y base, el grupo tBDMS reacciona con selectivamente alto en la posición de hidroxilo primaria sobre la posición de hidroxilo 3' secundaria. La reacción de fosforamidato usa N-metilimidazol (NMI) como una
10 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
15 con 1-3% sin el tratamiento de sililo. Similarmente, el tratamiento con cloruro de dimetoxitrifenilmetilo (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
20 calentamiento o exposición a ácido. Alguien puede también prever muchos otros grupos de bloqueo, como se señaló anteriormente.

000068

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 fosforamidato podría ser cualquier combinación de éster de aminoácido y alcohol aromático. La porción de nucleósido
5 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
10 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
15 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.

000069



15

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.

20

Método de Preparación

000070

25

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'-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.

000071

**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 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 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. 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

000072

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 (^{31}P y ^1H) se descongelaron. El ^{31}P -RMN indica
5 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 solvente se evaporó bajo presión reducida y luego bajo alto vacío con objeto de reducir el contenido de agua de la mezcla cruda a
10 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 horas, la impureza 3' 5 no puede detectarse más larga y la reacción se apagó por la adición de metanol (50 mL).

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
15 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
20 (60 psi) y una velocidad de flujo de 400 mL/min, el cartucho se lavó con cloruro de metileno (4L) seguido por un gradiente

000073

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.

Con objeto de producir un sólido amorfo de la mezcla

000074

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 ^{31}P 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 ^{31}P 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.

Caracterización de la mezcla de isómeros (**4**): ^1H -RMN (CDCl_3)
 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).

^{31}P -RMN (CDCl_3) δ 3.60 (R_P), 3.20 S_P relativo a

000075

trifenilfosfato a -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.

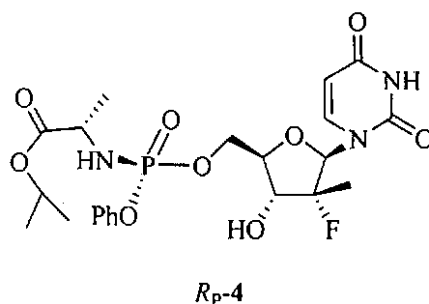
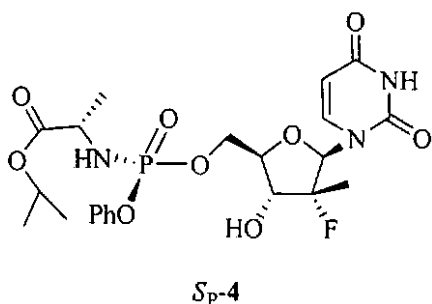
5

Discusión en separación de isómeros

El compuesto **4** debido a la quiralidad en el fosforo 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.

10

Los procedimientos para cristalización se resumen a continuación.



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%.

15

20

R_P-**4**: ¹H-RMN (CDCl₃) δ 9.10 (br s, 1H, NH), 7.36 (m, 2H,

000076

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).

5

Ejemplo 4. Preparación y cristalización de S_p-4.

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

000077

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, 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

000078

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. 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).

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

000073

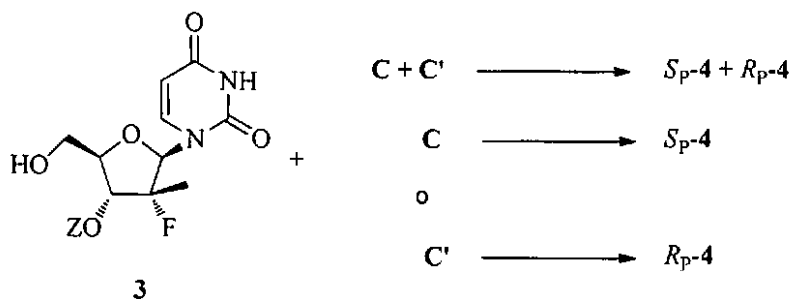
evaporó para dar una mezcla espesa seca. La mezcla espesa se agitó con 40 mL de EtOAc/hexanos al 50% durante 15 min y luego se filtró. El gel de sílice se lavó con 10 mL adicionales de EtOAc/hexanos al 50%. El gel de sílice luego se lavó con MeOH/DCM al 15% (100 mL) y colectó separadamente. El solvente 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. ³¹P 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 cristalinas sencillas de *S_P-4* se presentan a continuación.

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 (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 se agitó

000080

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).

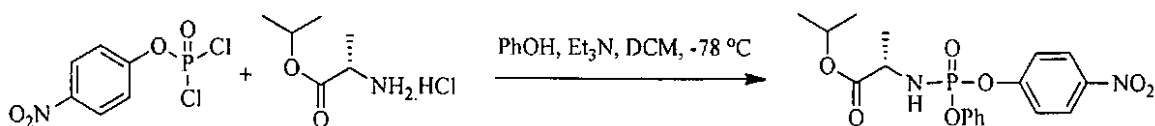
Los compuestos S_p-4 y R_p-4 pueden prepararse alternativamente, de acuerdo con la novena o decima modalidad, al hacer reaccionar el nucleósido (protegido o no protegido) **3** con un isopropil-alanil-fosforamidato (mezcla de **C** y **C'**, **C** o **C'**), como se muestra en la siguiente ecuación.



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.

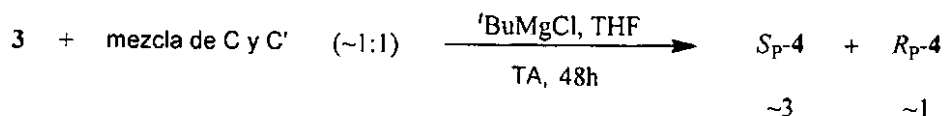
000081

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



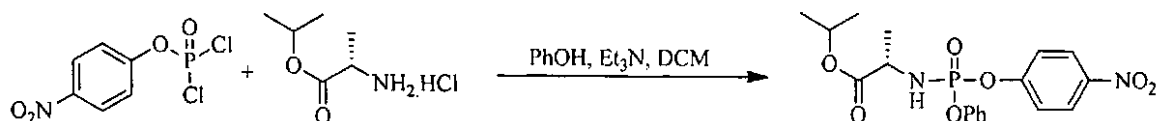
5 A una solución agitada de fosforodichloridato de 4-nitrofenilo 12.8g, 50 mmol) en diclorometano (100 mL) se agregó una solución de fenol y trietilamina (7.7 mL, 55 mmol) en diclorometano (100 mL) a -78°C durante un periodo de 20 min. La
10 mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se 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 trituroó 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)⁺.

000082

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

5 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 (130 mg, 0.5 mmol) en THF seco (1.5mL) se
 10 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 (1.5mL) 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 NH_4Cl 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).

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



000083

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 horas. El éster de aminoácido pre-secado se agregó a -5~0°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 0~10°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 trituró 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

000084

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 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 P-RMN. Pf 62-66°C.

^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.31; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.49(d, $J=8.8\text{Hz}$, 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);

^{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, $J=6.2$ &

000085

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) $^+$.

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

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

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 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.

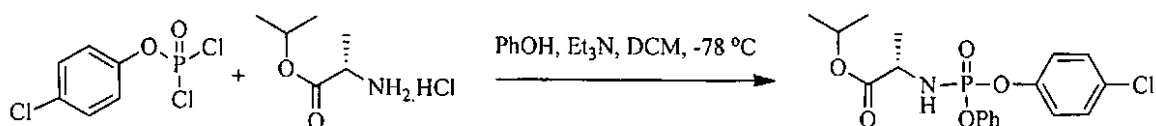
20 **Datos analíticos para éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(R)-**

000086

(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero R_p):

^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.47; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.30-8.27 (m, 2H), 7.46-7.38 (m, 4H), 7.27-7.20 (m, 3H), 6.68 (dd, $J=13.8, 10.2\text{Hz}$, 1H), 4.86-4.77 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 1H), 1.20 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.10 (dd, $J=6.2, 2.2\text{Hz}$, 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 ($\pm$):



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 trituró 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. ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3): δ -1.58, -1.62; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): 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),

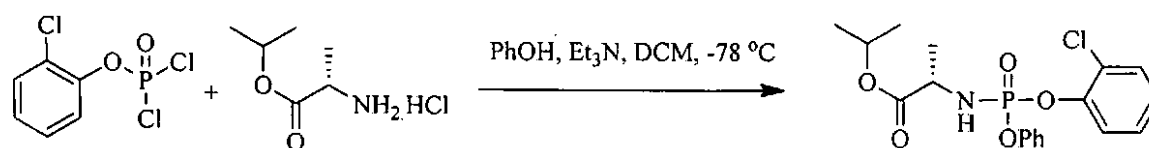
000087

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.

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-hidroximetil-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.

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



A una solución agitada de fosforodichloridato de 2-cloro-fenilo (9.8 g, 40 mmol) en diclorometano (80 mL) se 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

000088

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 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 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 (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.

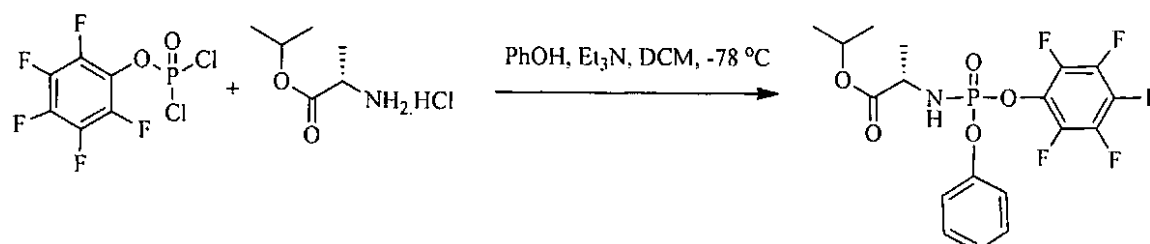
Ejemplo 9-2. Preparación de 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahydrofuran-2-il)metoxi(fenoxi)-fosforilamino)propanoato de (S)-isopropilo.

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

000089

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 ($\pm$).



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. ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3): δ -0.49, -0.58. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización, o cromatografía, como se anota arriba.

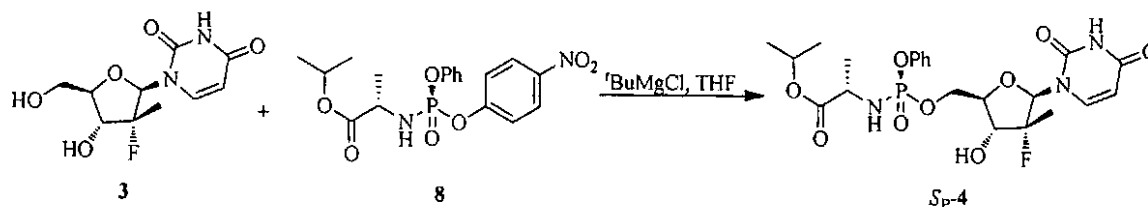
Ejemplo 10-2. Preparación de 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2

000090

il)metoxi) (fenoxi)-fosforilamino)propanoato de (S)-isopropilo.

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-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.



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

000091

ambiente durante 42h y luego se apagó con NH_4Cl 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 ^{31}P 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-tetrahydro-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 NH_4Cl acuoso saturado (20 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo (150 mL) y secuencialmente, Na_2CO_3 acuoso al 10% (3 x 20 mL) y agua (20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato 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-

000092

tetrahidro-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 μ L, 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).

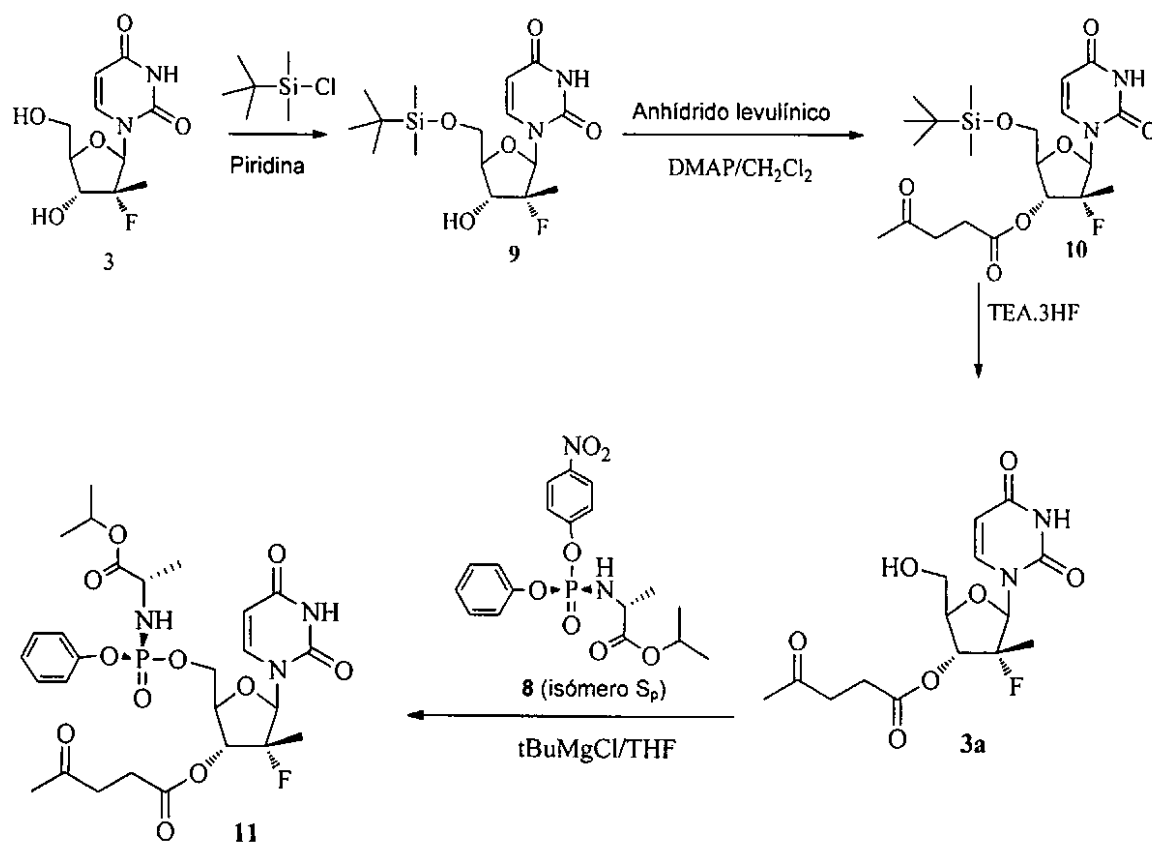
Ejemplo 14. Preparación de R_P -4** (escala de 260 mg):** A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (260 mg, 1 mmol) en THF seco (6 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (1.23 mL, 2.1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

000093

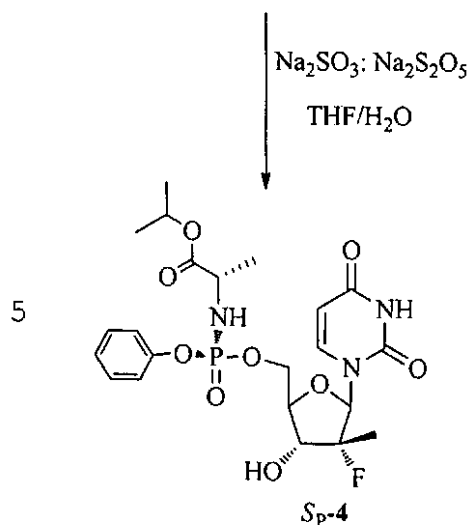
periodo de 3 min. La mezcla se permitió agitar a temperatura ambiente durante 96 h y luego se apagó con NH_4Cl acuoso saturado (10 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo (50 mL) y agua (2 x 20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, filtró y concentró bajo 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



000094



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

15 completamente y el residuo 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),

20 6.0 (d, 1H, J = 18 Hz), 7.81 (d, 1H, J = 9 Hz), 8.57 (br, s, 1H), 11.1 (s, 1H).

