



No. 12-195602- -00003-0000

Fecha: 2012-12-03 16:22:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 129

AS. 122.586

Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

REF: Expediente No. 12 195.602
A favor de **GILEAD PHARMASSET LLC**
MEMORIAL ALCANCE

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, vecino de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 57492, obrando como apoderado de la sociedad **GILEAD PHARMASSET LLC** dando alcance al Formulario de Modificaciones y/o Correcciones radicado el 29 de noviembre de 2012, me permito allegar la modificación al capítulo descriptivo de la solicitud de la referencia.

Del señor Director atentamente,

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
C.C. No. 80.410.337 de Usaquén
Calle 70A No. 4-41

Bogotá, 30 de noviembre de 2012
JPC/jpg

FOSFORAMIDATOS DE NUCLEÓSIDO

Prioridad

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente estadounidense N° 61/319,513, presentada el 31 de marzo de 2010, la solicitud de patente estadounidense N° 61/319,548, presentada el 31 de marzo de 2010 y la solicitud de patente estadounidense N° 12/783,680, presentada el 20 de mayo de 2010, la materia de las cuales se incorpora mediante esta referencia en su totalidad.

Campo de la invención

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

Antecedentes

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema muy importante de la salud que lleva a enfermedades hepáticas crónicas, tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular, en un número considerable de individuos infectados, que se estima representan el 2-15% de la población mundial. Solamente en Estados Unidos hay aproximadamente 4.5 millones de personas infectadas, de acuerdo con el U.S. Center for Disease Control [Centro de control de enfermedades de Estados Unidos]. Conforme a la Organización Mundial de la Salud, hay más de 200 millones de individuos infectados en todo el mundo y al menos 3 a 4 millones de personas se infectan cada año. Una vez infectadas, alrededor del 20% de las personas eliminan el virus, pero el resto puede alojar el VHC por el resto de sus vidas. De diez a veinte por ciento de los individuos crónicamente infectados, con el tiempo desarrollan cirrosis que destruye el hígado o cáncer. La enfermedad viral se transmite parenteralmente por sangre contaminada o hemoderivados, agujas contaminadas o sexual y verticalmente desde madres infectadas o madres portadoras a sus hijos. Los tratamientos

actuales para la infección por VHC, que se limitan a inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina, tienen un beneficio clínico limitado. Además, no se ha establecido una vacuna contra el VHC. Por consiguiente, existe una urgente necesidad de agentes terapéuticos mejores que combatan de forma eficaz la infección crónica por VHC.

El virión del VHC es un virus de ARN de cadena positiva cubierto, con una secuencia genómica de un solo oligoribonucleótido de alrededor de 9600 bases que codifica una poliproteína de alrededor de 3.010 aminoácidos. Los productos proteicos 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. Se cree que las proteínas no estructurales (NS) proporcionan el mecanismo catalítico para la replicación viral. La proteasa NS3 libera NS5B, la ARN polimerasa dependiente de ARN de la cadena de poliproteína. La polimerasa NS5B del VHC es necesaria para la síntesis de un ARN de cadena doble a partir de un ARN viral de cadena simple que sirve como modelo en el ciclo de replicación del VHC. Por lo tanto, la polimerasa NS5B es considerada un componente esencial en el complejo de replicación del VHC (K. Ishi, et ál, *Hepatology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et ál., *Virology*, 1998, 249: 108-118). La inhibición de la polimerasa NS5B del VHC previene la formación de ARN de cadena doble del VHC y por lo tanto constituye un enfoque interesante para el desarrollo de terapias antivirales específicas para el VHC.

El VHC pertenece a una familia mucho más grande de virus que comparten muchos rasgos comunes.

Virus Flaviviridae

La familia de virus *Flaviviridae* comprende al menos tres géneros distintos: *pestivirus*, que causan enfermedades en el ganado y los cerdos; *flavivirus*, que son la principal causa de enfermedades tales como fiebre del dengue y fiebre amarilla y *hepacivirus*, cuyo único miembro es el VHC. El género *flavivirus* incluye más de 68 miembros separados en grupos basándose en relaciones serológicas (Calisher et ál., *J. Gen. Virol*, 1993, 70, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica (*Fields Virology*, Editores: Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, PA,

1996, Capítulo 31, 931-959). Los flavivirus de interés mundial que están asociados con enfermedades humanas incluyen el virus de la fiebre hemorrágica por dengue (DHF), virus de la fiebre amarilla, síndrome de choque y virus de la encefalitis japonesa (Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med*, 1988, 319, 64 1-643).

La especie pestivirus incluye el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV, también llamado virus de cólera porcino) y virus de enfermedad de frontera (BDV) de ovejas (Moennig, V. et ál. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Las infecciones por pestivirus de ganado domesticado (bovinos, porcinos y ovinos) causan pérdidas económicas importantes en todo el mundo. El BVDV causa enfermedades mucosas en el ganado vacuno y es de importancia económica significativa para la industria del ganado doméstico (Meyers, G. and Thiel, H.J., *Advances in Virus Research*, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et ál, *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Los pestivirus humanos todavía no han sido caracterizados tan exhaustivamente como los pestivirus animales. Sin embargo, los estudios serológicos indican una exposición considerable de los humanos al pestivirus.

Los pestivirus y los hepacivirus son grupos virales muy relacionadas dentro de la familia *Flaviviridae*. Otros virus muy relacionados en esta familia incluyen el virus GB A, agentes similares al virus GB A, el virus GB B y el virus GB C (también denominado virus de la hepatitis G, VHG). El grupo hepacivirus (virus de la hepatitis C; VHC) consiste en un número de virus estrechamente relacionados pero distinguibles genotípicamente, que infectan a los humanos. Existen por lo menos 6 genotipos del VHC y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre los pestivirus y los hepacivirus combinadas con la poca capacidad de crecer eficazmente en cultivos celulares por parte de los hepacivirus, a menudo se usa el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) como sustituto para el estudio del virus VHC.

La organización genética de los pestivirus y los hepacivirus es muy similar. Estos virus de ARN de cadena positiva poseen un único marco abierto de lectura (ORF) extenso que codifica todas las proteínas virales necesarias para la replicación viral. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que se

procesa durante y después de la traducción mediante proteinasas tanto celulares como codificadas por virus para proporcionar las proteínas virales maduras. Las proteínas virales responsables por la replicación del ARN del genoma viral están ubicadas aproximadamente dentro del extremo carboxi. Dos tercios del ORF se denominan proteínas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de poliproteínas de la porción de proteína no estructural del ORF para los pestivirus y los hepacivirus es muy similar. Para tanto los pestivirus como para los hepacivirus, las proteínas no estructurales (NS) maduras, en orden secuencial desde el extremo amino de la región codificante de la proteína no estructural al extremo carboxi del ORF, consisten en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

Las proteínas NS de los pestivirus y hepacivirus comparten dominios de secuencias que son característicos de funciones específicas de las proteínas. Por ejemplo, las proteínas NS3 de virus en ambos grupos poseen motivos de secuencias de aminoácidos característicos de las serina proteinasas y de las helicasas (Gorbalenya et ál., *Nature*, 1988, 333, 22; Bazan and Fletterick *Virology*, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya et ál., *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3889-3897). De manera similar, las proteínas NS5B de los pestivirus y hepacivirus tienen los motivos característicos de las ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, E.V. y Doha, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Los roles y funciones verdaderos de las proteínas NS de pestivirus y hepacivirus en el ciclo vital de los virus son directamente análogos. En ambos casos, la serina proteinasa NS3 es responsable de todo el procesamiento proteolítico de los precursores de poliproteína hacia abajo de su posición en el ORF (Wiskerchen and Collett, *Virology*, 1991, 184, 341-350; Bartenschlager et ál., *J. Virol.* 1993, 67, 3835-3844; Eckart et ál. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993, 192, 399-406; Grakoui et ál., *J. Virol.* 1993, 67, 2832-2843; Grakoui et ál., *Proc. Natl. AcadSci. USA* 1993, 90, 10583-10587; Hijikata et ál., *J. Virol.* 1993, 67, 4665-4675; Tome et ál., *J. Virol.*, 1993, 67, 4017-4026). En ambos casos, la proteína NS4A actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager et ál., *J. Virol.* 1994, 68, 5045-5055; Failla et ál., *J. Virol.* 1994, 68, 3753-3760; Xu et ál., *J. Virol.*, 1997, 71:53 12-5322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim et ál., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, 215, 160-166; Jin y Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 323,

47-53; Warrener y Collett, *J. Virol.* 1995, 69, 1720-1726). Finalmente, las proteínas NS5B de los pestivirus y hepacivirus tienen la actividad de ARN polimerasas dirigidas por ARN predicha (Behrens et ál., *EMBO*, 1996, 15, 12-22; Lechmann et ál., *J. Virol.*, 1997, 71, 8416-8428; Yuan et ál., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997, 232, 231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; Zhong et ál, *J. Virol.*, 1998, 72, 9365-9369).

Actualmente, existen pocas opciones para el tratamiento de individuos infectados por el virus de la hepatitis C. La opción terapéutica actual aprobada es el uso de inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido, ribavirina. Este tratamiento está limitado en su eficacia clínica y solo el 50% de los pacientes tratados responden a éste. Por lo tanto, existe una importante necesidad de terapias más eficaces y novedosas para enfrentar la necesidad médica no satisfecha representada por la infección por VHC.

Actualmente se han identificado una cantidad de dianas moleculares potenciales para el desarrollo farmacológico de antivirales de acción directa como agentes terapéuticos anti-VHC, incluyendo, de modo no taxativo, la autoproteasa NS2-NS3, la proteasa N3, la helicasa N3 y la polimerasa NS5B. La ARN polimerasa dependiente de ARN es absolutamente esencial para la replicación del genoma de ARN de cadena simple, de sentido positivo y esta enzima ha provocado un interés significativo entre los químicos médicos.

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

Los inhibidores nucleósidos de la polimerasa NS5B pueden actuar ya sea como un sustrato no natural que da como resultado la interrupción de cadena o como un inhibidor competitivo que compite con la unión del nucleótido a la polimerasa. Para funcionar como un interruptor de cadena, el análogo de nucleósido debe ser absorbido por la célula y convertirse en un trifosfato *in vivo* para competir por el sitio de unión del nucleótido de la polimerasa. Esta conversión al trifosfato es mediada comúnmente por cinasas celulares que imparten requisitos estructurales adicionales a un inhibidor potencial de la polimerasa del nucleósido. Lamentablemente, esto limita la evaluación directa de los nucleósidos como inhibidores de la replicación del VHC a ensayos basados en células capaces de fosforilación *in situ*.