000095

Ejemplo 15-2. Síntesis de 5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-3'-O-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 (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.11 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 1.34 (d, 3H, J = 21 Hz), 2.22 (s, 3H), 2.6-2.89 (m, 4H), 3.72 (m, 1H), 4.01 (d, 1H, J = 12 Hz), 4.23 (d, 1H, J = 9 Hz), 5.33 (dd, 1H, J = 15 Hz), 5.73 (d, 1H, J = 6 Hz), 6.26 (d, 1H, J = 15 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 12 Hz), 8.72 (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

000096

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: (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.55 (d, 3H, CH₃, J = 20 Hz), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.8-3.03 (m, 5H, CH₂CH₃), 3.91-3.96 (dd, 1H, CH''), 4.2-4.25 (m, 1H, CH'), 4.34 (dd, 1H, CH, J = 8 Hz), 5.25 (dd, 1H, J = 16 Hz), 5.93 (d, 1H, J = 8 Hz), 8.20 (d, 1H, J = 8 Hz), 9.18 (s, 1H).

Ejemplo 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-tetrahidro-furan-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino)-propiónico (11):

A una solución del nucleósido (**3a**, 1.00 mmol, 358 mg) en 5 ml de THF anhidro que se enfrió 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 x 25 ml). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera y secó sobre sulfato

000097

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 rendimiento fue 76%. ^{31}P RMN (CDCl_3 , 162 MHz): 3.7 ppm; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.22 (dd, 6H, $J = 6.4$ Hz), 1.37 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.63-2.9 (m, 4H), 4.0 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 4.2-4.33 (m, 1H), 4.57 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 4.96-5.00 (sept, 1H), 5.2 (dd, 1H, $J = 9$ Hz), 5.42 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6.19 (d, 1H, $J = 18$ Hz), 7.15-7.35 (m, 5H), 7.5 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 8.2 (br, s, 1H).

Ejemplo 15-5. Síntesis 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-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino}-propiónico (S_P -4)

Una solución de sulfito de sodio se preparó al agregar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1.51 g) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (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.

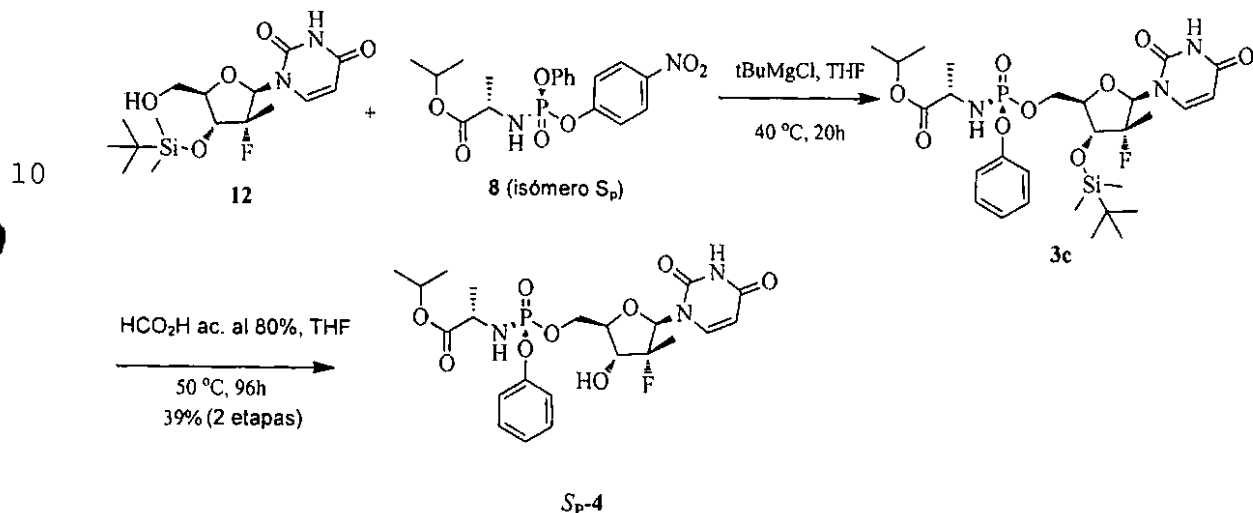
000005

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 (1.5 mL) se agregó gota a gota durante un periodo de 3 min. La mezcla se calentó a 40°C durante 5 h 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 Na_2CO_3 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, 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

000099

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).

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



Ejemplo 17-1. Preparación de 1-[(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-4-(tert-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-1*H*-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.

15 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 salmuera (50 mL) y secó (sulfato de sodio, 4 g). El solvente se removió bajo presión reducida y el

20 residuo se disolvió en diclorometano (100 mL). A la solución se agregaron imidazol (7.83 g, 115 mmol) y cloruro de t-

000100

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).

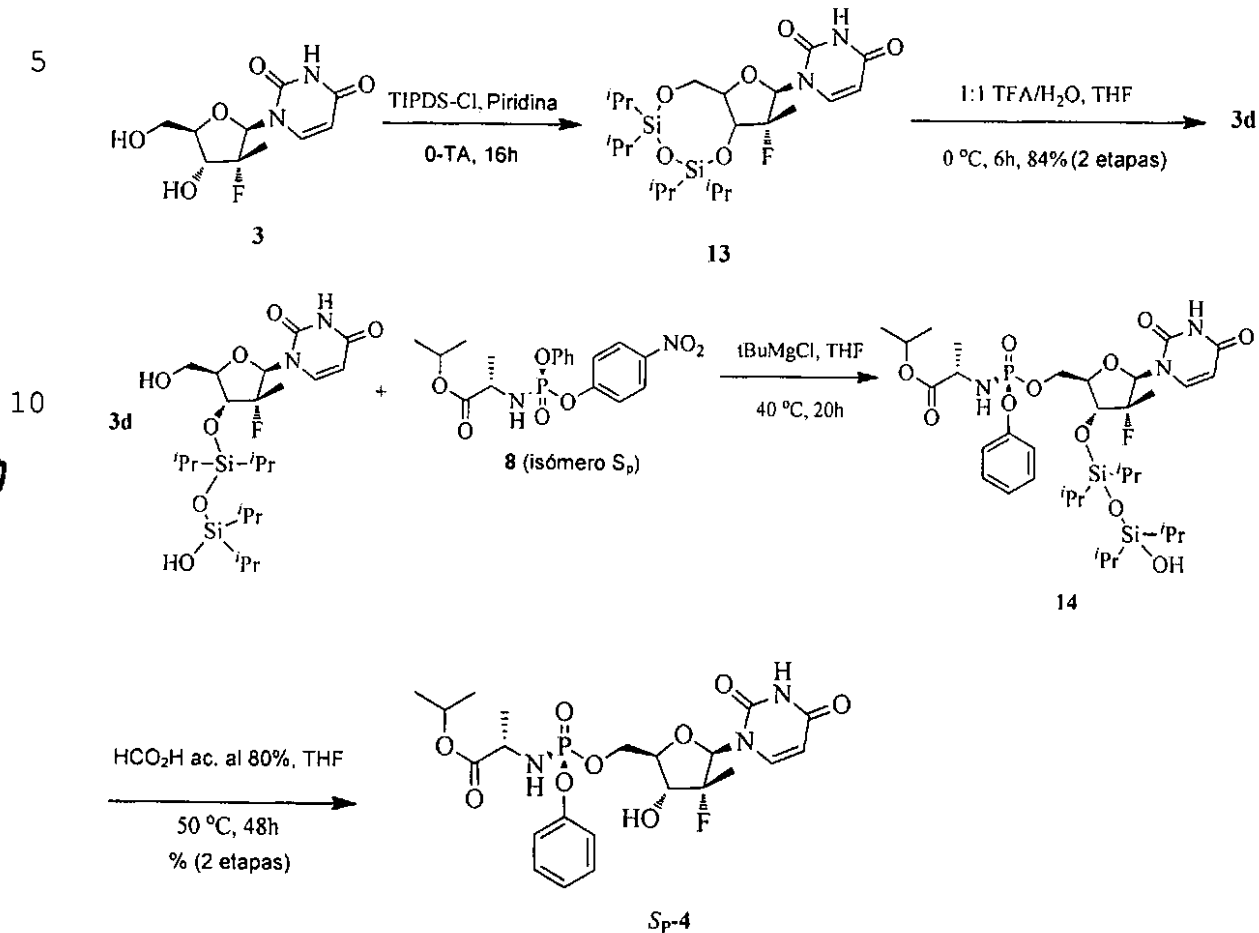
Ejemplo 17-2. Preparación de S_P -4 usando 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-1H-pirimidin-2,4-diona (3c).

A una solución agitada de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-1H-pirimidin-2,4-diona (**12**, 374 mg, 1

000101

mmol) en THF seco (3 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de tert-butilmagnesio (1.8 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
5 solución de éster de isopropilo del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8**, isómero *S_p*, 653 mg, 1.6 mmol) en THF (2.5 mL) 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
10 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 orgánica se lavó con solución de Na₂CO₃ 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
15 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).

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 $^{\circ}$ 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 tetrahidrofurano (75 mL) y se agregó una solución acuosa de TFA (75mL, 1:1 TFA/agua) a 0 $^{\circ}$ C durante un periodo de 20 min. La

000103

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 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).

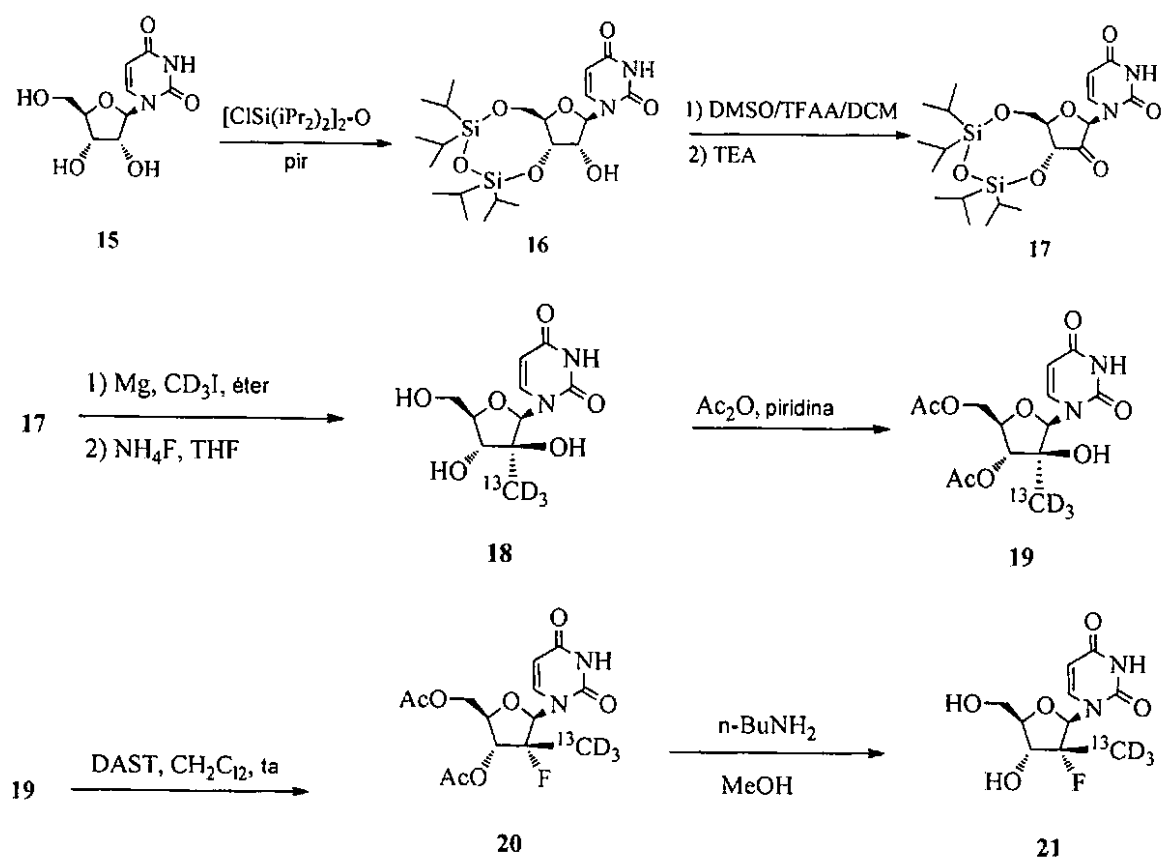
Ejemplo 18-2. Preparación de S_p-4

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).

. 000104

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 material de partida sin reaccionar (**14**, 242mg) y *S_P*-**4** (80mg, 15% de rendimiento) como un sólido blanco.

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**

. 000105

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 (R_f 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- d_6) δ (ppm) 11.35 (s, 1H, NH), 7.66 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-6), 5.57 (d, 1H, J = 4.8 Hz, 2'-OH), 5.50-5.49 (m, 2H, 1'-H 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, $CH(CH_3)_2$).

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

000106

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°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 NH_4Cl 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 Na_2SO_4 . 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 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

000107

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) 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), 8.65

000108

(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').

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-perdeuteriometiltetrahidrofuran-2-il)metilo, 19**

10 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.

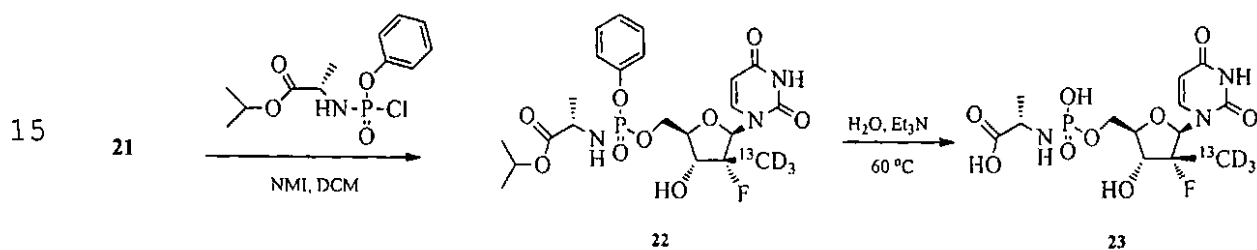
Ejemplo 19-5. Preparación de acetato ((2R,3R,4R,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-4-¹³C-perdeuteriometiltetrahidrofuran-2-il)metilo, 20

15 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
20 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 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-tetrahydrofuran-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-tetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (S)-Isopropilo, **22**

20

il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (S)-Isopropilo, **22**

000110

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 (2*S*)-2-((((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2*H*)-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

000111

(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); ^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ 8.12; EMBR (ESI) $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{12}^{13}\text{CH}_{17}\text{D}_3\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$ 416.3, encontrado 416.4.

5

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 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).

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

Los patrones de Difracción en Polvo de Rayos X se colectaron en un difractómetro Siemens D5000 usando radiación Cu $K\alpha$ (40kV, 40mA), goniómetros θ - θ , 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

000112

11.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones Ambientales

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

Los patrones de Difracción en Polvo de Rayos X se colectaron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación $\text{Cu K}\alpha$ (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 *Diffraction Plus* EVA v 9.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones Ambientales

000113

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.

5

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.

10

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 °	%
6.616	51.1	4.900	6.8
7.106	40.5	5.190	19.8
8.980	30.0	7.501	100.0
11.020	21.7	8.355	4.1
11.559	77.1	8.965	7.7
11.950	12.8	9.619	21.2
13.023	5.2	10.145	3.6
14.099	6.2	14.393	4.9
15.121	5.7	16.300	7.0
15.624	5.4	16.688	10.6
16.003	17.8	17.408	5.5
17.882	100.0	17.820	8.2
18.567	8.8	18.262	31.5

15

20

- 000114

25

Datos XRPD para R_p-4		Datos XRPD para S_p-4 (Forma 1)	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
2-Teta °	%	2-Teta °	%
19.564	22.7	18.600	6.3
20.280	5.6	18.900	7.3
20.728	42.5	19.150	6.1
21.047	19.9	19.696	4.8
21.671	22.0	20.398	4.4
21.943	23.3	20.710	6.9
22.214	18.9	21.950	6.1
23.074	28.5	22.175	12.2
24.145	30.3	22.511	5.6
24.355	39.1	22.924	3.1
25.366	7.6	23.360	6.5
26.146	36.2	23.538	7.1
27.000	9.0	23.910	7.4
27.313	15.6	24.873	3.7
27.677	22.7	25.123	4.9
28.219	12.8	25.649	4.2
28.661	6.2	26.748	5.2
29.450	6.8	27.339	3.7
29.735	9.4	27.646	3.5
31.372	8.2	28.066	3.1
31.967	10.9	29.050	3.0
32.295	6.4	29.541	3.6
33.001	11.4	30.178	3.8
33.774	11.8	31.648	3.1
34.385	6.6	32.721	3.5
34.734	6.5	33.154	3.0
35.600	7.3	33.923	3.5
35.965	13.1	34.341	3.1
36.409	14.7	35.465	3.5
36.880	7.0	36.923	3.1
37.509	5.9	37.760	3.4
37.870	6.0	38.404	3.3
38.313	5.8	40.416	3.1
38.943	8.4		

000115

Datos XRPD para R_p-4		Datos XRPD para S_p-4 (Forma 1)	
Ángulo	Intensidad	Ángulo	Intensidad
2-Teta °	%	2-Teta °	%
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 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

000116

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 ($nBuAc$) 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 $94.3^{\circ}C$ 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	% de intensidad
2-Teta °	%
5.0	74.8
7.3	100.0
7.8	2.2
8.2	6.8
8.8	9.3
9.4	23.5
10.0	8.4
11.4	4.2
13.3	3.0
14.2	6.1
14.9	3.5
16.1	7.9
16.6	13.2
17.3	15.4
17.7	10.1
18.1	42.6
18.4	7.6

000117

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
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

000115

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
9.8	28.6
10.1	10.4
13.7	7.0
16.7	3.1
19.5	8.9
19.8	45.5
20.1	18.6
20.4	3.6
20.6	25.6
20.9	15.9
21.1	10.9
22.1	3.4
24.6	38.7
24.7	100.0
25.1	61.2
26.1	53.3
39.0	6.3

Ejemplo 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

000119

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**.

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

000120

Ángulo	% de intensidad
2-Teta °	%
19.1	31.1
19.9	12.9
20.0	9.0
21.3	3.5
25.0	22.3
25.6	2.3
26.3	5.9
26.9	2.0
31.7	2.1

Ejemplo 21-6. S_p -4 (Amorfo)

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

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

. 000123

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 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 Å⁻³.

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, 1.54178 Å				
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%				

000122

Reflexiones	14854
Reflexiones únicas	7513
R_{int}	0.0217

5

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, 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 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 $\text{\AA}^{-3}$.

20

25

000123

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	1.469g.cm ⁻¹				
μ	3.196mm ⁻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				

Ejemplo 22-3. Cristalografía de Rayos X de Cristal Sencillo de S_p-4 (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), C₂₃H₃₁N₃PO₉FCl₂, proporciona un grupo de espacio monoclínico P2₁ (ausencias sistemáticas 0k0: k=odd) con a=12.8822(14) Å, b=6.1690(7) Å, c=17.733(2) Å, β=92.045(3)°, V=1408.4(3) Å³, Z=2 y d_{calc}=1.449 g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se

000124

temperatura de 143K. La indexación preliminar se realizó de una serie 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/MSB (2002)) paquete de programa para el procesamiento adicional 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 ($R_{int} = 0.0180$). 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).

La estructura se resolvió por métodos directos (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). *J. Appl. Cryst.*, **32**, 115-119). El refinamiento fue por mínimos cuadrados de matriz completa 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.

000125

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 $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$.

Fórmula:	$C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$
Peso de la Fórmula:	614.38
Clase de cristal:	Monoclínico
Grupo de espacio:	$P2_1$ (#4)
Z	2

000126

Constantes celulares:

	a	12.8822(14) Å
	b	6.1690(7) Å
	c	17.733(2) Å
	β	92.045(3) °
5	V	1408.4(3) Å ³
	μ	3.48 cm ⁻¹
	Tamaño del cristal, mm	0.42 x 0.12 x 0.10
	D _{calc}	1.449 g/cm ³
	F(000)	640
	Radiación:	Mo-K α (λ =0.71073 Å)
	Intervalo 2 θ	5.48 - 50.04 °
10	hkl colectado:	-14 ≤ h ≤ 15; -7 ≤ k ≤ 6; -19 ≤ l ≤ 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

15 **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

000127

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 $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1.068$ 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) Å,	α	90°,
		b	6.18080(10) Å,	β	96.399(2) °,
		c	18.0134(4) Å,	γ	90°
V	1430.15(6) Å ³				
Z	2				
D_c	1.507g.cm ⁻¹				
μ	3.977mm ⁻¹				
Fuente, λ	Cu K α , 1.54178 Å				
$F(000)$	672				
T	100(1) K				
Cristal	Aguja incolora, 0.22 x 0.03 x 0.02 mm				
Datos truncados para	0.80 Å				

000128

$\theta_{\max}$	74.41°
Totalidades	69.1%
Reflexiones	3062
Reflexiones únicas	2607
R_{int}	0.0198

5

Ejemplo 23. Estabilidad a temperaturas elevadas y humedad relativa

10

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 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.

15

Condiciones	$t = 1.5 \text{ h}$	$t = 4.5 \text{ h}$	$t = 6.5 \text{ h}$	$t = 8.5 \text{ h}$	$t = 73 \text{ h}$
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

20

000123

25

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	-
25°C/53% RH	Sin conversión en líquido	Sin conversión en líquido	Sin 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

000130

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 $2^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ y parámetros de modulación de temperatura de $\pm 0.2^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ y 40 segundos. Una purga de nitrógeno seco a $50\text{ ml}.\text{min}^{-1}$ se mantuvo sobre 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.

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

000131

sobre la muestra. El software de análisis de datos y control del instrumento fue STARe v9.20.

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 .

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.

El análisis DSC de **S_p-4** muestra una endotermia amplia sencilla con un comienzo de 93.9°C (ΔH $43\text{ J}.\text{g}^{-1}$) 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

000132

descomposición arriba de 240°C, confirmando que el material no se ha solvatado.

Ejemplo 26. Absorción del Vapor Gravimétrico (GVS)

SMS DVS Intrínseco

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%.

Tabla 13. Parámetros del Método para Experimentos SMS DVS Intrínsecos

Parámetros	Valores
Adsorción - Barrido 1	40 - 90
Desorción / Adsorción - Barrido 2	90 - 0, 0 - 40
Intervalos (%RH)	10
Número de barridos	2

000133

Velocidad de flujo ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)	200
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25
Estabilidad ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)	0.2
Tiempo de absorción (horas)	6 hora de tiempo fuera

5 La muestra se recuperó después de la terminación de la isoterma 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

15 La solubilidad acuosa se determinó al suspender una cantidad suficiente de compuesto en agua para dar una concentración final máxima de $\geq 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 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 20 referencia a una solución estándar de aproximadamente $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

000134

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 Solubilidad

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		
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		
Faase 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 en la

en un sistema en serie Agilent HP1100 equipado con un detector de configuración de diodo y usando software ChemStation vB.02.01-SR1.

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

Ejemplo 28. Determinación de Pureza Química por HPLC

Varias condiciones HPLC pueden usarse para determinar la pureza 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:

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

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

000136

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

5 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 purezas superiores pueden realizarse al optimizar los métodos descritos arriba.

10 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 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**.

15	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.
	Conc.: 260mg/30ml metanol, vol. Iny.: 1.5ml	

20 La siguiente separación SFC (condiciones enlistadas a continuación) proporciona separación adecuada de una mezcla de

000137

los diaestereómeros, *R_P*-4 y *S_P*-4.

5	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.

10

Análisis	<i>R_P</i> -4	4	<i>S_P</i> -4
RMN	de Diaestereoisómero	Mezcla 1:1	de Diaestereoisómero
protones	sencillo	diaestereoisómeros	sencillo
XRPD	Cristalino- diferente de <i>S_P</i> -4	Amorfo	Cristalino- diferente de <i>R_P</i> -4
DSC	Endotermia; fusión -136°C	Endotermia; 59°C	Endotermia; fusión -94°C
TGA	Sin pérdida de peso, descomposición >240°C	Sin pérdida de peso, descomposición >240°C	Sin pérdida de peso, descomposición >240°C
IR	Ver arriba	Ver arriba	Ver arriba
Solubilidad			
acuosa	1.58	6.11	5.65
(mg.ml ⁻¹)			
Pureza HPLC	96.9 %	99.6 %	99.5 %
15 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
	hasta RH al 90%		hasta RH al 60%

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

El compuesto 8 (isómero *S_P*), C₁₈H₂₁N₂PO₇, se cristaliza en

000'30

el grupo de espacio monociclico $P2_1$ (ausencia sistemáticas $0k0$: $k=\text{odd}$) con $a=5.3312(4)\text{\AA}$, $b=15.3388(8)\text{\AA}$, $c=23.7807(13)\text{\AA}$, $\beta=92.891(3)^\circ$, $V=1942.2(2)\text{\AA}^3$, $Z=4$, y $d_{\text{calc}}=1.397\text{ g/cm}^3$. Los datos de la intensidad de rayos X se colectaron en un detector de área Bruker APEXIII CCD que emplea radiación Mo- $K\alpha$ monocromatada de grafito ($\lambda=0.71073\text{ \AA}$) a una temperatura de $100(1)\text{K}$. 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

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

000139

(Rint = 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 F² 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 R₁ = 0.0847 y wR₂ = 0.1899 para 6173 reflexiones observadas para los cuales $F > 4\sigma(F)$ y R₁=0.0963 y wR₂=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 ₂ PO ₇
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

000140

	Constantes celulares:	
	a	5.3312(4) Å
	b	15.3388(8) Å
	c	23.7807(13) Å
	β	92.891(3) °
5	Volumen	1942.2(2) Å ³
	Z	4
	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
10	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
	Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0963, wR2 = 0.1963
	Parámetros de estructura absoluto	0.1(2)
15	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

000141

5 pozos o 25 µL de 2X 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
R _P -4	2.87
S _P -4	0.13

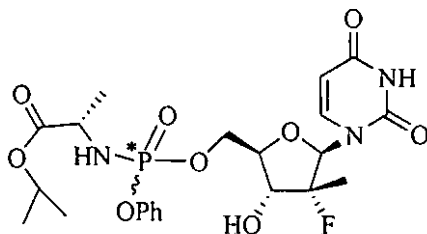
10 R_P-4 y S_P-4 se han mostrado para tener cobertura de genotipo amplia. Por ejemplo, ambos se han mostrado para ser activos con el virus de la hepatitis C, genotipos 1-4.

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.

000142

Reivindicaciones

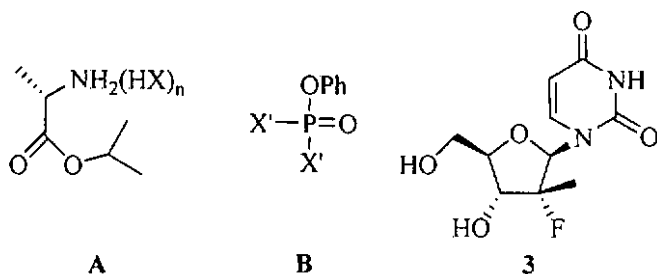
1. Un proceso para preparar el compuesto representado por la fórmula 4:



4

caracterizado porque P* representa un átomo de fósforo quiral, que comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-X'-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende **4**;



A

B

3

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

b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto de protección para obtener una segunda mezcla que comprende **4**; y

c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener **4**.

2. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque para A, X es cloruro y n es 1.

3. El proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque A es sustancialmente anhidro.

4. El proceso de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la base es N-metilimidazol.

000143

5. El proceso de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la relación molar de A-a-B-a-3 es alrededor de 1.6-a-1.3-a-1.

6. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto de protección es t-butil-
5 dimetil-silil-cloruro.

7. Una composición obtenida por el proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque la composición comprende 4 en una cantidad que es al menos
10 alrededor de 95% en peso de la composición.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la composición comprende 4 en una cantidad que es al menos alrededor de 97% en peso de la composición.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la composición comprende 4 en una cantidad que es al menos alrededor de 99% en peso de la composición.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la composición comprende 4 en una cantidad que es al menos alrededor de 99.9% en peso de la composición.

11. Un proceso para determinar la pureza química del compuesto 4 preparado por los procesos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-10,
15 caracterizado porque comprende:

analizar por HPLC el compuesto o la composición que comprende el compuesto.

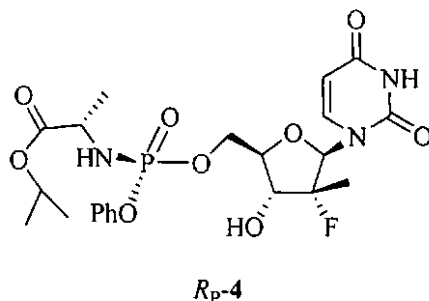
12. Un proceso para determinar la cristalinidad del compuesto 4 preparado por los procesos de conformidad con
20 cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-10,

000142

caracterizado porque comprende:

analizar por XRPD, cromatografía de rayos X, o microscopía óptica el compuesto o la composición que comprende el compuesto.

13. Un compuesto representado por la fórmula R_p-4



10 14. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el compuesto es un solvato, un hidrato, o anhidro.

15. El compuesto de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el compuesto es un hidrato y el hidrato comprende alrededor de 0.1 hasta alrededor de 5 mol H_2O .

16. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el compuesto es amorfo, tipo cristal, cristalino, o una combinación de los mismos.

17. El compuesto de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el compuesto es cristalino.

18. Una composición para el tratamiento y/o profilaxis de 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, caracterizada porque comprende un medio farmacéuticamente aceptable y el compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-17.