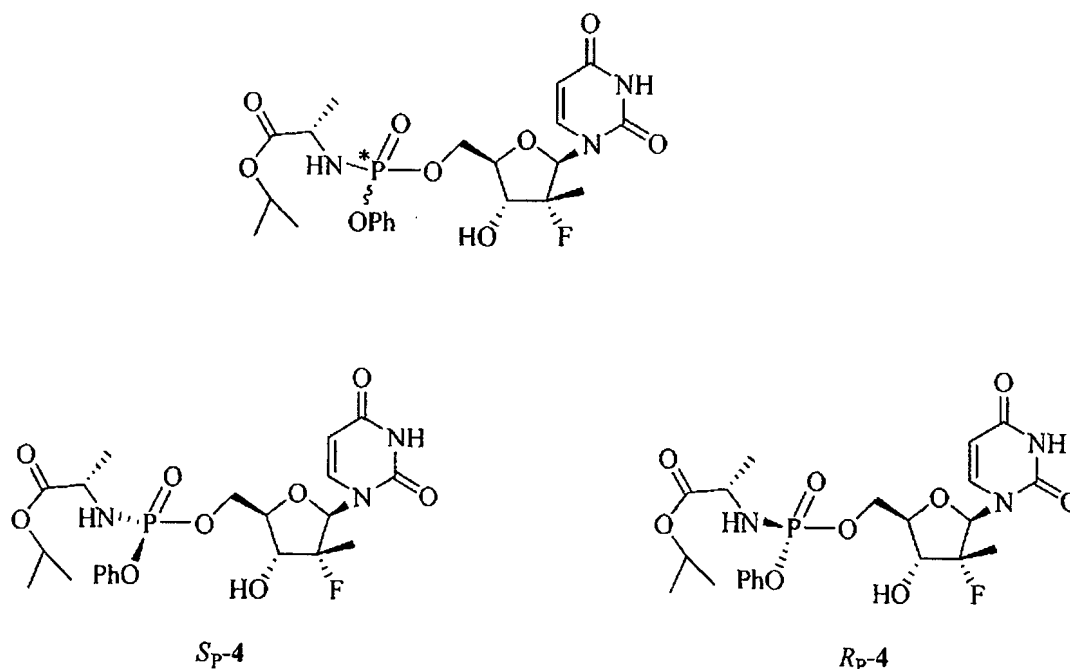
En algunos casos, la actividad biológica de un nucleósido es dificultada por su pobres características de sustrato con respecto a una o más cinasas necesitadas para convertirlo a la forma de trifosfato activa. En general, la formación del monofosfato mediante una cinasa de nucleósido se considera como una etapa limitativa de la proporción de los tres eventos de fosforilación. Se ha indicado la preparación de profármacos de fosfato estables, para evitar la necesidad de que la etapa inicial de fosforilación en el metabolismo de un nucleósido al análogo de trifosfato activo. Se ha mostrado que los profármacos de fosforamidato de nucleósido son precursores del trifosfato de nucleósido activo y que inhiben la replicación viral cuando se los administra a células enteras infectadas con virus (McGuigan, C, et ál., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., et ál., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., et ál., *Proc. National Acad Sci USA*, 1996, 93, 7295-7299; Siddiqui, A. Q., et ál., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4122-4128; Eisenberg, E. J., et ál., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, 20, 1091-1098; Lee, W.A., et ál., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49, 1898); US 2006/0241064; y WO 2007/095269.

Sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, a veces pobres, también limitan la utilidad de los nucleósidos como agentes terapéuticos viables. Estas propiedades pobres pueden limitar la absorción intestinal de un agente y limitar la captación en el tejido o célula diana. Para mejorar sus propiedades, se utilizaron profármacos de nucleósidos. Se ha demostrado que la preparación de fosforamidatos de nucleósido mejora la absorción sistémica de un nucleósido y además, el resto de fosforamidato de estos "pronucleótidos" está enmascarado

con grupos lipofílicos neutros para obtener un coeficiente de partición adecuado para optimizar la absorción y el transporte hacia la célula mejorando de forma drástica la concentración intracelular del análogo del monofosfato de nucleósido con respecto a la administración del nucleósido original solo. La hidrólisis mediada por enzimas del resto de éster de fosfato produce un monofosfato de nucleósido donde la fosforilación inicial que limita la velocidad es innecesaria. A estos efectos, la solicitud de patente estadounidense 12/053,015, que corresponde al documento WO 2008/121634 y US 2010/0016251, describe una cantidad de profármacos de nucleósido de fosforamidato, muchos de los cuales muestran actividad en un ensayo de VHC. Se analizaron diversos compuestos descritos en el documento US 2010/0016251 como candidatos clínicos potenciales a ser aprobados por la FDA.

Breve descripción de la invención

En la presente se describe un compuesto representado por la fórmula **4** y sus respectivos diastereómeros basados en fósforo representados por las fórmulas *S_p*-**4** y *R_p*-**4**.



Breve descripción de los dibujos

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

Figura 2. Difractograma XRPD de alta resolución de R_p -4.

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

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

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

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

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

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

Figura 9. Difractograma XRPD de alta resolución de S_p -4 (amorfo).

Figura 10. Estructura cristalina de rayos X para S_p -4 (Forma 1)

Figura 11. Estructura cristalina de rayos X (isotrópica) para S_p -4·CH₂Cl₂ (Forma 2)

Figura 12. Estructura cristalina de rayos X (anisotrópica) para S_p -4·CH₂Cl₂ (Forma 2)

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

Figura 14. Espectro FT-IR de 4.

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

Figura 16. Espectro FT-IR de S_p -4

Figura 17. Análisis TGA y DSC de 4.

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

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

Figura 20A. Estructura cristalina de rayos X para **8** (isómero S_p) (molécula N° 1 de la unidad asimétrica).

Figura 20B. Estructura cristalina de rayos X para **8** (isómero S_p) (molécula N° 2 de la unidad asimétrica).

Figura 21. Difractograma XRPD de alta resolución de S_p -4 (Forma 6).

Figura 22A. Estructura cristalina de rayos X para 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (molécula N° 1 de la unidad asimétrica).

Figura 22B. Estructura cristalina de rayos X para 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (molécula N° 2 de la unidad asimétrica).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente, la frase "una" entidad, se refiere a una o más de esa entidad, por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos o al menos a un compuesto. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar de manera intercambiable en la presente.

Los términos "opcional" u "opcionalmente", tal como se usan en la presente, significan que un evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir pero no es necesario que ocurra y que la descripción incluye instancias donde el evento o circunstancia ocurre e instancias donde no lo hace. Por ejemplo, "enlace opcional" significa que el enlace puede estar presente o no y que la descripción incluye enlaces simples, dobles o triples.

El término "P*" significa que el átomo de fósforo es quiral y que tiene una designación de Cahn-Ingold-Prelog correspondiente de "R" o "S" que tiene su significado común aceptado.

Tal como se describe en la presente, el término "purificado" se refiere a la pureza de un compuesto dado. Por ejemplo, un compuesto está "purificado" cuando el compuesto dado es un componente principal de la composición, es decir, al menos 50% p/p puro. De este modo, "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, 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 luego de su administración a un sujeto que lo necesita.

El término "alrededor de" (representado también por ~) significa que el valor numérico descrito forma 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 de los picos mostradas en el patrón XRPD son sustancialmente las mismas, dentro de la inspección visual o recurriendo a listados de picos seleccionados ($\pm 0.2^\circ 2\theta$). El experto en la técnica entiende que las intensidades pueden variar dependiendo de la muestra.

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

Un solvente o anti-solvente (como se usa en reacciones, cristalización, etc. o solventes en red y/o adsorbidos) incluyendo al menos uno de un alcohol de C_1 a C_8 , un éter de C_2 a C_8 , una cetona de C_3 a C_7 , un éster de C_3 a C_7 , un clorocarburo de C_1 a C_2 , un nitrilo de C_2 a C_7 , un solvente variado, un hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} y un hidrocarburo aromático de C_6 a C_{12} .

El alcohol de C_1 a C_8 se refiere a un alcohol de cadena recta/ramificada y/o cíclico/acíclico que tiene dicha cantidad de carbonos. El alcohol de C_1 a C_8 incluye, de modo no taxativo, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, hexanol y ciclohexanol.

El éter de C_2 a C_8 se refiere a un éter de cadena recta/ramificada y/o cíclico/acíclico que tiene dicha cantidad de carbonos. El éter de C_2 a C_8 incluye, de modo no taxativo, éter dimetílico, éter dietílico, éter di-isopropílico, éter di-n-butílico, éter metil-t-butílico (MTBE), tetrahidrofurano y dioxano.

La cetona de C_3 a C_7 se refiere a una cetona de cadena recta/ramificada y/o cíclica/acíclica que tiene dicha cantidad de carbonos. La cetona de C_3 a C_7 incluye, de modo no taxativo, acetona, metil etil cetona, propanona, butanona, metil isobutil cetona, metil butil cetona y ciclohexanona.

El éster de C_3 a C_7 se refiere a un éster de cadena recta/ramificada y/o cíclica/acíclica que tiene dicha cantidad de carbonos. El éster de C_3 a C_7 incluye, de modo no taxativo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de n-butilo, etc.

El clorocarburo de C_1 a C_2 se refiere a un clorocarburo que tiene dicha cantidad de carbonos. El clorocarburo de C_1 a C_2 incluye, de modo no taxativo, cloroformo, cloruro de metileno (DCM), tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano y tetracloroetano.

Un nitrilo de C_2 a C_7 se refiere a un nitrilo que tiene dicha cantidad de carbonos. El nitrilo de C_2 a C_7 incluye, de modo no taxativo, acetonitrilo, propionitrilo, etc.

Un solvente variado se refiere a un solvente comúnmente empleado en la química orgánica, que incluye, de modo no taxativo, dietilenglicol, diglima

(dietilenglicol dimetil éter), 1,2-dimetoxi-etano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, glicerina, hexametilfosforamida, triamida hexametilfosforosa, N-metil-2-pirrolidinona, nitrometano, piridina, trietilamina y ácido acético.

El término hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} se refiere a un hidrocarburo de cadena recta/ramificada y/o cíclico/acíclico. El hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} incluye, de modo no taxativo, n-pentano, éter de petróleo (ligroine), n-hexano, n-heptano, ciclohexano y cicloheptano.

El término aromático de C_6 a C_{12} se refiere a hidrocarburos sustituidos y no sustituidos que tienen un grupo fenilo como cadena principal. Los hidrocarburos preferidos incluyen benceno, xileno, tolueno, clorbenceno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, xilenos, siendo tolueno más preferido.

Tal como se utiliza en la presente, el término "halo" o "halógeno" incluye cloro, bromo, yodo y fluoro.

El término "grupo bloqueante" se refiere a un grupo químico que exhibe las siguientes características. El "grupo" deriva de un "compuesto protector". Los grupos que son selectivos para hidroxilos primarios sobre hidroxilos secundarios se pueden colocar en condiciones consistentes con la estabilidad del fosforamidato (pH 2-8) y otorgan al producto resultante propiedades físicas sustancialmente diferentes permitiendo una más fácil separación del producto del nuevo grupo 3'-fosforamidato-5' del compuesto deseado sin reaccionar. El grupo debe reaccionar selectivamente con buen rendimiento para proporcionar un sustrato protegido que es estable con respecto a las reacciones proyectadas (véase Protective Groups in Organic Synthesis, 3^{ra} ed. T. W. Greene y P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1999). Los ejemplos de grupos incluyen, de modo no taxativo: benzoílo, acetilo, benzoílo sustituido por fenilo, tetrahidropiranilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-ilo), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-ilo) o 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, *terc*-butildimetilsililo, *terc*-butildifenilsililo. Los acetales, tal como MOM o THP y similares, son considerados como grupos posibles. Los compuestos fluorinados también se contemplan en la medida en que puedan estar unidos al compuesto y se pueden quitar

selectivamente pasándolos por un medio de extracción de fase sólida fluoroso (FluoroFlash®). Un ejemplo específico incluye un análogo fluorado de tritilo, el análogo de tritilo 1-[4-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodecil)fenil]-1,1-difenilmetanol. También se contemplan otros análogos fluorados de tritilo, BOC, FMOC, CBz, etc. Los cloruros de sulfonilo como cloruro de p-toluensulfonilo pueden reaccionar selectivamente en la posición 5'. Los ésteres se podrían formar selectivamente, tales como acetatos y benzoatos. Se pueden usar anhídridos dicarboxílicos tales como anhídrido succínico y sus derivados para generar un enlace de éster con un ácido carboxílico libre, tales ejemplos incluyen, de modo no taxativo, oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, adipilo, pimelilo, superilo, azelailo, sebacilo, ftalilo, isoftalilo, tereftalilo, etc. El ácido carboxílico libre aumenta radicalmente la polaridad y también puede usarse como mango para extraer el producto de reacción en fases acuosas levemente básicas tales como soluciones de bicarbonato de sodio. El grupo fosforamidato es relativamente estable en un medio ácido, por lo que también se podrían utilizar grupos que requieren condiciones de reacción ácidas, tales como, tetrahidropiranilo.

El término "grupo protector", que deriva de un "compuesto protector", tiene su significado habitual, es decir, al menos un grupo protector o bloqueador se une a al menos un grupo funcional (por ej., -OH, -NH₂, etc.) que permite la modificación química de al menos un otro grupo funcional. Los ejemplos de grupos protectores, incluyen, de modo no taxativo, benzoílo, acetilo, benzoílo sustituido con fenilo, tetrahidropiranilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxantan-9-ilo), tiopixilo (9-feniltioxantan-9-ilo) o 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)-arilo, C(O)O(alquilo inferior), C(O)O(alquilenos inferiores)arilo (por ej., -C(O)OCH₂Ph), C(O)Oarilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, un grupo protector que comprende al menos un átomo de silicio, tal como, *tert*-butildimetilsililo, *tert*-butildifenilsililo, Si(alquilo inferior)₂OSi(alquilo inferior)₂OH (tal como, -Si(*i*Pr)₂OSi(*i*Pr)₂OH).

Tal como se utiliza en la presente y a menos que se defina de otra forma, el término "compuesto protector" se refiere a un compuesto que contiene un "grupo protector" y que es capaz de reaccionar con un compuesto que contiene grupos funcionales que son capaces de ser protegidos.

El término "grupo saliente", tal como se usa en la presente, tiene el mismo significado para el experto (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure – Cuarta edición de Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992 páginas 351-357) y representa un grupo que es parte de y está unido a una molécula de sustrato; en una reacción donde la molécula de sustrato se somete a una reacción de desplazamiento (por ejemplo con un nucleófilo), luego el grupo saliente se desplaza. Ejemplos de grupos salientes incluyen, de modo no taxativo: halógeno (F, Cl, Br e I), preferentemente Cl, Br o I; tosilato, mesilato, triflato, acetato, camforsulfonato, arilóxido y arilóxido sustituido con al menos un grupo electroceptor (por ej., p-nitrofenóxido, 2-clorofenóxido, 4-clorofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, pentafluorofenóxido, etc.), etc. Al término "grupo electroceptor" se le concede su significado habitual en la presente. Los ejemplos de grupos electroceptores incluyen, de modo no taxativo, 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 capaz de desprotonar un grupo hidroxilo. Ejemplos de reactivos básicos incluyen, de modo no taxativo, un alcóxido inferior ((alquilo inferior)OM) en combinación con un solvente alcohólico, donde los alcóxidos inferiores, incluyen, de modo no taxativo, 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 ejemplo, MeOH, EtOH, $^n\text{PrOH}$, $^i\text{PrOH}$, $^t\text{BuOH}$, $^i\text{AmOH}$, etc. Las bases no alcoxi también pueden utilizarse, 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 de Grignard, tales como (alquilo inferior)Mg(halógeno), el cual incluye, de modo no taxativo, MeMgCl , MeMgBr , $^t\text{BuMgCl}$, $^t\text{BuMgBr}$, etc.

El término "base" abarca el término "reactivo básico" y se pretende sea un compuesto que es capaz de desprotonar un compuesto que contiene protones, es decir, una base de Brønsted. Además de los ejemplos descritos anteriormente, ejemplos adicionales de una base incluyen, pero de modo no taxativo, piridina, colidina, 2,6-(alquilo inferior)-piridina, dimetil-anilina, imidazol, N-metil-imidazol, pirazol, N-metil-pirazol, trietilamina, di-isopropiletilamina, etc.

El término "base no nucleofílica" significa un compuesto capaz de actuar como una base de Brønsted, pero que tiene baja nucleofilicidad. Los ejemplos de bases no nucleofílicas incluyen, de modo no taxativo, carbonato de potasio, carbonato de cesio, di-isopropilamina, di-isopropiletilamina, trietilamina, quinuclidina, naftaleno-1,8-diamina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, 1,8-diazabicycloundec-7-eno, 4-dimetilamino-piridina, piridina, una 2,6-di-C1-6-alquil-piridina, una 2,4,6-tri-C1-6-alquil-piridina, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno y 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano.

Al término "grupo electroceptor" se le otorga su significado común. Los ejemplos de grupos electroceptores incluyen, de modo no taxativo, un halógeno (F, Cl, Br o I), $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{alquilo inferior})$, $-\text{C}(\text{O})(\text{arilo})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{alquilo inferior})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{arilo})$, etc.

El término "co-cristalatos" incluye co-cristalatos de **4**, $R_p\text{-4}$, o $S_p\text{-4}$ en combinación con sales, lo cual abarca sales farmacéuticamente aceptables.

Tal como se describe en la presente, el término "sales" se refiere a un compuesto que comprende un catión y un anión, que se puede producir mediante la protonación de un resto aceptor de protones y/o la desprotonación de un resto donador de protones. Se debería observar que la protonación del resto aceptor de protones resulta en la formación de una especie catiónica en la que la carga se equilibra mediante la presencia de un anión fisiológico, mientras que la desprotonación del resto donador de protones resulta en la formación de una especie aniónica en la que la carga se equilibra mediante 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 de ácido, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, o formadas con ácidos orgánicos, tales como ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-

hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido salicílico, ácido mucónico y similares o (2) sales de adición de bases formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos inorgánicos enumerados anteriormente, donde las bases conjugadas comprenden un componente catiónico seleccionado de entre Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , $\text{NH}_g\text{R}^{'''}_{4-g}^+$, en donde R''' es un alquilo C_{1-3} y g es un número seleccionado de entre 0, 1, 2, 3 o 4. Debería entenderse que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de solventes (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos), tal como se definen en la presente, de la misma sal de adición de ácido.

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

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

2 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo) o 2-butenilo (crotilo).

Tal como se utiliza en la presente y a menos que se especifique lo contrario, el término "arilo" se refiere a un fenilo (Ph), bifenilo o naftilo sustituido o no sustituido, preferentemente el término arilo se refiere a un fenilo sustituido o no sustituido. El grupo arilo puede estar sustituido por uno o más restos seleccionados de entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato y fosfonato, ya sean desprotegidos o protegidos según sea necesario, tal como los conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describen en T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3ra ed., John Wiley & Sons, 1999.

El término "arilóxido", tal como se usa en la presente y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a fenóxido (PhO-), p-fenil-fenóxido (p-Ph-PhO-) o naftóxido sustituido o insustituido, preferentemente el término arilóxido se refiere a fenóxido sustituido o insustituido. El grupo arilóxido puede estar sustituido por uno o más restos seleccionados de entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)O(alquilo inferior), amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato y fosfonato, ya sea desprotegidos o protegidos según sea necesario, tal como los conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3ra ed., John Wiley & Sons, 1999.

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

El término "excipiente", tal como se usa en la presente, se refiere a un compuesto que se usa para preparar una composición farmacéutica y es generalmente seguro, no tóxico y ni biológicamente ni de otra forma indeseable e

incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano.

El término "cristalina" se refiere a una situación donde una muestra sólida de S_p -4 o R_p -4 tiene características cristalinas cuando se determina por difracción de rayos X en polvo o una técnica de rayos X de cristales simple.

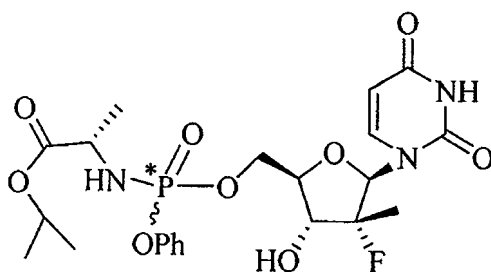
El término "pseudo cristalina" se refiere a una situación donde una muestra sólida de S_p -4 o R_p -4 tiene características cristalinas cuando se la determina por un medio, por ej., visualmente o por microscopía óptica o de polarización, pero no tiene características cristalinas cuando se la determina por otro medio, por ej., difracción de rayos x en polvo.