19. Un método para tratar un hospedero infectado con virus de hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, virus de dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de

000145

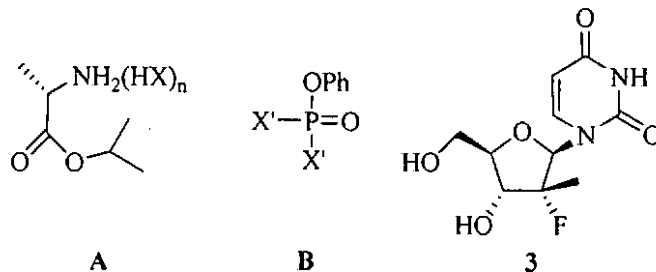
hepatitis A, virus de la diarrea vírica bovina o virus de encefalitis Japonesa caracterizado porque comprende administrar una cantidad efectiva del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-17.

20. Un método para tratar un hospedero infectado con virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, virus de dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea vírica bovina o virus de encefalitis Japonesa caracterizado porque comprende administrar una cantidad efectiva del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-17 en combinación con al menos un agente anti-vírico.

21. Un uso del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-17, el compuesto representado por la fórmula I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier condición que resulta de una infección por 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.

22. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-X'-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende R_p-4 ;



000146

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

b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto de protección para obtener una segunda mezcla que comprende R_F-4 ; y

c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener R_F-4 purificado.

23. El proceso de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque para A, X es cloruro y n es 1.

24. El proceso de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque A es sustancialmente anhidro.

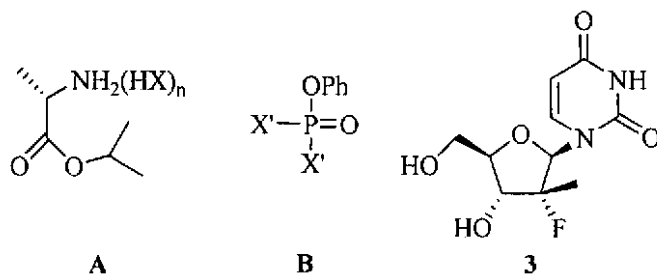
25. El proceso de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque la base es N-metilimidazol.

26. El proceso de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la relación molar de A-a-B-a-3 es alrededor de 1.6-a-1.3-a-1.

27. El proceso de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el compuesto de protección es t-butil-dimetil-silil-cloruro.

28. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-X'-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende R_F-4



en donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y

000147

X' es un halógeno;

b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto de protección para obtener una segunda mezcla;

5 c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener una tercera mezcla;

d) disolver o suspender la segunda mezcla o la tercera mezcla en un solvente;

e) opcionalmente después de sembrar con R_P-4 cristalino; y

10 f) agregar suficiente anti-solvente para obtener R_P-4 cristalino.

29. Una composición obtenida por el proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22-28, caracterizada porque la composición comprende R_P-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 95% en peso de la composición.

30. La composición de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la composición comprende R_P-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 97% en peso de la composición.

31. La composición de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la composición comprende R_P-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 99% en peso de la composición.

15 32. La composición de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la composición comprende R_P-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 99.9% en peso de la composición.

20 33. Un proceso para determinar la pureza química del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-17 o la composición de conformidad con cualquiera de las

000128

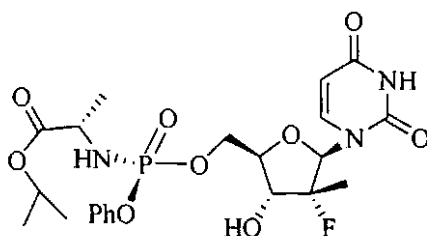
reivindicaciones 18 y 29-32, caracterizado porque comprende:

analizar por HPLC el compuesto o la composición que comprende el compuesto.

34. Un proceso para determinar la cristalinidad del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-17 o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 y 29-32, caracterizado porque comprende:

analizar por XRPD, cromatografía de rayos X o microscopía óptica el compuesto o la composición que comprende el compuesto.

35. Un compuesto, caracterizado porque es representado por la fórmula S_p-4



S_p-4

36. El compuesto de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque el compuesto es un solvato, un hidrato, o anhidro.

37. El compuesto de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque el compuesto es un hidrato y el hidrato comprende alrededor de 0.1 hasta alrededor de 5 mol H_2O .

38. El compuesto de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque el compuesto es amorfo, tipo cristal, cristalino, o combinación de los mismos.

39. El compuesto de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el compuesto es cristalino.

40. Una composición para el tratamiento y/o profilaxis de virus de hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, virus de dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de

000149

hepatitis A, virus de la diarrea vírica bovina o virus de encefalitis Japonesa, caracterizada porque comprende un medio farmacéuticamente aceptable y el compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35-39.

5 41. Un método para tratar un hospedero infectado con 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 caracterizado porque comprende administrar una cantidad efectiva del compuesto de conformidad con cualquiera
10 de las reivindicaciones 35-39.

42. Un método para tratar un hospedero infectado con 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 caracterizado porque comprende administrar una cantidad efectiva del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35-39 en combinación con al menos uno agente anti-vírico.

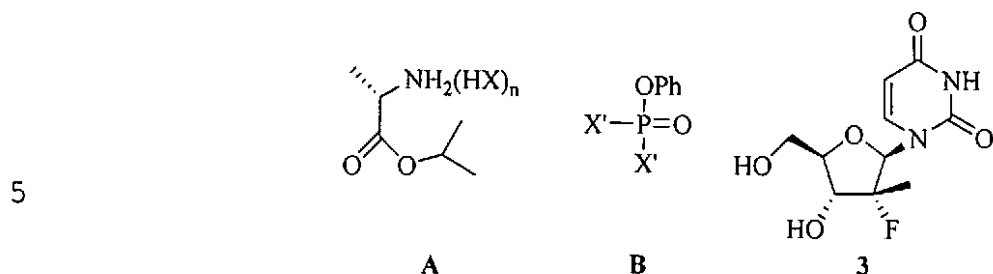
43. Un uso del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35-39, el compuesto representado por la fórmula I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier condición que resulta de una infección por virus de
15 hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de 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.

44. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad
20 con la reivindicación 35, caracterizado que comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-X'-

000150

fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende S_p-4 ;



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

10 b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto de protección para obtener una segunda mezcla que comprende S_p-4 ; y

c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener S_p-4 purificado.

45. El proceso de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque para A, X es cloruro y n es 1.

46. El proceso de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado porque A es sustancialmente anhidro.

47. El proceso de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque la base es N-metilimidazol.

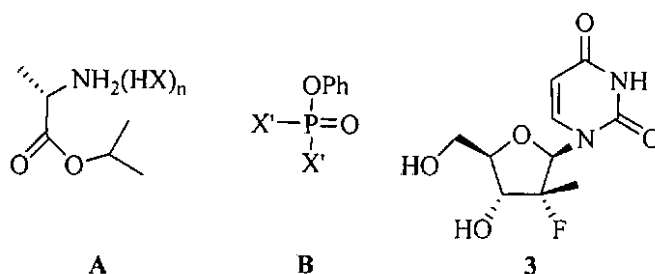
48. El proceso de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado porque la relación molar de A-a-B-a-3 es alrededor de 1.6-a-1.3-a-1.

15 49. El proceso de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque el compuesto de protección es t-butil-dimetil-silil-cloruro.

50. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque comprende:

20 a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-X'-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una

000151



5 base para obtener una primera mezcla que comprende $S_p\text{-4}$
 en donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y
 X' es un halógeno;

b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto de
 protección para obtener una segunda mezcla;

10 c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización,
 cromatografía, o extracción con objeto de obtener $S_p\text{-4}$
 purificado;

d) disolver o suspender la segunda mezcla o el $S_p\text{-4}$
 purificado en un solvente después de sembrar con $S_p\text{-4}$ cristalino
 en alrededor de temperatura ambiente;

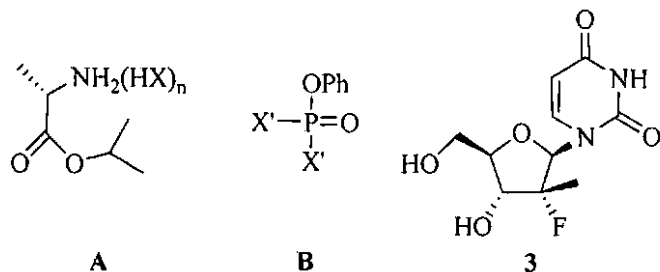
f) colectar un primer sólido la mayoría del cual comprende
 $S_p\text{-4}$;

g) disolver o suspender el primer sólido en un solvente en
 su temperatura de reflujo; y

h) enfriar o agregar un anti-solvente para obtener un
 segundo sólido.

51. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad
 15 con la reivindicación 39, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-X'-
 fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una
 base para obtener una primera mezcla que comprende $S_p\text{-4}$



000152

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

b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto de protección para obtener una segunda mezcla;

5 c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener S_p-4 purificado;

10 d) disolver o suspender la segunda mezcla o el 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;

e) 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;

f) disolver o suspender el primer sólido usando un segundo solvente a fin de obtener una tercera composición;

g) agregar cristales de siembra de S_p-4 a la tercera composición;

h) coleccionar un segundo sólido;

15 i) disolver o suspender el segundo sólido en un tercer solvente, opcionalmente calentado a la temperatura de reflujo del tercer solvente para obtener una cuarta composición, y, si es necesario, y

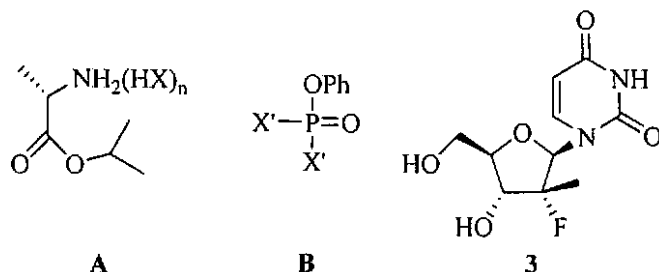
j) enfriar la cuarta composición para obtener un tercer sólido que comprende S_p-4 la cual se colecta por filtración.

20 52. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque comprende:

000153

a) hacer reaccionar un isopropil-alanato, **A**, un di-X'-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y una base para obtener una primera mezcla que comprende S_p-4

5



10

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

b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto de protección para obtener una segunda mezcla;

c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía, o extracción con objeto de obtener una tercera mezcla;

d) agregar gel de sílice a la segunda mezcla o la tercera mezcla seguido por evaporación de solvente para proporcionar una mezcla espesa seca;

e) agitar la mezcla espesa seca en una primera combinación solvente/anti-solvente para obtener una primera mezcla espesa húmeda;

15

f) decantar la primera combinación solvente/anti-solvente de la primera mezcla espesa húmeda para obtener una segunda mezcla espesa húmeda y una primera composición;

g) agregar a la segunda mezcla espesa húmeda una segunda combinación solvente/anti-solvente seguido por agitación;

20

h) decantar la segunda combinación solvente/anti-solvente de la segunda mezcla espesa húmeda para obtener una tercera mezcla espesa húmeda y una segunda composición

000154

i) opcionalmente repetir las etapas g)-h) en la tercera mezcla espesa húmeda o mezclas espesas húmedas adicionales;

j) evaporar el solvente de la segunda composición, y opcionalmente cualquier composición adicional obtenida de la etapa opcional i) para obtener un primer sólido;

k) disolver o suspender el primer sólido en una solución que contiene un tercer solvente y opcionalmente un cuarto solvente para obtener una tercera composición;

l) opcionalmente agregar cristales de siembra de S_p-4 a la tercera composición;

m) obtener de la tercera composición un segundo sólido que comprende S_p-4 ; y

n) opcionalmente recrystalizar el segundo sólido usando un tercer solvente para obtener un tercer sólido que comprende S_p-4 .

53. Una composición obtenida por el proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 44-52, caracterizada porque la composición comprende S_p-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 95% en peso de la composición.

54. La composición de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la composición comprende S_p-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 97% en peso de la composición.

55. La composición de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la composición comprende S_p-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 99% en peso de la composición.

56. La composición de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la composición comprende S_p-4 en una cantidad que es al menos alrededor de 99.9% en peso de la composición.

000155

57. Un proceso para determinar la pureza química del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35-39 o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40 y 53-56, caracterizado porque comprende:

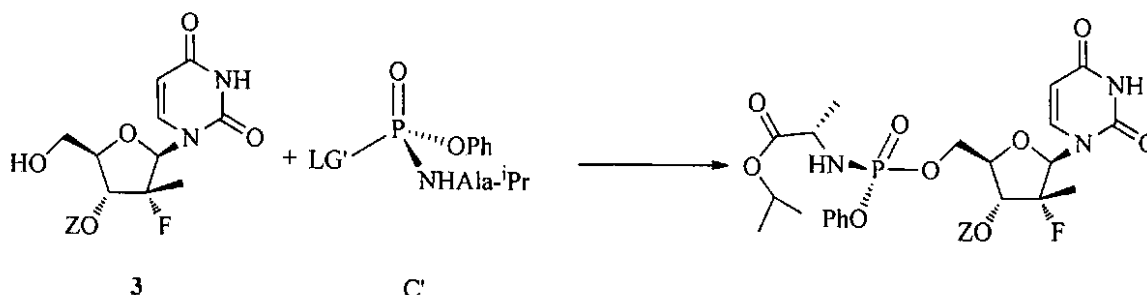
5 analizar por HPLC el compuesto o la composición que comprende el compuesto.

58. Un proceso para determinar la cristalinidad del compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35-39 o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40 y 53-56, caracterizado porque comprende:

10 analizar por XRPD, cromatografía de rayos X, o microscopía óptica el compuesto o la composición que comprende el compuesto.

59. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato, **C'**, con 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y un reactivo básico para obtener **R_P-4** protegido o desprotegido



15 en donde Z es un grupo protector o hidrógeno y LG' es un grupo de partida.

60. El proceso de conformidad con la reivindicación 59, que además comprende opcionalmente **R_P-4** protegido de desprotección y someter **R_P-4** a cromatografía, extracción, o cristalización con objeto de obtener purificado **R_P-4**.

20 61. El proceso de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque además comprende

000156

1) hacer reaccionar $(LG')P(O)(LG)_2$, en donde LG, independiente de LG', es un grupo de partida, con

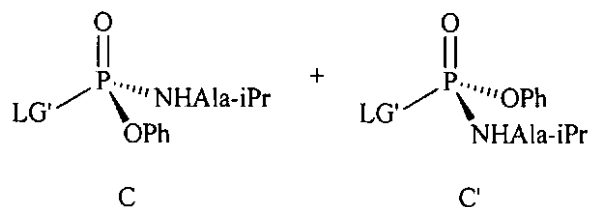
(i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(Ala-iPr)$ con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,

(ii) fenol y una primera base para obtener $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ con isopropil-alanato y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, o

(iii) combinar isopropil-alanato, fenol, y al menos una base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**; o

2) hacer reaccionar $(PhO)P(O)(LG)_2$, en donde LG', independiente de LG, es un grupo de partida, con

(i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ seguido por la reacción $(PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr)$ con un grupo de partida precursor y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,

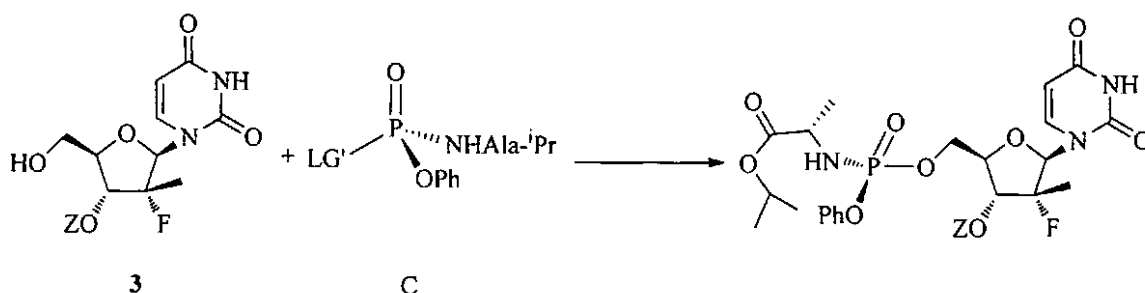


y

someter la mezcla a extracción, cromatografía, o cristalización para obtener **C'**.

62. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato, **C**, con 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, y un reactivo básico para obtener **S_P-4** protegido o desprotegido



en donde Z es un grupo protector o hidrógeno y LG' es un grupo de partida.

63. El proceso de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque además comprende opcionalmente R_p -4 protegido de desprotección y someter el S_p -4 obtenido a cromatografía, extracción, o cristalización con objeto de obtener S_p -4 purificado.

64. El proceso de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado además porque comprende

1) hacer 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 $(LG')P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C',

(ii) fenol y una primera base para obtener $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ seguido por la reacción $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ con isopropil-alanato y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C', o

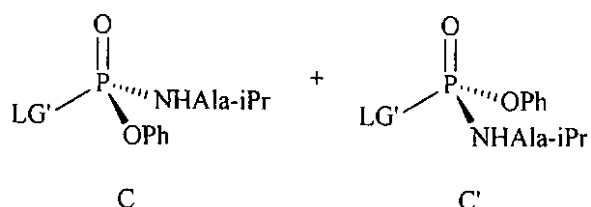
(iii) combinar isopropil-alanato, fenol, y al menos una base para obtener una mezcla que comprende C y C'; o

2) hacer reaccionar $(PhO)P(O)(LG)_2$, en donde LG', independiente de LG, es un grupo de partida, con

(i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(PhO)P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ seguido por la reacción $(PhO)P(O)(LG)(Ala-^iPr)$ con un grupo de partida precursor y una segunda base para

000158

obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,

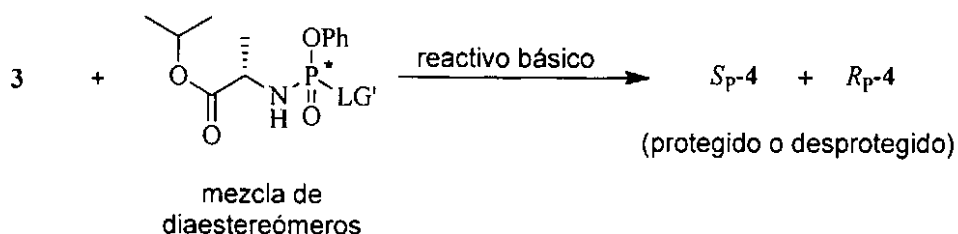


y

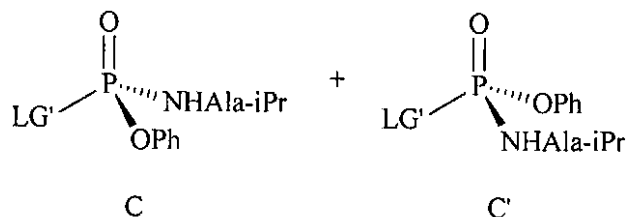
someter la mezcla a extracción, cromatografía, o cristalización para obtener **C**.

65. Un proceso para preparar el compuesto de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con 3'-O-protegido o **3** desprotegido, 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.

66. El proceso de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'** es mayor que o igual hasta

. 000159

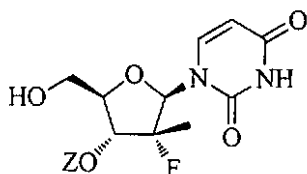
alrededor de 1:1.

67. El proceso de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'**; es mayor que alrededor de 1:1.

68. El proceso de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque 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.

69. El proceso de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque 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.

70. Un compuesto seleccionado de entre **3a**, **3b**, **3c**, y **3d**



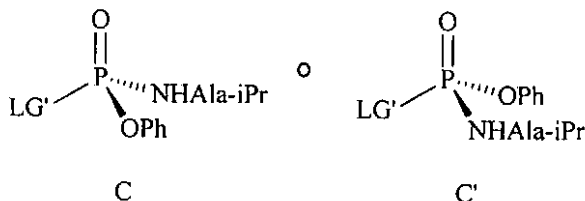
3a: Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃

3b: Z = -C(O)OCH₂Ph

3c: Z = -Si(Me)₂'Bu

3d: Z = -Si('Pr)₂OSi('Pr)₂OH

71. Un compuesto representado por las siguientes estructuras



. 000160

caracterizado porque LG' es un grupo de partida.

72. El compuesto de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque LG' es tosilato, canforsulfonato, un arilóxido, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo de retiro de electrón.

5 73. El compuesto de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque LG' es p-nitrofenóxido, p-clorofenóxido, o-clorofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, o pentafluorofenóxido.

74. El compuesto de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque LG' es p-nitrofenóxido.

10 75. El compuesto de conformidad con la reivindicación 74, en forma cristalina.

76. Un proceso para preparar C o C' de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque comprende:

1) hacer reaccionar (LG')P(O)(LG)₂, con

(i) isopropil-alanato y una primera base para obtener (LG')P(O)(LG)(Ala-ⁱPr) seguido por la reacción (LG')P(O)(LG)(Ala-ⁱPr) con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C',

(ii) fenol y una primera base para obtener (LG')P(O)(LG)(OPh) seguido por la reacción (LG')P(O)(LG)(OPh) con isopropil-alanato y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C', o

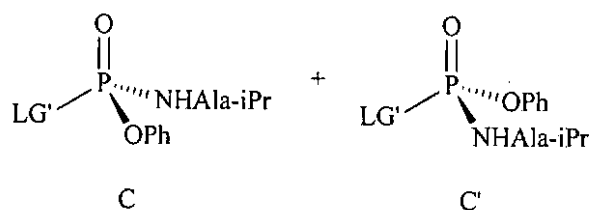
15 (iii) combinar isopropil-alanato, fenol, y al menos una base para obtener una mezcla que comprende C y C'; o

2) hacer reaccionar (PhO)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 (PhO)P(O)(LG)(Ala-ⁱPr) seguido por la reacción (PhO)P(O)(LG)(Ala-ⁱPr) con un grupo de partida precursor y una segunda base para

000161

obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,



5

y

someter la mezcla a extracción, cromatografía, o cristalización para obtener **C** o **C'**.

10

77. El proceso de conformidad con la reivindicación 76, caracterizado porque comprende someter la mezcla a cristalización, tal proceso además comprende:

3) disolver o suspender la mezcla en un solvente y

4) agregar cristales de siembra de **C** o **C'**.

78. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 13, o la reivindicación 35, caracterizado porque tal compuesto se etiqueta isotópicamente.

15

20

25

000162

FIG. 1

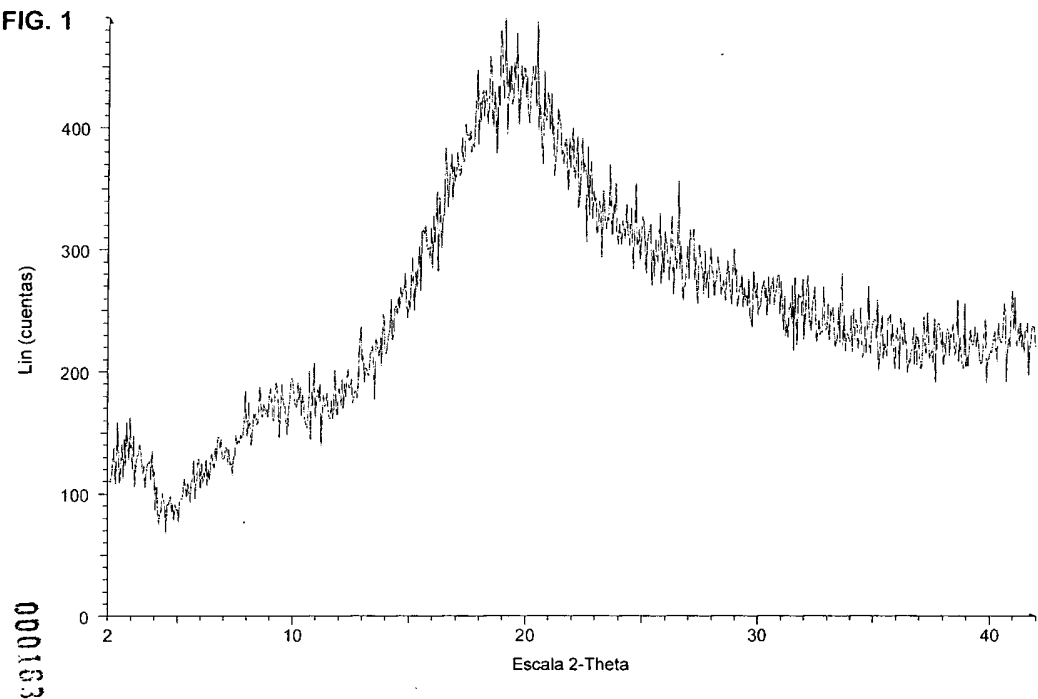
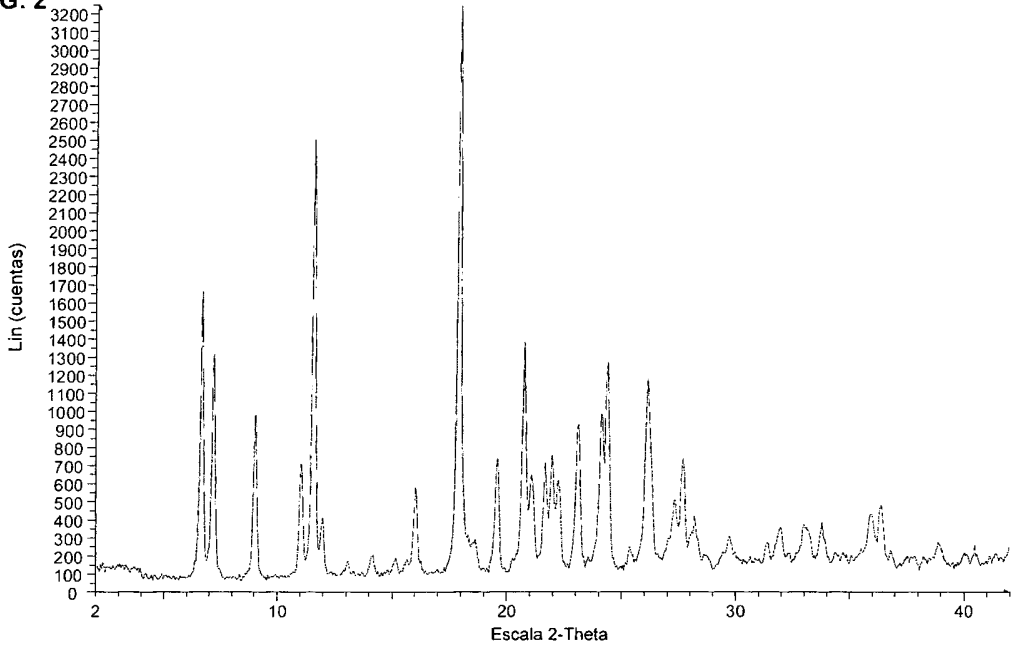