Los métodos para determinar visualmente la cristalinidad de una muestra sólida por microscopía visual u óptica o de polarización se describen en las USP <695> y <776>, ambas incorporadas a la presente mediante esta referencia. Una muestra sólida de S_p -4 o R_p -4 que es "pseudo-cristalina" puede ser cristalina en ciertas condiciones pero puede tornarse no cristalina cuando se la somete a otras condiciones.

El término "amorfo/a" se refiere a una situación en la cual una muestra sólida de S_p -4 o R_p -4 no es cristalina ni pseudo-cristalina.

Modalidades

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

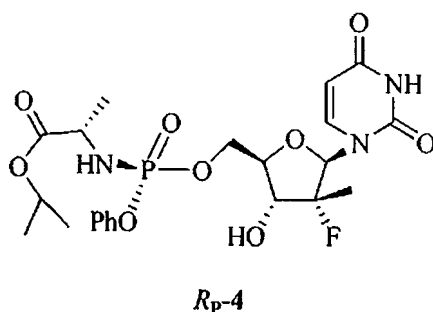


4

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

diastereómeros designados R_p -4 y S_p -4. El compuesto representado por la fórmula 4 también puede ser parte de un solvato, un hidrato o una mezcla solvato/hidrato. El solvato se designa como $4 \cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $4 \cdot mH_2O$, donde S es un solvente en red, n varía de una cantidad entera a no entera de alrededor de 0 a alrededor de 3 y m varía entre una cantidad entera a no entera de alrededor de 0 a alrededor de 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula 4 puede no existir como un solvato o hidrato, pero puede tener determinada cantidad ventajosa de solvente adsorbido (S) o agua. En ese caso, la cantidad de S o agua puede variar entre alrededor de 0% en peso a alrededor de 10% en peso en función del peso del compuesto representado por la fórmula 4. El compuesto representado por la fórmula 4 y sus solvatos e hidratos son cristalinos, pseudo cristalinos o amorfos.

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



El compuesto representado por la fórmula R_p -4 también puede ser parte de un solvato, un hidrato o una mezcla de solvato/hidrato. 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 en red, n varía de una cantidad entera a no entera de alrededor de 0 a alrededor de 3 y m varía entre una cantidad entera a no entera de alrededor de 0 a alrededor de 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula R_p -4 puede no existir como un solvato, hidrato o mezcla de solvato/hidrato, pero puede tener determinada cantidad ventajosa de solvente adsorbido (S), agua, o tanto S como agua. En dicho caso, la cantidad de S o agua puede variar entre alrededor de 0% en peso a alrededor de 10% en peso en función del peso del compuesto representado por la fórmula R_p -4. El compuesto representado por la fórmula R_p -4 y sus solvatos e hidratos son cristalinos, pseudo cristalinos o amorfos.

Un primer aspecto de la segunda modalidad se refiere a R_p -4 cristalina.

Un segundo aspecto de la segunda modalidad se refiere a R_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^\circ$) a 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 refiere a R_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^\circ$) a 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 refiere a R_p -4 cristalina que tiene un patrón de difracción XRPD sustancialmente como el que se muestra en la Fig. 2.

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

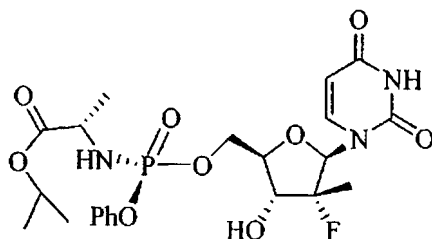
Un sexto aspecto de la segunda modalidad se refiere a R_p -4 que tiene un espectro FT-IR sustancialmente como el que se muestra en la Fig. 15.

Un séptimo aspecto de la segunda modalidad se refiere a R_p -4 sustancialmente pura.

Un octavo aspecto de la segunda modalidad se refiere a R_p -4 cristalina sustancialmente pura.

Un noveno aspecto de la segunda modalidad se refiere a R_p -4 amorfa sustancialmente pura.

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



S_p -4

El compuesto representado por la fórmula $S_p\text{-4}$ también puede ser parte de un solvato, un hidrato o una mezcla solvato/hidrato. El solvato se designa como $S_p\text{-4}\cdot nS$, mientras que el hidrato se designa como $S_p\text{-4}\cdot mH_2O$, donde S es un solvente en red, n varía de una cantidad entera a no entera de alrededor de 0 a alrededor de 3 y m varía entre una cantidad entera a no entera de alrededor de 0 a alrededor de 5. Finalmente, el compuesto representado por la fórmula $S_p\text{-4}$ puede no existir como un solvato o hidrato, pero puede tener determinada cantidad ventajosa de solvente adsorbido (S) o agua. En dicho caso, la cantidad de S o agua puede variar entre alrededor de 0% en peso a alrededor de 10% en peso en función del peso del compuesto representado por la fórmula $S_p\text{-4}$. El compuesto representado por la fórmula $S_p\text{-4}$ y sus solvatos e hidratos son cristalinos, pseudo cristalinos o amorfos.

Un primer aspecto de la tercera modalidad se refiere a $S_p\text{-4}$ cristalina.

Un segundo aspecto de la tercera modalidad se refiere a $S_p\text{-4}$ monoclinica cristalina, preferentemente con los siguientes parámetros de unidad celular $a \sim 12.88 \text{ \AA}$, $b \sim 6.17 \text{ \AA}$, $c \sim 17.73 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 92.05^\circ$.

Un tercer aspecto de la tercera modalidad se refiere a $S_p\text{-4}$ monoclinica cristalina, preferentemente con los siguientes parámetros de unidad celular $a \sim 20.09 \text{ \AA}$, $b \sim 6.10 \text{ \AA}$, $c \sim 23.01 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 112.29^\circ$.

Un cuarto aspecto de la tercera modalidad se refiere a $S_p\text{-4}$ monoclinica cristalina, preferentemente con los siguientes parámetros de unidad celular $a \sim 12.83 \text{ \AA}$, $b \sim 6.15 \text{ \AA}$, $c \sim 17.63 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 91.75^\circ$.

Un quinto aspecto de la tercera modalidad se refiere a $S_p\text{-4}$ monoclinica cristalina, preferentemente con los siguientes parámetros de unidad celular $a \sim 12.93 \text{ \AA}$, $b \sim 6.18 \text{ \AA}$, $c \sim 18.01 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 96.40^\circ$.

Un sexto aspecto de la tercera modalidad se refiere a $S_p\text{-4}$ cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ ($^\circ$) a alrededor de: 5.2, 7.5, 9.6, 16.7, 18.3, 22.2.

Un séptimo aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ (°) a alrededor de: 5.0, 7.3, 9.4 y 18.1.

Un octavo aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ (°) a alrededor de: 4.9, 6.9, 9.8, 19.8, 20.6, 24.7 y 26.1.

Un noveno aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ (°) a alrededor de: 6.9, 9.8, 19.7, 20.6 y 24.6.

Un noveno aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ (°) a alrededor de: 5.0, 6.8, 19.9, 20.6, 20.9 y 24.9.

Un décimo aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ (°) a alrededor de: 5.2, 6.6, 7.1, 15.7, 19.1 y 25.0.

Un decimoprimer aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 cristalina que tiene reflexiones XRPD 2θ (°) a alrededor de: 6.1, 8.2, 10.4, 12.7, 17.2, 17.7, 18.0, 18.8, 19.4, 19.8, 20.1, 20.8, 21.8 y 23.3.

Un decimosegundo aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 cristalina que tiene un patrón de difracción de XRPD sustancialmente como el mostrado en cualquiera de las Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8 y Fig. 21.

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

Un decimocuarto aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 que tiene un espectro de FT-IR sustancialmente como el que se muestra en la Fig. 7.

Un decimoquinto aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p -4 sustancialmente pura.

Un decimosexto aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p-4 cristalina sustancialmente pura.

Un decimoséptimo aspecto de la tercera modalidad se refiere a S_p-4 amorfa sustancialmente pura.

Dosificación, administración y uso

Una cuarta modalidad se refiere a una composición para el tratamiento y/o profilaxis de cualquiera de los agentes virales usando cualquiera de los compuestos **4**, R_p-4 , o S_p-4 . Los agentes virales posibles incluyen, de modo no taxativo: virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis A, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus del polio, virus de la diarrea viral bovina, virus de la encefalitis japonesa o aquellos virus que corresponden a los grupos de pestivirus, hepacivirus o flavivirus.

Un aspecto de esta modalidad se refiere a una composición para tratar cualquiera de los agentes virales descritos en la presente, dicha 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 pretende incluir sus hidratos, solvatos y cualquier forma cristalina de cualquiera de los compuestos **4**, R_p-4 , o S_p-4 o los hidratos y solvatos de estos.

Los compuestos **4**, R_p-4 , o S_p-4 pueden formularse independientemente en una amplia variedad de formas de dosificación de administración oral y portadores. La administración oral puede estar en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones, emulsiones, jarabes o suspensiones. Los compuestos **4**, R_p-4 , o S_p-4 son eficaces cuando se administran mediante administración por supositorio, entre otras vías de administración. La forma más conveniente de administración es generalmente oral, usando un régimen de dosificación diario conveniente que se puede ajustar de acuerdo con la gravedad 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, portadores o diluyentes convencionales pueden colocarse en forma de

composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitaria pueden estar compuestas por ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos activos adicionales y las formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo en proporción al intervalo de dosificación diario deseado a ser utilizado. Las composiciones farmacéuticas se pueden emplear como sólidos, tal como comprimidos o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida o líquidos tales como suspensiones, emulsiones o cápsulas rellenas para uso oral o en forma de supositorios para la administración rectal o vaginal. Una preparación típica contendrá de alrededor de un 5% a alrededor de un 95% de compuesto o compuestos activos (p/p).

Los compuestos **4**, $R_p\text{-4}$, o $S_p\text{-4}$ pueden administrarse solos, pero generalmente se administrarán en una mezcla con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticos adecuados seleccionados según la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar.

Las preparaciones de forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios y gránulos dispersables. Un portador sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes saborizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes de desintegración de comprimidos o un material de encapsulación. En el caso de los polvos, el portador generalmente es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En el caso de los comprimidos, el componente activo generalmente se mezcla con el portador que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se comprime en la forma y tamaño deseados. Los portadores adecuados incluyen, de modo no taxativo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de baja fusión, manteca de cacao y similares. Las preparaciones de forma sólida puede contener, además del componente activo, colorantes, sabores, estabilizantes, amortiguadores, endulzantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes de solubilización y similares. Los ejemplos de formulaciones sólidas se ejemplifican en los documentos EP 0524579; US

2002/0142050; US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360; US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; US 6,267,985; US 6,294,192; US 6,383,471; US 6,395,300; US 6,569,463; US 6,635,278; US 6,645,528; US 6,923,988; US 6,932,983; US 7,060,294 y US 7,462,608, cada uno de los cuales se incorpora mediante esta referencia.