FIG. 2



000164

FIG. 3

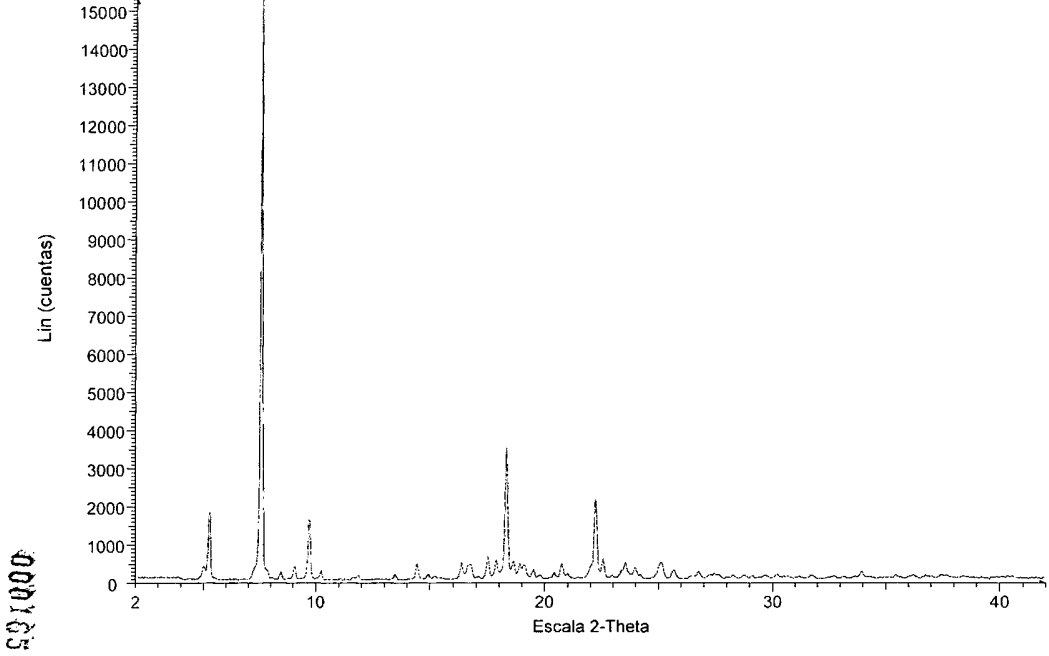
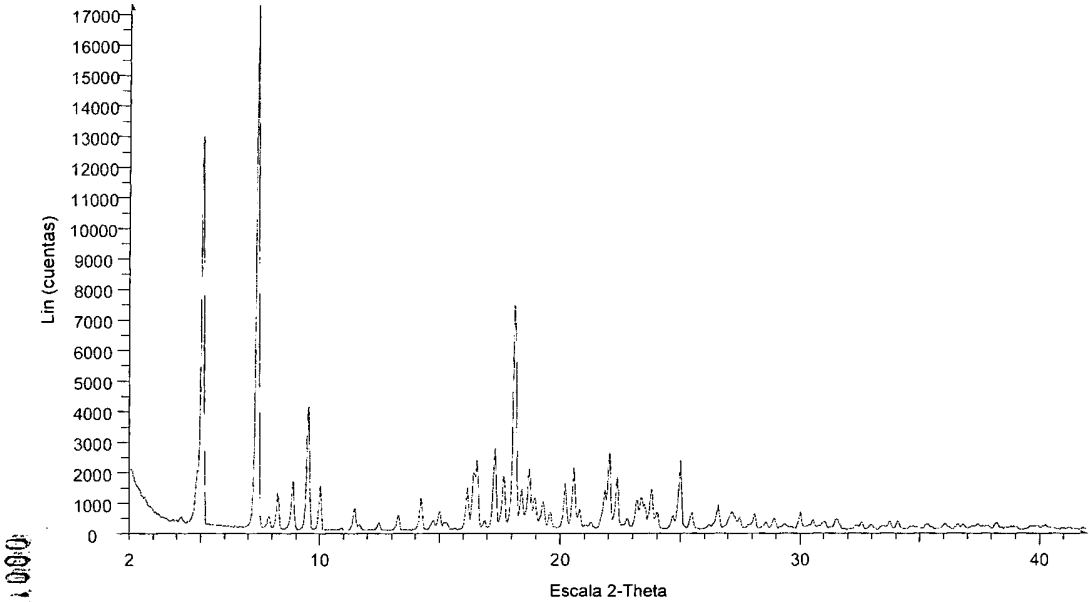
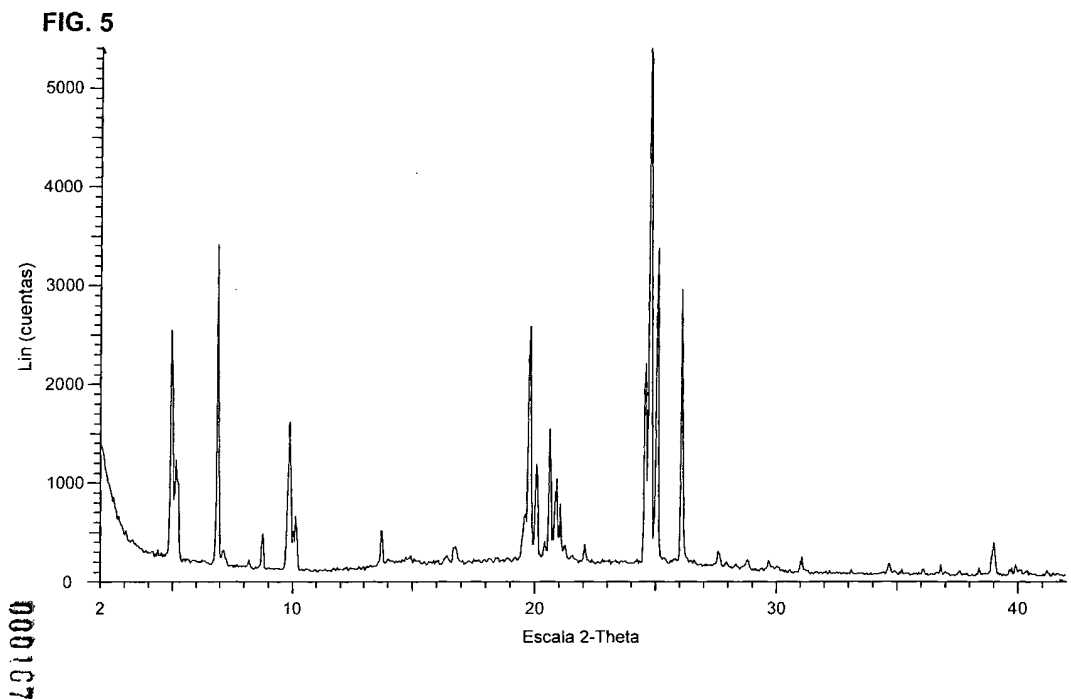
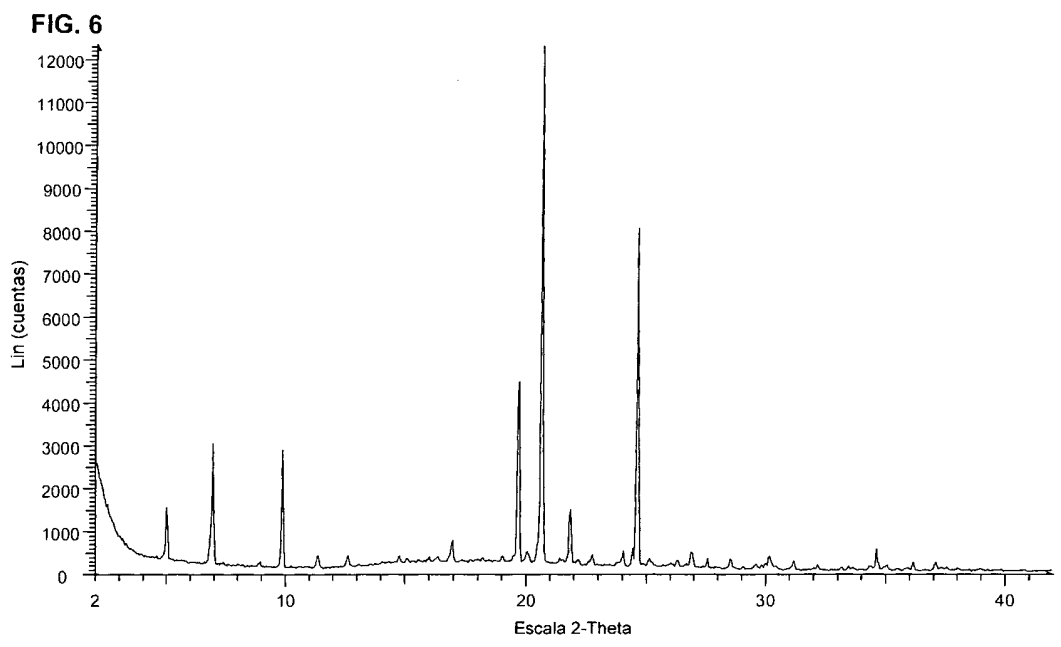


FIG. 4







6/21

391000
000168

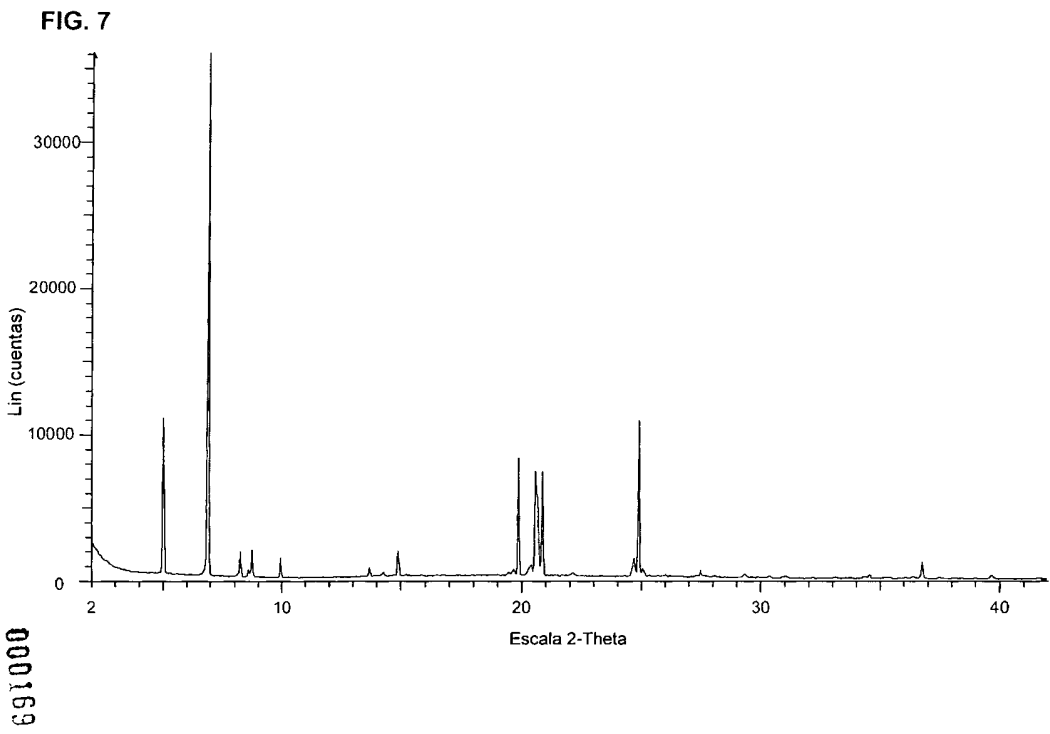
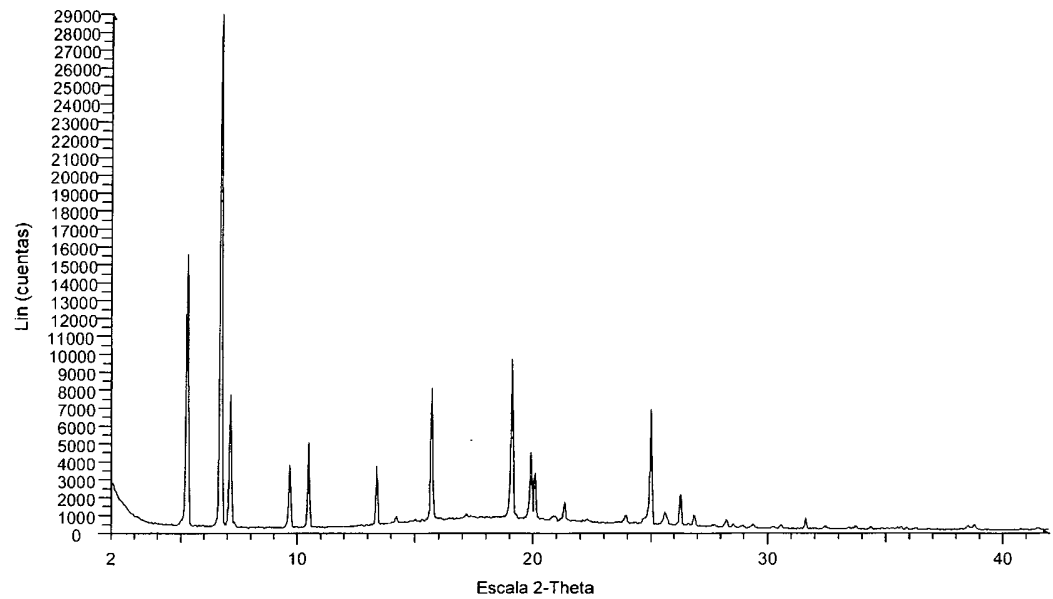
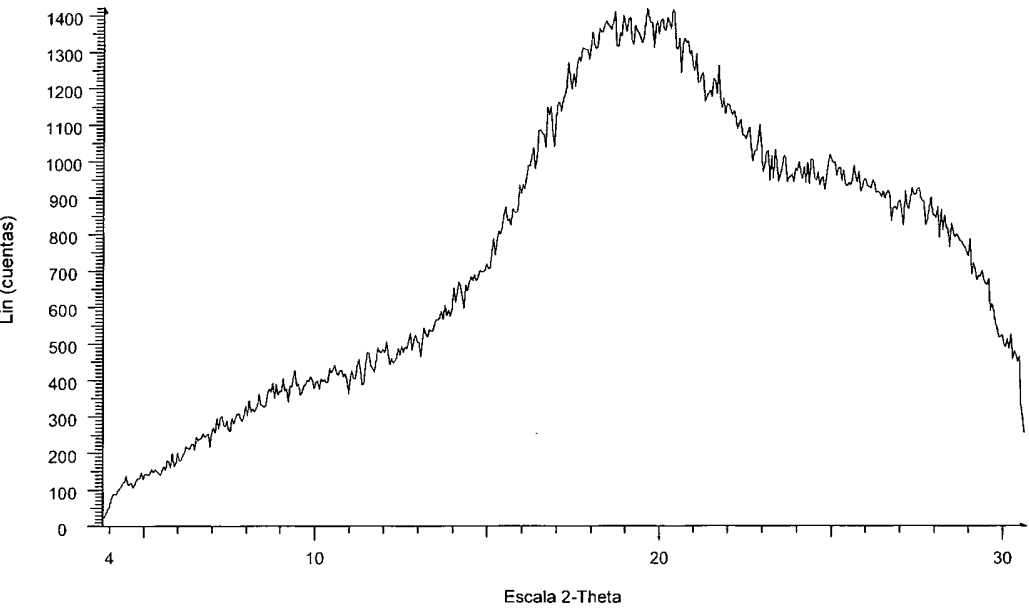


FIG. 8



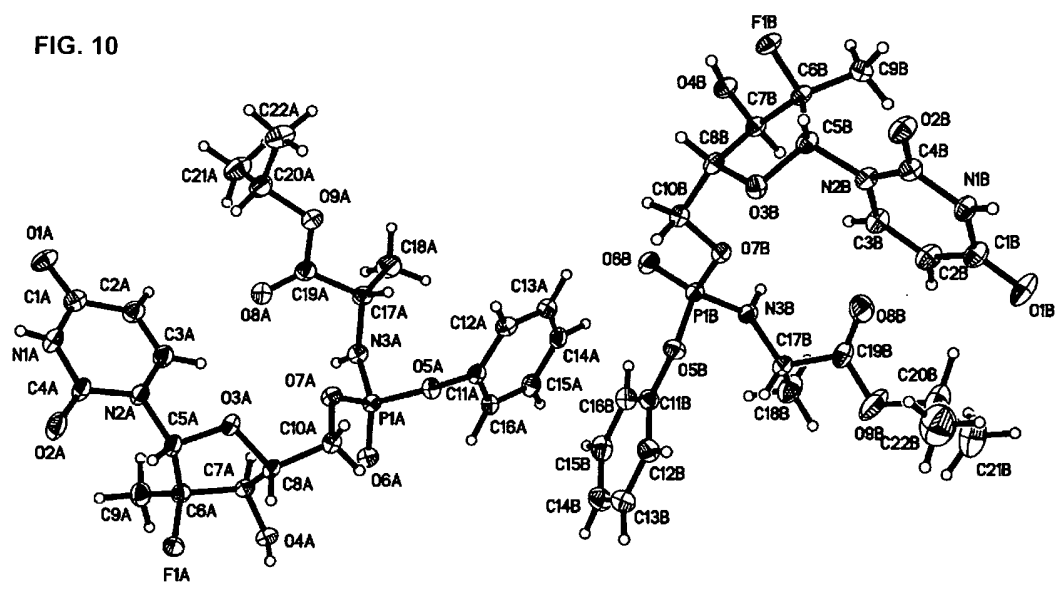
000170

FIG. 9



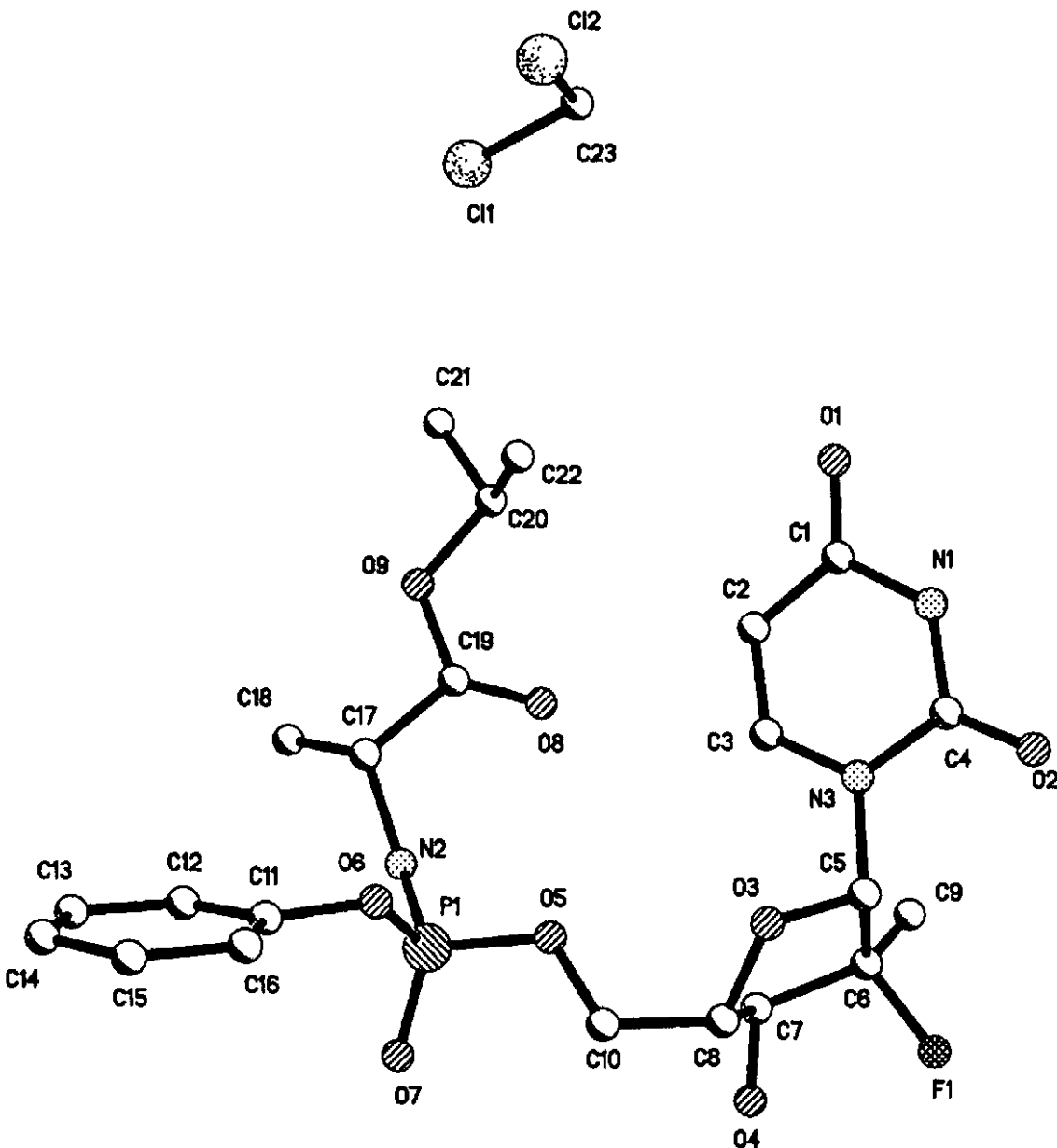
000171

FIG. 10



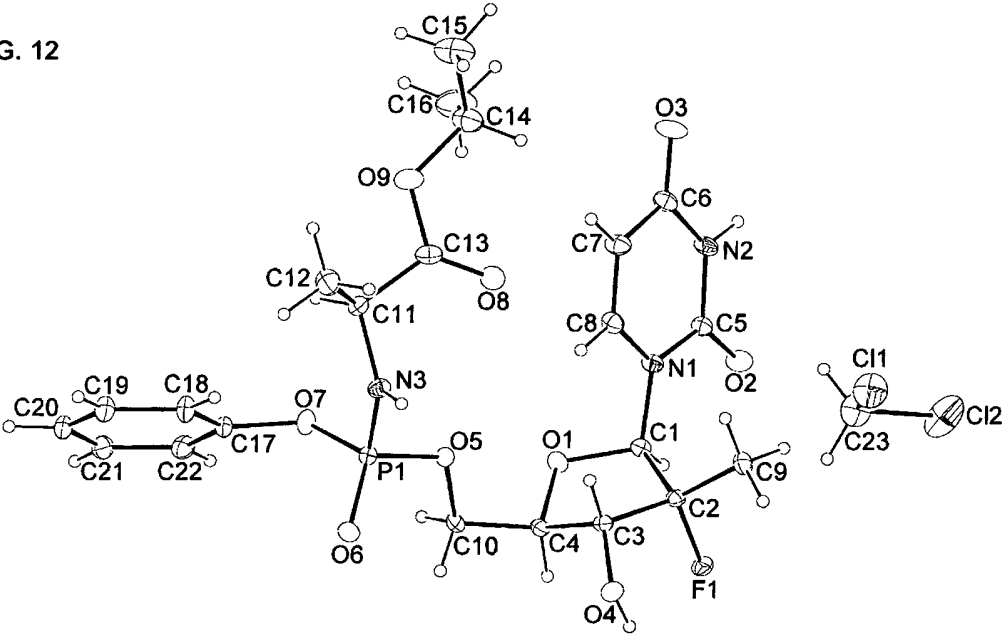
000172

FIG. 11



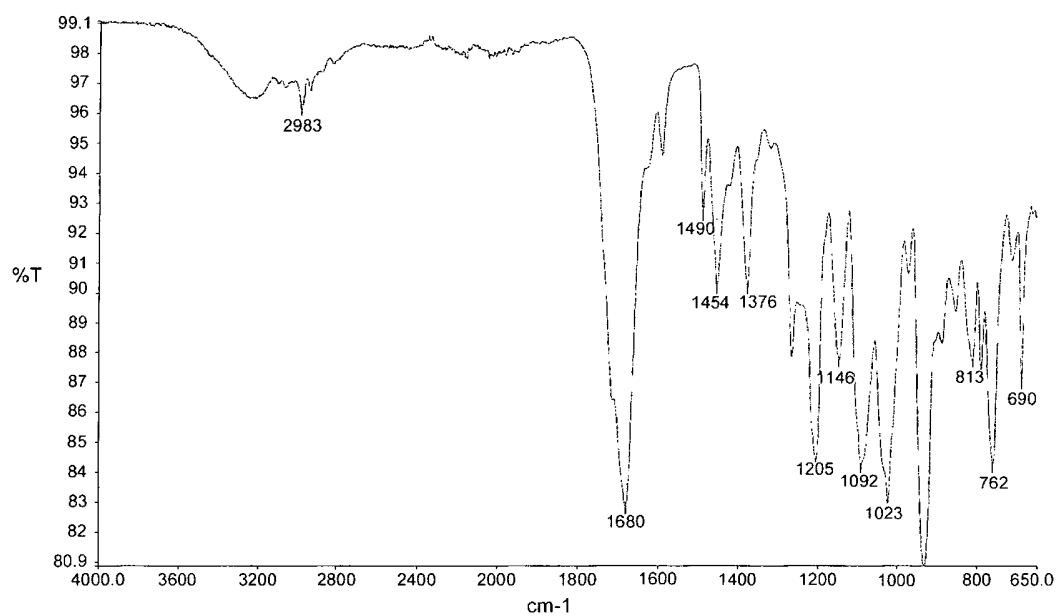
000173

FIG. 12



000174

FIG. 14



14/21

000176

FIG. 15

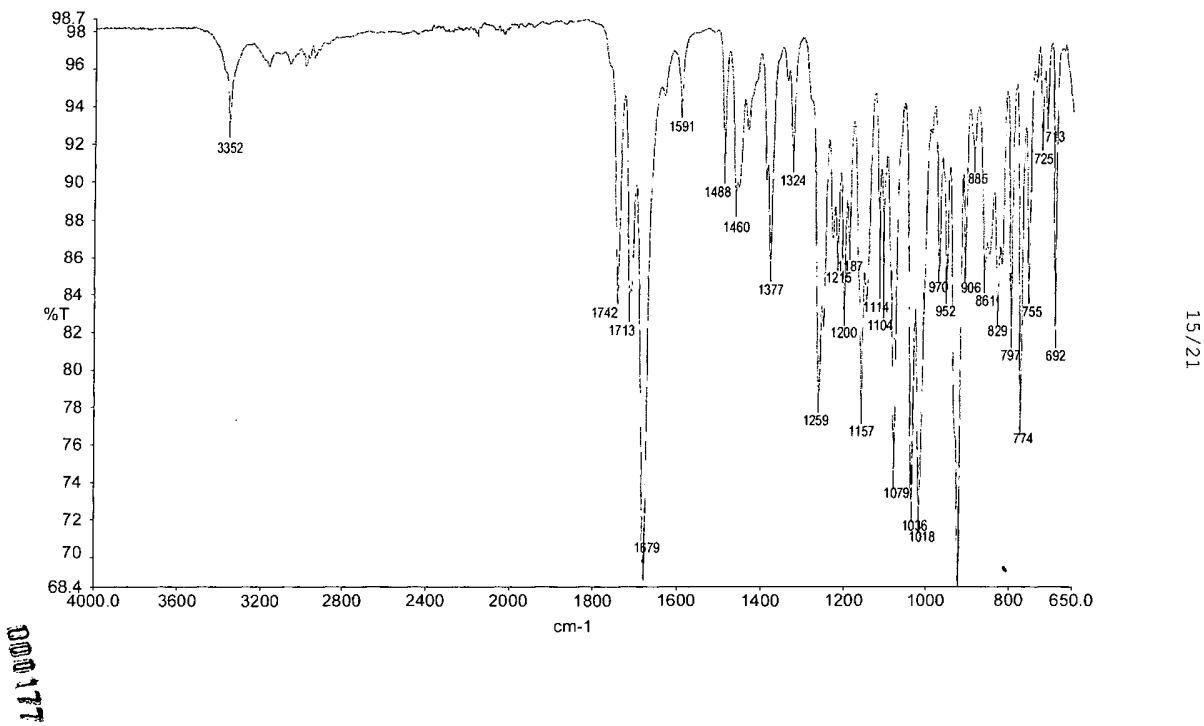
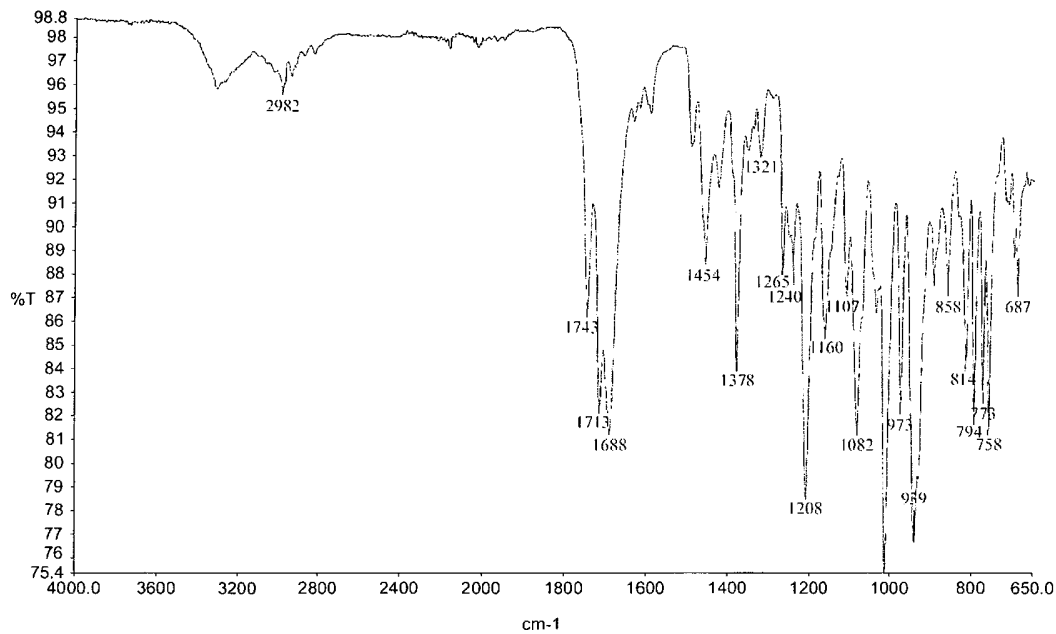