Las formulaciones líquidas también son adecuadas para administración oral e incluyen formulaciones líquidas que incluyen emulsiones, jarabes, elíxires y suspensiones acuosas. Estas incluyen preparaciones de forma sólida que se pretende convertir en preparaciones de forma líquida poco antes de su uso. Los ejemplos de formulaciones líquidas se ejemplifican en las patentes estadounidenses N° 3.994.974, 5.695.784 y 6.977.257. Las emulsiones se pueden preparar en soluciones, por ejemplo, en soluciones de propilenglicol acuoso o pueden contener agentes emulsionantes tales como lecitina, monooleato de sorbitán o acacia. Las suspensiones acuosas se pueden preparar por medio de la dispersión del componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio naturales o sintéticos y otros agentes de suspensión bien conocidos.

Los compuestos 4, R_p -4, o S_p -4 pueden formularse independientemente para administrarse como supositorios. Una cera de baja fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso o manteca de cacao se derrite primero y el componente activo se dispersa homogéneamente, por ejemplo, por medio de agitación. La mezcla homogénea fundida luego se vierte en moldes con tamaño conveniente, se deja enfriar y solidificar.

Los compuestos 4, R_p -4, o S_p -4 pueden formularse independientemente para administración vaginal. Los óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o rociadores que contienen dichos portadores además del ingrediente activo se conocen en la técnica como apropiados. Algunas de estas formulaciones también pueden ser usadas junto con un condón con o sin un agente espermicida.

Las formulaciones adecuadas junto con portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticos se describen en *Remington: The Science and Practice*

of Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pensilvania, el cual se incorpora a la presente mediante esta referencia. Un científico de formulación experto puede modificar las formulaciones dentro de las descripciones de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una vía de administración particular sin hacer que las composiciones que contienen los compuestos contemplados en la presente sean inestables ni comprometer su actividad terapéutica.

Adicionalmente, los compuestos purificados **4**, R_p -**4** o S_p -**4** pueden formularse independientemente en conjunto con liposomas o micelas. En cuanto a los liposomas, se contempla que los compuestos purificados pueden formularse en una manera como la que se describe en las patentes estadounidenses N°. 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 mediante esta referencia. En cuanto a las micelas, se contempla que los compuestos purificados pueden formularse en una manera como la que se describe en las patentes estadounidenses N° 5.145.684 y 5.091.188, ambas incorporadas a la presente mediante esta referencia.

La quinta modalidad se refiere al uso de cualquiera de los compuestos **4**, R_p -**4**, o S_p -**4** en la elaboración de un medicamento para tratar cualquier afección que resulte de una infección por cualquiera de los siguientes agentes virales: virus de la hepatitis C, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus del polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina y virus de la encefalitis japonesa.

El término "medicamento" significa una sustancia usada en un método de tratamiento y/o profilaxis de un sujeto que lo necesita, donde la sustancia incluye, de modo no taxativo, una composición, una formulación, una forma de dosificación y similares, que comprende cualquiera de los compuestos **4**, R_p -**4**, o S_p -**4**. Se contempla el uso de cualquiera de los compuestos **4**, R_p -**4**, o S_p -**4** en la elaboración de un medicamento para tratar cualquiera de las afecciones virales descritas en la presente, solo o en combinación con otro compuesto descrito en la

presente. Un medicamento incluye, de modo no taxativo, cualquiera de las composiciones contempladas por la cuarta modalidad descrita en la presente.

Una sexta modalidad se refiere a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto que lo necesita, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos **4**, R_p -**4**, o S_p -**4** al sujeto.

Se pretende que un sujeto que lo necesita sea uno que tiene cualquier afección que sea el resultado de una infección por cualquiera de los agentes virales descritos en la presente, que incluye, de modo no taxativo, virus de la hepatitis C, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus del polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina o virus de la encefalitis japonesa, flavivirus o pestivirus o hepacivirus o un agente viral que causa síntomas equivalentes o comparables a cualquiera de los virus mencionados anteriormente.

El término "sujeto" significa un mamífero, que incluye, de modo no taxativo, ganado, cerdos, ovejas, gallinas, pavos, búfalos, llamas, avestruces, perros, gatos y seres humanos, preferentemente el sujeto es un ser humano. Se contempla que en el método de tratamiento de un sujeto de la novena modalidad puede estar cualquiera de los compuestos contemplados en la presente, ya sea solo o combinado con otro compuesto descrito en la presente.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en la presente, significa una cantidad requerida para reducir los síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requisitos individuales en cada caso particular. La dosis puede variar dentro de amplios límites dependiendo de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad a ser tratada, la edad y el estado de salud general del paciente, otros medicamentos con los cuales se esté tratando al paciente, la vía y forma de administración y las preferencias y experiencia del médico involucrado. Para la administración oral, una dosis diaria de entre alrededor de 0.001 y alrededor de 10 g, incluyendo todos los valores comprendidos entremedio, tales como 0.001, 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.125, 0.150, 0.175, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 y 9.5, por día, debería ser apropiada en monoterapia y/o terapia combinada. Una dosis diaria particular es de entre

alrededor de 0.01 y alrededor de 1 g por día, incluyendo todos los valores crecientes de 0.01 g (es decir, 10 mg) entremedio, una dosis diaria preferida de entre alrededor de 0.01 y alrededor de 0.8 g por día, más preferentemente entre alrededor de 0.01 y alrededor de 0.6 g por día y aun más preferentemente entre alrededor de 0.01 y alrededor de 0.25 g por día, cada una de las cuales incluye todos los valores crecientes de 0.01 g entremedio. Generalmente, el tratamiento comienza con una "dosis de carga" inicial alta para reducir o eliminar rápidamente el virus y después se reduce la dosis a un nivel suficiente como para prevenir el resurgimiento de la infección. Un experto en el tratamiento de enfermedades descritas en la presente será capaz, sin necesidad de una experimentación indebida y confiando en su conocimiento, experiencia y las descripciones de esta solicitud, determinar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto descrito en la presente para una enfermedad y un paciente dados.

La eficacia terapéutica se puede determinar a partir de pruebas de las funciones hepáticas, incluyendo, de modo no taxativo, niveles de proteínas tales como proteínas en suero (por ej., albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (por ej., transaminasa de alanina, transaminasa de aspartato), 5'-nucleosidasa, γ -glutamiltranspeptidasa, etc.), síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol y síntesis de ácidos biliares; una función metabólica hepática, incluyendo, de modo no taxativo, metabolismo de carbohidrato, aminoácidos y metabolismo de amoníaco. De manera alternativa, la eficacia terapéutica puede monitorearse por medio de la medición de VHC-ARN. Los resultados de estas pruebas permitirán la optimización de la dosis.

Un primer aspecto de la sexta modalidad se refiere a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto que lo necesita; dicho método comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por cualquiera de los compuestos **4**, R_p -**4**, o S_p -**4** y una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente antiviral; donde la administración es concomitante o alternativa. Se entiende que el tiempo entre las administraciones alternativas puede variar entre 1-24 horas, lo que incluye cualquier sub-rango entre medio, incluyendo 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 antiviral" incluyen, de modo no taxativo: inhibidores de la proteasa NS3 del VHC (véanse los documentos EP 1881001, US 2003187018, US 2005267018, WO 2003006490, WO 200364456, WO 2004094452, WO 2005028502, WO 2005037214, WO 2005095403, WO 2007014920, WO 2007014921, WO 2007014922, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007015824, WO 2008010921 y WO 2008010921); inhibidores de NS5B del VHC (véanse los documentos US 2004229840, US 2005154056, US 2005-98125, US 20060194749, US 20060241064, US 20060293306, US 2006040890, US 2006040927, US 2006166964, US 2007275947, US 6784166, US20072759300, WO 2002057287, WO 2002057425, WO 2003010141, WO 2003037895, WO 2003105770, WO 2004000858, WO 2004002940, WO 2004002944, WO 2004002977, WO 2004003138, WO 2004041201, WO 2004065367, WO 2004096210, WO 2005021568, WO 2005103045, WO 2005123087, WO 2006012078, WO 2006020082, WO 2006065335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO 2007039142, WO 2007039145, WO 2007076034, WO 2007088148, WO 2007092000 y WO2007095269); inhibidores de NS4 del VHC (véanse los documentos WO 2005067900 y WO 2007070556); inhibidores de NS5a de VHC (véanse los documentos US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251 y WO 2006120252); agonistas del receptor tipo toll (véase el documento WO 2007093901) y otros inhibidores (véanse los documentos WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852 y WO 2004035571) y compuestos descritos en la solicitud de patente estadounidense N° 12/053,015, presentada el 21 de marzo de 2008 (US 2010/0016251) (cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia), interferón- α , interferón- β , interferón- α pegilado, ribavirina, levovirina, viramidina, otro inhibidor de polimerasa del VHC nucleósido, un inhibidor de polimerasa del VHC no nucleósido, un inhibidor de proteasa del VHC, un inhibidor de helicasa del VHC o un inhibidor de fusión del VHC.

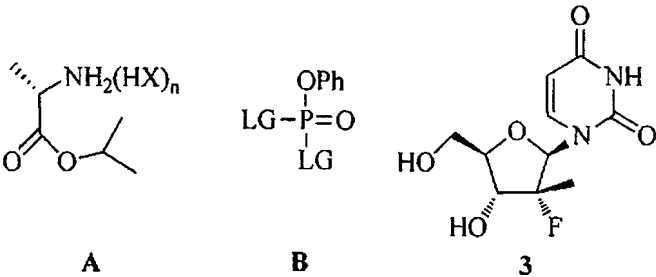
Cuando cualquiera de los compuestos **4**, R_p -**4**, o S_p -**4** se administran en combinación con otro agente antiviral, la actividad puede aumentar sobre la del compuesto original. Cuando el tratamiento es una terapia combinada, dicha administración puede ser concomitante o consecutiva con respecto a aquella de los derivados de nucleósidos. "Administración concomitante", tal como se usa en la presente, incluye, por lo tanto, la administración de los agentes a la misma vez o

en momentos diferentes. La administración de dos o más agentes a la misma vez se puede lograr por medio de una sola formulación que contiene dos o más ingredientes activos o por administración sustancialmente simultánea de dos o más formas de dosificación con un solo agente activo.