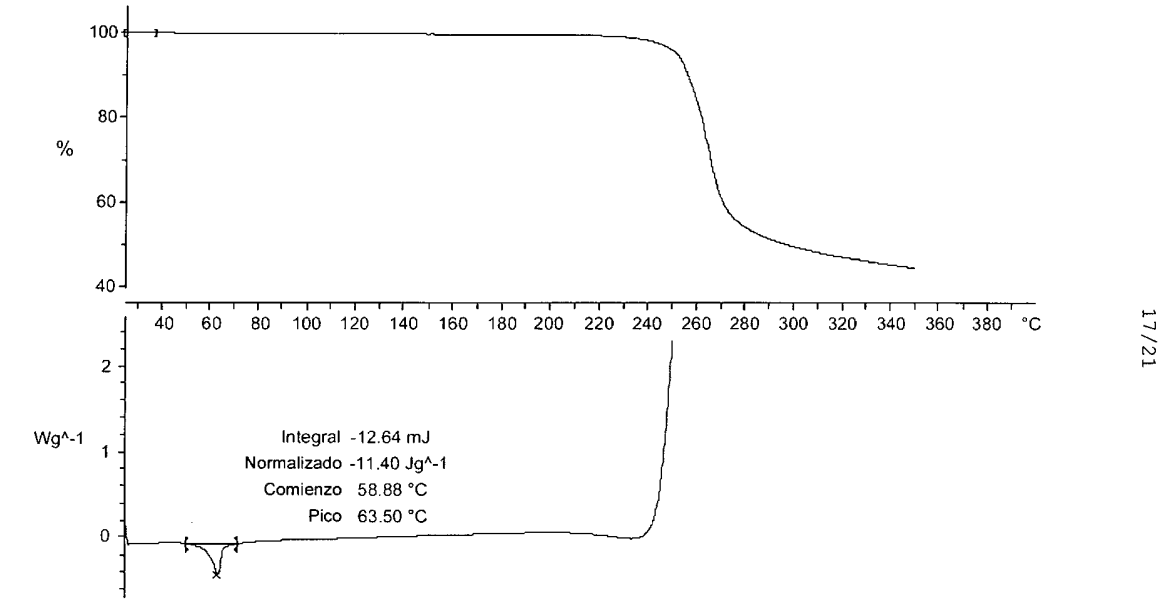
FIG. 16



16/21

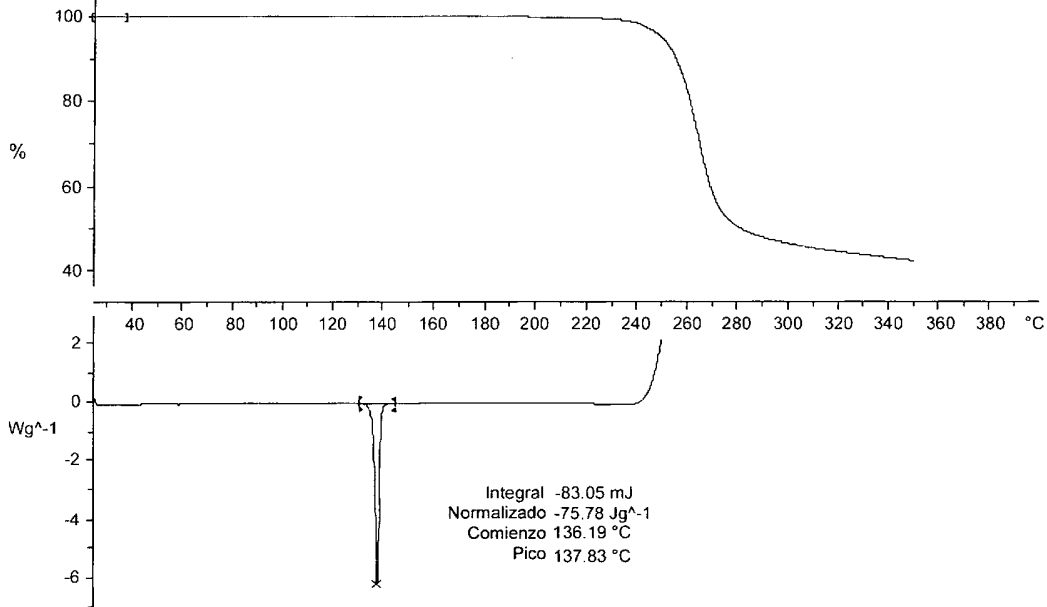
000178

FIG. 17



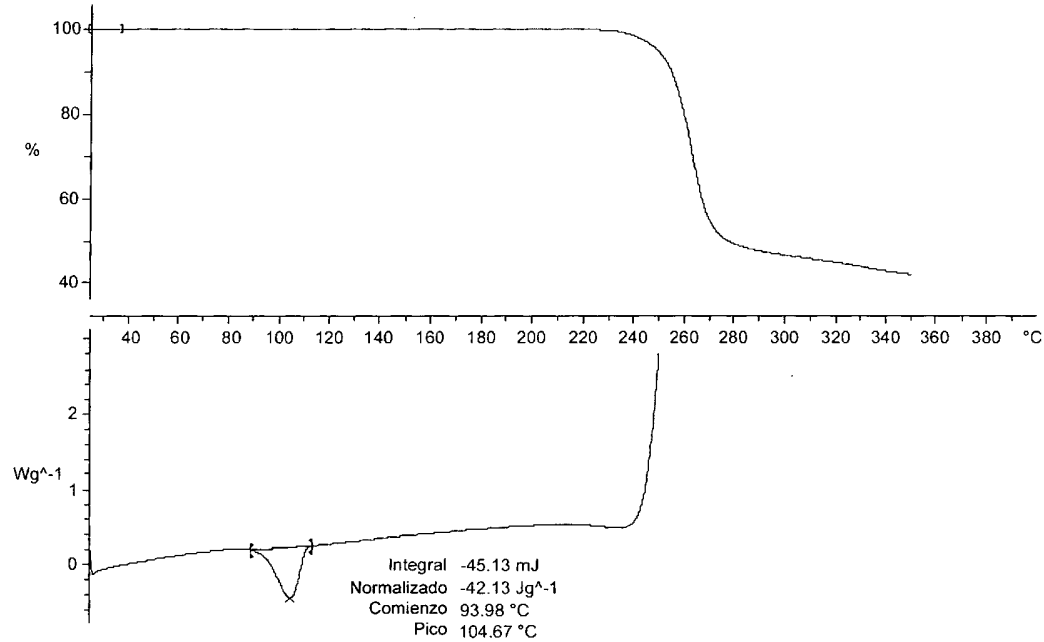
000179

FIG.18



000180

FIG. 19



000181

FIG. 20A

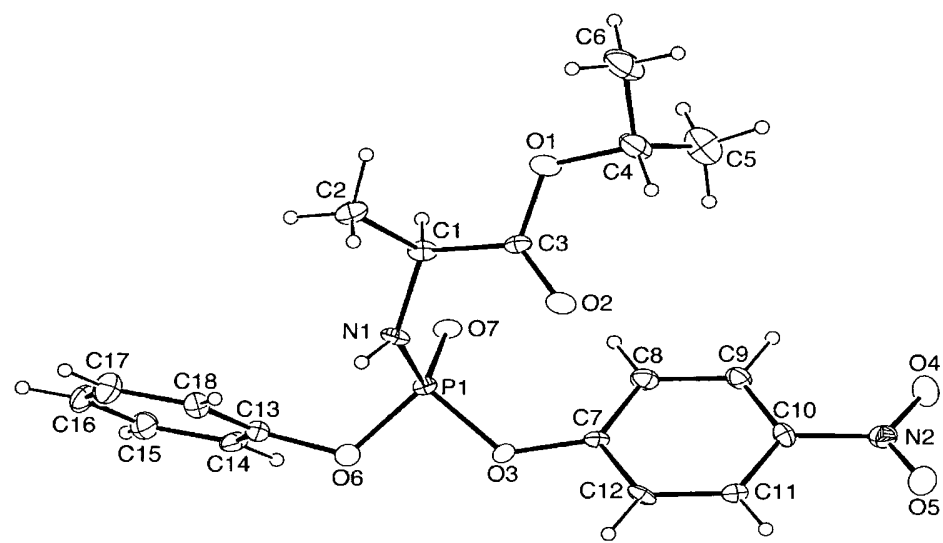
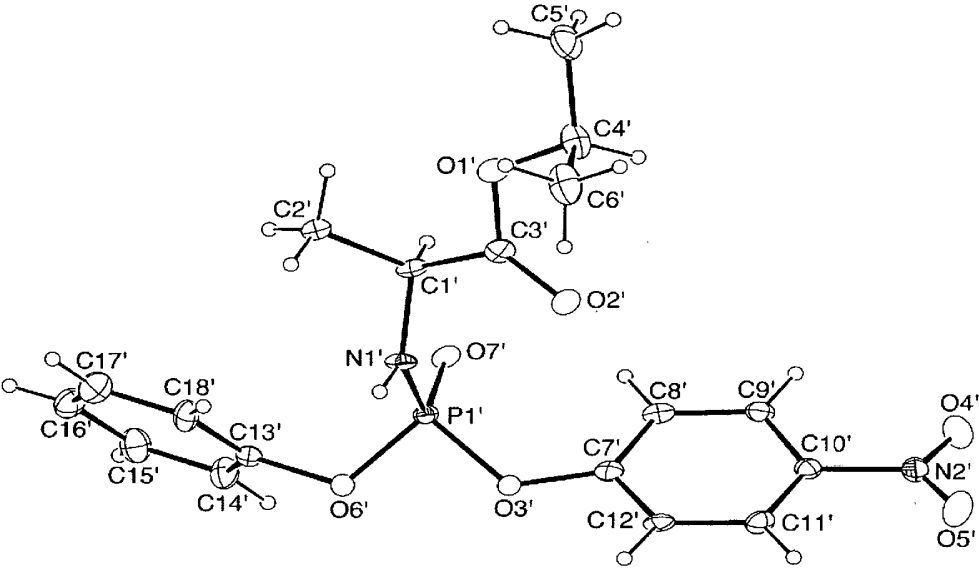


FIG. 20B



000183

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 60137.45WOUI	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2010/035641	International filing date (day/month/year) 20/05/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 20/05/2009
Applicant PHARMASSET, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

N- [(2' R) -2' -DEOXY-2' -FLUORO-2' -METHYL-P-PHENYL-5' -URIDYL] -L-ALANINE
1-METHYLETHYL ESTER AND PROCESS FOR ITS PRODUCTION

5. With regard to the abstract,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

000184

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

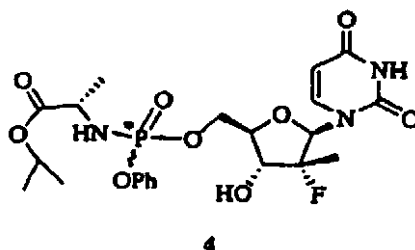
International application No.

PCT/US2010/035641

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

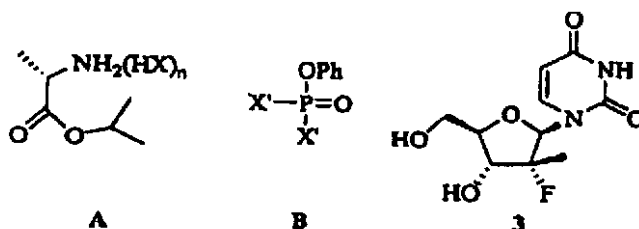
Disclosed herein are nucleoside phosphoramidates of formula 4 and their use as agents for treating viral diseases. These compounds are inhibitors of RNA-dependent 5' RNA viral replication and are useful as inhibitors of HCV NSSB polymerase, as inhibitors of HCV replication and for treatment of hepatitis C infection in mammals.

Disclosed is also a process for preparing compound represented by formula 4:



wherein P* represents a chiral phosphorus atom, which comprises:

a) reacting an isopropyl-alanate, A, a di-X'-phenylphosphate, B, 2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methyluridine, 3, and a base to obtain a first mixture comprising 4;



wherein X is a conjugate base of an acid, n is 0 or 1, and X' is a halogen

b) reacting the first mixture with a protecting compound to obtain a second mixture comprising 4; and

c) optionally subjecting the second mixture to crystallization, chromatography, or extraction in order to obtain 4.

000185

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/035641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07H19/10 C07H19/073 A61K31/7072 A61P31/14
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/121634 A2 (PHARMASSET INC [US]; SOFIA MICHAEL J [US]; DU JINFU [US]; WANG PEIYUAN) 9 October 2008 (2008-10-09) cited in the application	18-21
A	page 672 - page 673; examples 1-3 page 692 - page 693; example 81 page 695; compound 25 claim 2; compound 25 -----	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2010

Date of mailing of the international search report

28/09/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mezzato, Stefano

000186

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/035641

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-6, 18-21
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

000187

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6

A process for preparing compound 4

2. claims: 7-10

A composition comprising compound 4

3. claim: 11

A process for determining the chemical purity of compound 4, which comprises analyzing by HPLC the compound or the composition comprising the compound

4. claim: 12

A process for determining the crystallinity of compound 4, which comprises analyzing by XRPD, X-ray crystallography, or optical microscopy the compound or the composition comprising the compound

5. claims: 13-17

A compound represented by formula Rp-4

6. claim: 18

A composition for the treatment and/or prophylaxis of hepatitis C virus comprising a pharmaceutically acceptable medium and the compound of any one of claims 13-17

7. claims: 19-21

Use of the compound of any one of claims 13-17 in the manufacture of a medicament

8. claims: 22-28

A process for preparing the compound of claims 13 and 17

9. claims: 29-32

A composition comprising Rp-4

000188

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. claim: 33

A process for determining the chemical purity of the compound of any one of claims 13-17, which comprises analyzing by HPLC the compound or the composition comprising the compound

11. claim: 34

A process for determining the crystallinity of the compound of any one of claims 13-17 which comprises analyzing by XRPD, X-ray crystallography, or optical microscopy the compound or the composition comprising the compound

12. claims: 35-39

A compound represented by formula Sp-4

13. claim: 40

A composition for the treatment and/or prophylaxis of hepatitis C virus comprising a pharmaceutically acceptable medium and the compound of any one of claims 35-39

14. claims: 41-43

Use of the compound of any one of claims 35-39 in the manufacture of a medicament

15. claims: 44-52

A process for preparing the compound of claims 35 and 39

16. claims: 53-56

A composition comprising Sp-4

17. claim: 57

A process for determining the chemical purity of the compound of any one of claims 35-39, which comprises analyzing by HPLC the compound or the composition comprising the compound

18. claim: 58

000189

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A process for determining the crystallinity of the compound of any one of claims 35-39 which comprises analyzing by XRPD, X-ray crystallography, or optical microscopy the compound or the composition comprising the compound

19. claims: 59-70

A process for preparing the compounds of claim 13 or 35, and intermediate 3 used in such process

20. claims: 71-77

compounds C/C' and related process

21. claim: 78

A compound of claim 13 or of claim 35, wherein said compound is isotopically labeled

000190

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/035641

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008121634 A2	09-10-2008	AR 066898 A1	23-09-2009
		AU 2008232827 A1	09-10-2008
		CA 2682230 A1	09-10-2008
		EP 2203462 A2	07-07-2010
		KR 20100016041 A	12-02-2010
		US 2010016251 A1	21-01-2010

000191

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 November 2010 (25.11.2010)



(10) International Publication Number
WO 2010/135569 A1

(51) International Patent Classification:
C07H 19/10 (2006.01) A61K 31/7072 (2006.01)
C07H 19/073 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)

(21) International Application Number:

[PCT/US2010/035641]

(22) International Filing Date:

20 May 2010 (20.05.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/179,923 20 May 2009 (20.05.2009) US
61/319,513 31 March 2010 (31.03.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PHARMASSET, INC. [US/US]; 303A College Road East, Princeton, NJ 08540 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ROSS, Bruce, S. [US/US]; 8 Keppel Road, Plainsboro, NJ 08536 (US). SOFIA, Michael, Joseph [US/US]; 3066 Antler Drive, Doylestown, PA 18902 (US). PAMULAPATI, Ganapati, Reddy [IN/US]; 4608 Hunters Glen Drive, Plainsboro, NJ 08536 (US). RACHAKONDA, Suguna [IN/US]; 144 Burnet Crescent, Robbinsville, NJ 08691 (US). ZHANG, Hai-ren [US/US]; 8680 Manahan Drive,

Ellicott City, MD 21043 (US). CHUN, Byoung-kwon [KR/US]; 135 Heritage Street, Robbinsville, NJ 08691 (US). WANG, Pelyuan [CN/US]; 20 Radburn Road, Glen Rock, NJ 07452 (US).

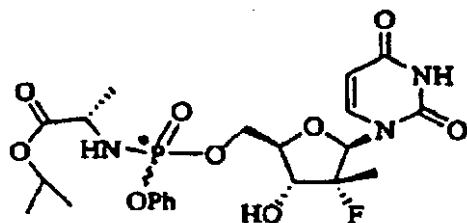
(74) Agent: KOWALCHYK, Katherine, M.; Merchant & Gould P.C., P.O. Box 2903, Minneapolis, MN 55402-0903 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

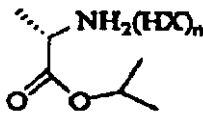
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,

[Continued on next page]

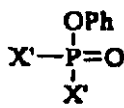
(54) Title: N- [(2'-R) -2'-DEOXY-2'-FLUORO-2'-METHYL-P-PHENYL-5'-URIDYL] -L-ALANINE 1-METHYLETHYL ESTER AND PROCESS FOR ITS PRODUCTION



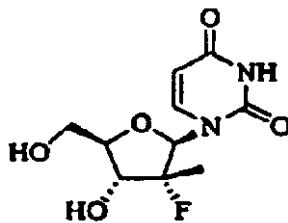
(4)



(A)



(B)



(3)

(57) Abstract: Disclosed herein are nucleoside phosphoramidates of formula 4 and their use as agents for treating viral diseases. These compounds are inhibitors of RNA-dependent 5' RNA viral replication and are useful as inhibitors of HCV NS5B polymerase, as inhibitors of HCV replication and for treatment of hepatitis C infection in mammals. Disclosed is also a process for preparing compound represented by formula 4: (Formula 4) wherein P* represents a chiral phosphorus atom, which comprises: a) reacting an isopropylalanate, (Formula A), a di-X'-phenylphosphate, (Formula B), 2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methyluridine, (Formula 3), and a base to obtain a first mixture comprising 4; wherein X is a conjugate base of an acid, n is 0 or 1, and X' is a halogen, b) reacting the first mixture with a protecting compound to obtain a second mixture comprising 4; and c) optionally subjecting the second mixture to crystallization, chromatography or extraction in order to obtain 4.

WO 2010/135569 A1



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

000193



No. 11-158583- -00000-0000

Fecha: 2011-11-21 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