Se entenderá que las referencias en la presente al tratamiento alcanzan la profilaxis así como el tratamiento de las afecciones existentes. Además, el término "tratamiento" de una infección por VHC, tal como se usa en la presente, también incluye el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección asociada con o mediada por infección por VHC, o los síntomas clínicos de la misma.

Preparación

Una séptima modalidad se refiere a un proceso para preparar cualquiera de los compuestos **4**, R_p -**4**, o S_p -**4**, el cual comprende: a) hacer reaccionar isopropil-alanato, **A**, un di-LG-fenilfosfato, **B**, 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3** y una base para obtener una primera mezcla que comprende al menos uno de R_p -**4** y S_p -**4**



donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1 y LG es un grupo saliente; b) hacer reaccionar la primera mezcla con un compuesto protector para obtener una segunda mezcla que comprende al menos un S_p -**4** protegido y un R_p -**4** protegido; y c) someter opcionalmente la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción para obtener **4**, R_p -**4** o S_p -**4**.

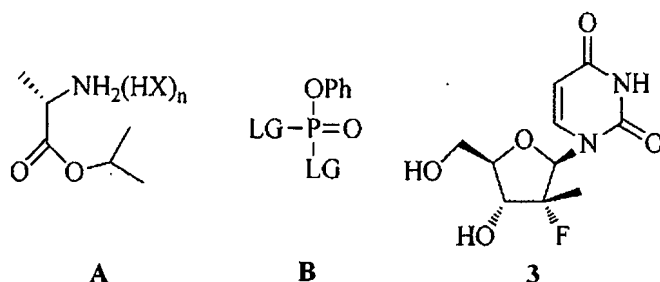
En un primer aspecto de la séptima modalidad, el isopropil alanato está presente como su sal de ácido clorhídrico, que es preferentemente sustancialmente anhidra.

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

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

En un cuarto aspecto de la séptima modalidad, el compuesto protector es t-butildimetilsilil cloruro.

Una octava modalidad se refiere a un proceso para preparar R_p -**4** o S_p -**4**, el cual comprende: a) hacer reaccionar isopropil-alanato, **A**, un di-LG-fenilfosfato, **B**, 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3** y una base para obtener una primera mezcla que comprende al menos una de R_p -**4** y S_p -**4**



donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1 y LG es un grupo saliente y b) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción para obtener R_p -**4** o S_p -**4** purificados.

En un primer aspecto de la octava modalidad para preparar R_p -**4** incluye además purificar adicionalmente la segunda mezcla del R_p -**4** purificado disolviendo o suspendiendo la segunda mezcla o la mezcla de R_p -**4** purificada en un solvente; seguido opcionalmente del sembrado con R_p -**4** cristalino; y agregar suficiente anti-solvente para obtener R_p -**4** cristalino.

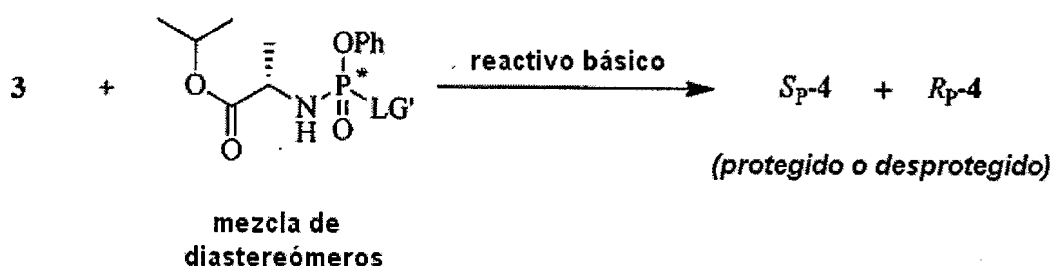
En un segundo aspecto de la octava modalidad para preparar S_p -**4** además incluye purificar adicionalmente la segunda mezcla del S_p -**4** purificado d) disolviendo o suspendiendo la segunda mezcla o el S_p -**4** purificado en un solvente seguido por el sembrado con S_p -**4** cristalino a alrededor de temperatura ambiente; recogiendo un primer sólido, la mayoría del cual comprende S_p -**4**; disolviendo el primer sólido en un solvente a su temperatura de reflujo; y enfriando o agregando un anti-solvente para obtener un segundo sólido.

En el tercer aspecto de la octava modalidad para la preparación de S_p-4 , además incluye purificar adicionalmente S_p-4 al d) disolver o suspender la segunda mezcla o la mezcla de S_p-4 purificada en un primer solvente seguido por la adición de un anti-solvente para obtener una primera composición en la cual el solvente residual/anti-solvente se retira mediante 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 la cual la reducción de la presión proporciona un primer sólido; disolver o suspender el primer sólido usando un segundo solvente para obtener una tercera composición; agregar cristales de siembra de S_p-4 a la tercera composición; recoger un segundo sólido; 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, en caso de ser necesario, enfriar la cuarta composición para obtener un tercer sólido que comprende S_p-4 que se recoge por filtración.

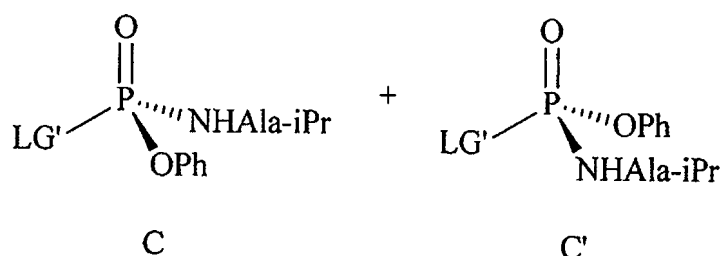
En un cuarto aspecto de la octava modalidad para la preparación de S_p-4 , S_p-4 se purifica adicionalmente mediante la segunda mezcla del S_p-4 purificado al d) agregar gel de sílice a la segunda mezcla o el S_p-4 purificado, seguido por la evaporación del solvente para proporcionar una lechada seca; agitar la lechada seca en una primera combinación de solvente/anti-solvente para obtener una primera lechada húmeda; decantar la primera combinación de solvente/anti-solvente de la primera lechada húmeda para obtener una segunda lechada húmeda y una primera composición; agregar a la segunda suspensión húmeda una segunda combinación de solvente/anti-solvente seguido por agitación; decantar la segunda combinación de solvente/anti-solvente de la segunda lechada húmeda para obtener una tercera lechada húmeda y una segunda composición; opcionalmente repetir las etapas g)-h) en la tercera lechada húmeda o lechadas 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 volver a cristalizar el segundo sólido usando un tercer solvente para obtener un tercer sólido que comprende S_p-4 .

Un experto comprenderá que los compuestos se pueden separar mediante extracción tradicional, cristalización tradicional o técnicas cromatográficas tradicionales. Las técnicas cromatográficas tradicionales incluyen, de modo no taxativo, cromatografía de gel de sílice (usando, por ej., metanol al 3-5% en DCM o isopropanol al 4-6% en DCM) para producir niveles mejorados de un isómero (50-100%) y luego cristalizarlo. De manera alternativa, se podría usar cromatografía de fase inversa (usando, por ej., acetonitrilo al 1-30%-fase móvil acuosa). Además, los compuestos se pueden aislar por medio de cromatografía de fluidos supercríticos SFC con dióxido de carbono como el solvente principal y alcoholes tales como metanol como modificador, preferentemente usando el medio quiral apropiado, tal como Daicel Chiralpack IA. De manera alternativa, se puede emplear cromatografía SMB usando el medio quiral apropiado, tal como Daicel ChiralPack IA, usando una mezcla de solventes tales como hexanos/isopropanol o un único solvente tal como acetato de etilo.

Una novena modalidad se refiere a un proceso para preparar S_p -4, que comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con un 3, protegido por 3'-O o desprotegido y un reactivo básico para obtener una composición que comprende S_p -4 protegido o desprotegido.



donde el isopropil-alanil-fosforamidato está compuesto por una mezcla de diastereómeros representados por las siguientes estructuras:



donde la proporción de **C:C'** es de alrededor de 1:1.

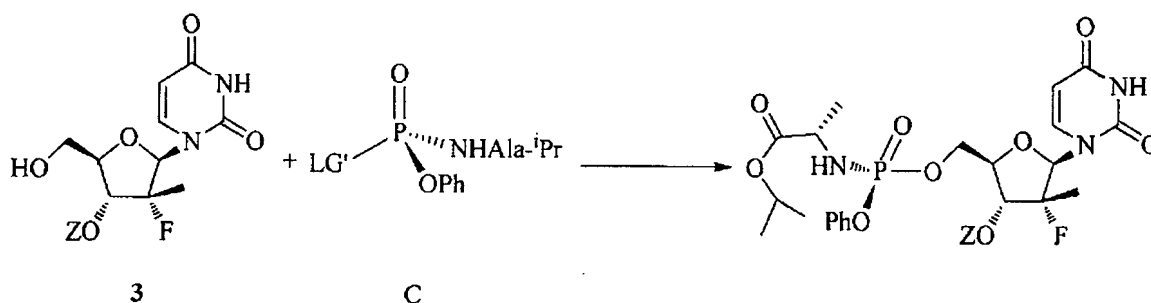
En un primer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de **C:C'** es mayor o igual a alrededor de 1:1.

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

En un tercer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la proporción 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.

En un cuarto aspecto, LG' se selecciona de entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido y pentafluorofenóxido, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la proporción 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.

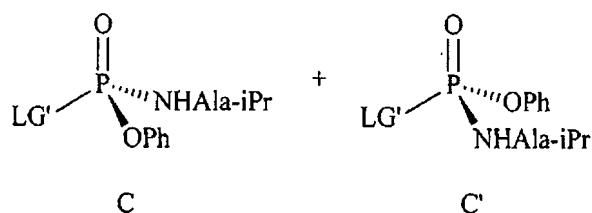
Un quinto aspecto para preparar **S_p-4**, comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fodforamidato (**C**) con un **3** protegido por 3'-O o desprotegido, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende **S_p-4** protegido o desprotegido.



donde Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo saliente y b) opcionalmente someter el **S_p-4** protegido o desprotegido obtenido a cromatografía, extracción o cristalización para obtener un **S_p-4** purificado protegido o desprotegido. En una sub-modalidad, LG' es tosilato, canforsulfonato o un arilóxido sustituido por al menos un grupo electroaceptor; más preferentemente, LG' se selecciona de entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido o pentafluorofenóxido. En una sub-modalidad adicional, cuando **S_p-4** está

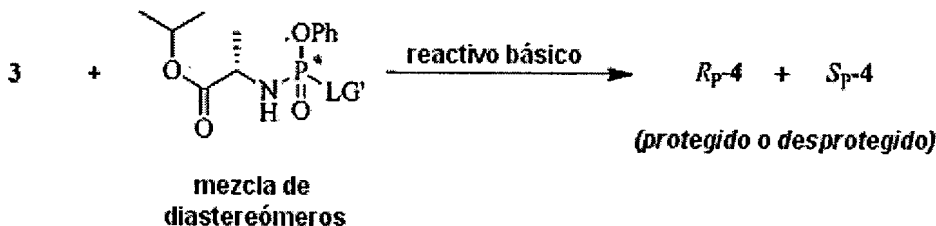
protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso de la novena modalidad se refiere además a desproteger el S_p -4 protegido. En otra sub-modalidad, la reacción se lleva a cabo en un solvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano u otro solvente etéreo ya sea uno solo o los dos combinados o con un nitrilo de C_2 a C_7 , tal como acetonitrilo.

El proceso de la novena modalidad también comprende 1) hacer reaccionar $(LG')P(O)(LG)_2$, donde LG, independientemente de LG' , es un grupo saliente, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ seguido por hacer reaccionar $(LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ 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 hacer reaccionar $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ 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 $(PhO)P(O)(LG)_2$, donde LG es un grupo saliente, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ seguido de hacer reaccionar $(PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ con un precursor de un grupo saliente ($LG'H$) y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,

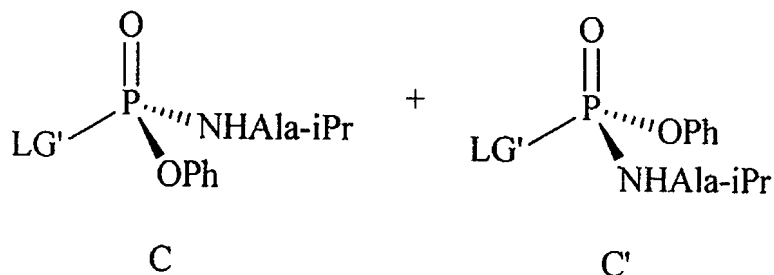


y someter la mezcla a cromatografía o cristalizar la mezcla para obtener **C**. En un aspecto de la novena modalidad, el isopropil alanato está presente como su sal de ácido clorhídrico, que preferentemente es sustancialmente anhidra.

Una décima modalidad se refiere a un proceso para preparar R_p -4, el cual comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con un **3**, desprotegido o protegido por 3'-O y un reactivo básico para obtener una composición que comprende R_p -4 protegido o desprotegido.



donde el isopropil-alanil-fosforamidato está compuesto por una mezcla de diastereómeros, representados por las siguientes estructuras:



donde la proporción de **C':C** es de alrededor de 1:1.

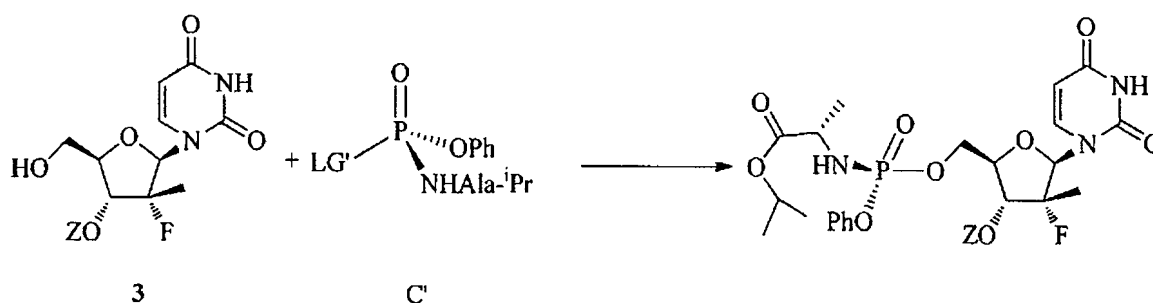
En un primer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de $\text{C}':\text{C}$ es mayor o igual a alrededor de 1:1.

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

En un tercer aspecto, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la proporción 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.

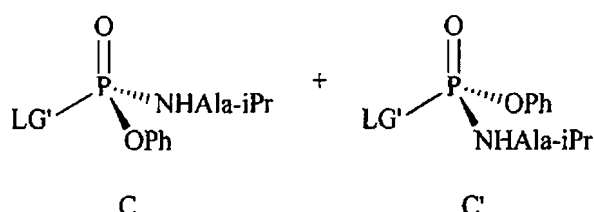
En un cuarto aspecto, el LG' es p-nitrofenóxido, el reactivo básico es cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de C':C es al menos alrededor de 1.5:1, alrededor de 2.3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5.7:1, alrededor de 9:1, alrededor de 19:1, alrededor de 32.3:1, alrededor de 49:1 o alrededor de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

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



donde Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo saliente y b) opcionalmente someter el R_p -4 protegido o desprotegido obtenido a cromatografía, extracción o cristalización para obtener R_p -4 protegido o desprotegido. En una sub-modalidad, LG' es tosilato, canforsulfonato o un arilóxido sustituido por al menos un grupo electroceptor; más preferentemente, LG' se selecciona de p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido y pentafluorofenóxido. En una sub-modalidad adicional, cuando R_p -4 está protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso de la novena modalidad se refiere además a desproteger el R_p -4 protegido. En otra sub-modalidad, la reacción se lleva a cabo en un solvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano u otro solvente etéreo ya sea uno solo o los dos combinados o con un nitrilo de C_2 a C_7 , tal como acetonitrilo.

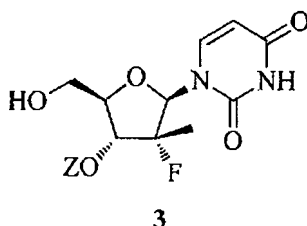
El proceso de la décima modalidad también comprende 1) hacer reaccionar $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})_2$, donde LG, independientemente de LG', es un grupo saliente, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$ seguido por hacer reaccionar $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$ con fenol y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**, (ii) fenol y una primera base para obtener $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{OPh})$ seguido por hacer reaccionar $(\text{LG}')\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{OPh})$ 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 $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})_2$, donde LG', independientemente de LG, es un grupo saliente, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$ seguido por hacer reaccionar $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla-}^i\text{Pr})$ con un precursor de un grupo saliente y una segunda base para obtener una mezcla que comprende **C** y **C'**,



y someter la mezcla a cromatografía o cristalizar la mezcla para obtener **C'**. En un aspecto de la novena modalidad, el isopropil alanato está presente como su sal de ácido clorhídrico, que preferentemente es sustancialmente anhidra.

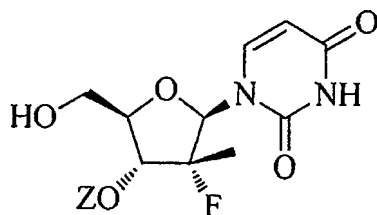
Una decimoprimer modalidad se refiere a una composición obtenida mediante los procesos descritos en la séptima modalidad, la octava modalidad, la novena modalidad, o la décima modalidad, así como sus aspectos correspondientes. Un aspecto de la decimoprimer modalidad se refiere a una composición obtenida mediante cualquiera de las modalidades ejemplificadas que se describen a continuación. La composición así obtenida puede ser cristalina, pseudo cristalina, amorfa o una combinación de estas.

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



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

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



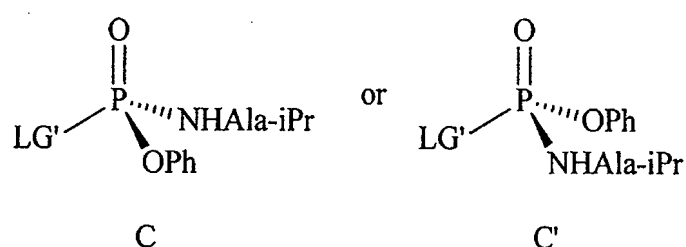
3a: Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃

3b: Z = -C(O)OCH₂Ph

3c: Z = -Si(Me)₂^tBu

3d: Z = -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH

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



donde LG' es un grupo saliente, lo cual es útil para la preparación de S_p -4 o R_p -4.

En un primer aspecto de la decimotercera modalidad, LG' es tosilato, canforsulfonato, un arilóxido o un arilóxido sustituido por al menos un grupo electroaceptor.

En un segundo aspecto de la decimotercera modalidad, LG' se selecciona de entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido y pentafluorofenóxido.

En un tercer aspecto de la decimotercera modalidad, LG' es pentafluorofenóxido o 4-nitrofenóxido.

Un cuarto aspecto de la decimotercera modalidad se refiere al compuesto C, donde LG' es 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido o pentafluorofenóxido.

Un quinto aspecto de la decimotercera modalidad se refiere al compuesto C, donde LG' es 4-nitrofenóxido o pentafluorofenóxido.

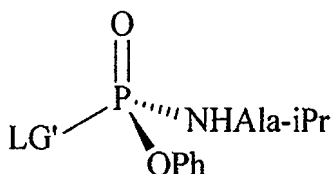
Un sexto aspecto de la decimotercera modalidad se refiere al compuesto C, donde LG' es 4-nitrofenóxido.

Un séptimo aspecto de la decimotercera modalidad se refiere al compuesto C cristalino, donde LG' es 4-nitrofenóxido.

Un octavo aspecto de la decimotercera modalidad se refiere al compuesto C, donde LG' es pentafluorofenóxido.

Un noveno aspecto de la decimotercera modalidad se refiere al compuesto C cristalino, donde LG' es pentafluorofenóxido.

Una decimocuarta modalidad se refiere a un proceso para preparar un compuesto representado por la fórmula estructural



C

cristalizando el compuesto a partir de una composición, que comprende

- a) una primera composición;
- b) un segundo precursor de un grupo saliente;
- c) una base no nucleofílica; y
- d) una composición líquida;

donde la primera composición comprende el compuesto y su diastereómero de base P correspondiente.

En un primer aspecto de la decimocuarta modalidad, la cantidad molar del compuesto y la cantidad molar de su diastereómero de base P son iguales o diferentes.

En un segundo aspecto de la decimocuarta modalidad, la cantidad molar del compuesto es mayor a la cantidad molar de su diastereómero de base P correspondiente o viceversa.

En un tercer aspecto de la decimocuarta modalidad, el segundo precursor del grupo saliente es 2,4-dinitrofenol, 4-nitrofenol, 2-nitrofenol, 2-cloro-4-nitrofenol, 2,4-diclorofenol o pentafluorofenol.

En un cuarto aspecto de la decimocuarta modalidad, LG' es pentafluorofenóxido. En un primer sub-aspecto, el segundo precursor del grupo saliente es pentafluorofenol. En un segundo sub-aspecto, la cantidad de pentafluorofenol varía de alrededor de 0.01 equivalentes molares a alrededor de 10 equivalentes molares con relación a la cantidad molar del compuesto y su diastereómero con base P y todos los equivalentes molares entremedio. En un tercer sub-aspecto, la cantidad de pentafluorofenol varía de alrededor de 0.1 equivalentes molares a alrededor de 1 equivalentes molares con relación a la cantidad molar del compuesto y su diastereómero con base P y todos los equivalentes molares entremedio.

En un quinto aspecto de la decimocuarta modalidad, la cristalización ocurre a una temperatura que varía de alrededor de -10°C a alrededor de +40°C y todos los valores de temperaturas entremedio. En un primer sub-aspecto, la cristalización ocurre a alrededor de temperatura ambiente.

En un sexto aspecto de la decimocuarta modalidad, la base no nucleofílica se selecciona de carbonato de potasio, carbonato de cesio, di-isopropilamina, di-isopropiletilamina, trietilamina, quinuclidina, naftaleno-1,8-diamina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, 1,8-diazabicycloundec-7-eno, 4-dimetilamino-piridina, piridina, una 2,6-di-C₁₋₆-alquil-piridina, una 2,4,6-tri-C₁₋₆-alquil-piridina y mezclas de estos. En un primer sub-aspecto, la base no nucleofílica es trietilamina o 1,8-diazabicycloundec-7-eno. En un segundo sub-aspecto, la base no nucleofílica es trietilamina.

En un séptimo aspecto de la decimocuarta modalidad, la base no nucleofílica se encuentra presente en una cantidad que varía de alrededor de 0.01 equivalentes molares a alrededor de 10 equivalentes molares y todos los equivalentes molares entremedio, con relación a la cantidad molar total del compuesto y su diastereómero con base P. En un primer sub-aspecto, la base no nucleofílica se encuentra presente en una cantidad que varía de alrededor de 0.1 equivalentes molares a alrededor de 1 equivalentes molares y todos los equivalentes molares entremedio, con relación a la cantidad molar total del compuesto y su diastereómero con base P.

En un octavo aspecto de la decimocuarta modalidad, la solubilidad del compuesto es menor a la solubilidad de su diastereómero de base P correspondiente en la composición líquida o viceversa.

En un noveno aspecto de la decimocuarta modalidad, la composición líquida comprende al menos uno de un solvente y un anti-solvente. En un primer sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos uno de un alcohol de C_1 a C_8 , un éter de C_2 a C_8 , una cetona de C_3 a C_7 , un éster de C_3 a C_7 , un clorocarburo de C_1 a C_2 , un nitrilo de C_2 a C_7 , un hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} y un hidrocarburo aromático de C_6 a C_{12} . En un segundo sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos uno de un éter de C_2 a C_8 , un éster de C_3 a C_7 , un hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} , y un hidrocarburo aromático de C_6 a C_{12} . En un tercer sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos un éter de C_2 a C_8 , un éster de C_3 a C_7 y un hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} . En un cuarto sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos uno de acetato de etilo, t-butil-metiléter y hexano. En un quinto sub-aspecto, la composición líquida comprende acetato de etilo y hexano. En un sexto sub-aspecto, la composición líquida comprende t-butil-metiléter y hexano.

En un décimo aspecto de la decimocuarta modalidad, la cantidad de composición líquida varía de alrededor de 1 mL a alrededor de 10 mL por cada gramo de la primer composición y todos los valores mL/g entremedio.

Un decimoprimer aspecto de la decimocuarta modalidad comprende además la adición de compuesto cristalino a la composición. Un primer sub-aspecto comprende además agregar alrededor de 0.1 a alrededor de 1 % en peso y todos los valores de % en peso entremedio, de compuesto cristalino a la primera composición.

Un decimosegundo aspecto de la decimocuarta modalidad comprende además

a) hacer reaccionar PhOP(O)(LG)_2 y $^i\text{Pr-Ala-NH}_2\cdot\text{HCl}$ en presencia de una primera base para obtener $(\text{PhO})\text{P(O)(LG)(NHAla-}^i\text{Pr)}$;

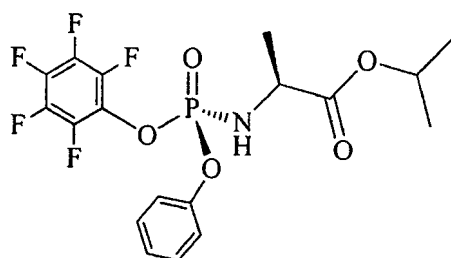
b) hacer reaccionar $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{LG})(\text{NHAla}^i\text{Pr})$ con un primer precursor del grupo saliente ($\text{LG}'\text{H}$) en presencia de una segunda base para obtener la composición que comprende el compuesto y su diastereómero con base P;

donde LG y LG', de forma independiente, son grupos salientes;

donde el primer precursor del grupo saliente y el segundo precursor del grupo saliente son iguales o diferentes; y

donde la primera base y la segunda base son iguales o diferentes.

Una decimoquinta modalidad se refiere a un proceso para preparar 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo cristalino con la siguiente estructura,



que comprende:

cristalizar 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo a partir de una segunda composición que comprende

- a) una primera composición;
- b) pentafluorofenol;
- c) una base no nucleofílica; y
- d) una composición líquida;

donde la primera composición comprende 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo y 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo.

En un primer aspecto de la decimoquinta modalidad, la cantidad molar del 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo y la cantidad molar del 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo son iguales o diferentes.

En un segundo aspecto de la decimoquinta modalidad, la cantidad molar del 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo es mayor que la cantidad molar del 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo.

En un tercer aspecto de la decimoquinta modalidad, la cantidad de pentafluorofenol varía de alrededor de 0.01 equivalentes molares a alrededor de 10 equivalentes molares (y todos los valores de equivalentes molares entremedio) con relación a la cantidad molar de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo y 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo. En un primer sub-aspecto, la cantidad de pentafluorofenol varía de alrededor de 0.1 equivalentes molares a alrededor de 1 equivalentes molares (y todos los valores de equivalentes molares entremedio) con relación a la cantidad molar de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo y 2-(((R)perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo.

En un cuarto aspecto de la decimoquinta modalidad, la cristalización ocurre a una temperatura que varía de alrededor de -10°C a alrededor de +40°C y todos los valores de temperaturas entremedio. En un primer sub-aspecto, la cristalización ocurre a alrededor de temperatura ambiente.

En un quinto aspecto de la decimoquinta modalidad, la base no nucleofílica se selecciona de carbonato de potasio, carbonato de cesio, diisopropilamina, diisopropiletilamina, trietilamina, quinuclidina, naftaleno-1,8-diamina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, 1,8-diazabicycloundec-7-eno, 4-dimetilaminopiridina, piridina, una 2,6-di-C₁₋₆-alquil-piridina, una 2,4,6-tri-C₁₋₆-alquil-piridina y mezclas de estos. En un primer sub-aspecto, la base no nucleofílica es trietilamina o 1,8-diazabicycloundec-7-eno. En un segundo sub-aspecto, la base no nucleofílica es trietilamina.

En un sexto aspecto de la decimoquinta modalidad, la base no nucleofílica se encuentra presente en una cantidad que varía de alrededor de 0.1 a alrededor de 1 equivalentes molares (y todos los valores de equivalentes molares entremedio) con relación a la cantidad molar total de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo y 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo.

En un séptimo aspecto de la decimoquinta modalidad, la solubilidad del 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo es menor a la solubilidad del 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo en la composición líquida.

En un octavo aspecto de la decimoquinta modalidad, la composición líquida comprende al menos uno de un solvente y un anti-solvente. En un primer sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos uno de un alcohol de C_1 a C_8 , un éter de C_2 a C_8 , una cetona de C_3 a C_7 , un éster de C_3 a C_7 , un clorocarburo de C_1 a C_2 , un nitrilo de C_2 a C_7 , un hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} y un hidrocarburo aromático de C_6 a C_{12} . En un segundo sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos uno de un éter de C_2 a C_8 , un éster de C_3 a C_7 , un hidrocarburo saturado de C_5 a C_{12} y un hidrocarburo aromático de C_6 a C_{12} . En un tercer sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos uno de un éter de C_2 a C_8 , un éster de C_3 a C_7 y un hidrocarburo saturado C_5 a C_{12} . En un cuarto sub-aspecto, la composición líquida comprende al menos uno de acetato de etilo, t-butil-metiléter y hexano. En un quinto sub-aspecto, la composición líquida comprende acetato de etilo y hexano. En un sexto sub-aspecto, la composición líquida comprende t-butil-metiléter y hexano.

En un noveno aspecto de la decimoquinta modalidad, la cantidad de composición líquida varía de alrededor de 1 a alrededor de 10 mL por cada gramo (y todos los valores mL/g entremedio) de la primera composición.

Un décimo aspecto de la decimoquinta modalidad comprende además la adición de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo cristalino a la segunda composición.

Un decimoprimer aspecto de la decimoquinta modalidad comprende además la adición de alrededor de 0.1 a alrededor de 1 % en peso (y todos los valores de % en peso entremedio) de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo cristalino en función del peso total del 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo en la primera composición.

Una decimosexta modalidad se refiere a 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo cristalino obtenido mediante el proceso de la decimoquinta modalidad.

Una decimoséptima modalidad se refiere a un proceso para preparar 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetra hidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo, el cual comprende:

cristalizar 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil) amino)propanoato de (S)-isopropilo a partir de una segunda composición que comprende

- a) una primera composición;
- b) pentafluorofenol;
- c) una base no nucleofílica; y
- d) una composición líquida;

donde la primera composición comprende 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo y 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo.

Un primer aspecto de la decimoséptima modalidad se refiere a un proceso para preparar 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo, el cual comprende:

poner en contacto 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo con un producto obtenido al hacer reaccionar haluro de t-butilmagnesio con 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona con un haluro de t-butilmagnesio [sic].

En un segundo aspecto de la decimoquinta modalidad, el contacto ocurre en un medio con una temperatura que varía de alrededor de 0°C a alrededor de 40°C y todos los valores de temperaturas entremedio.

En un tercer aspecto de la decimoquinta modalidad, el contacto ocurre en un medio con una temperatura que varía de alrededor de 0°C a alrededor de 30°C y todos los valores de temperaturas entremedio.

En un cuarto aspecto de la decimoséptima modalidad, la relación molar de haluro de t-butilmagnesio a 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona varía de alrededor de 2 a alrededor de 2.2. En un primer sub-aspecto, la relación molar de haluro de t-butilmagnesio a 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona es de alrededor de 2.1.

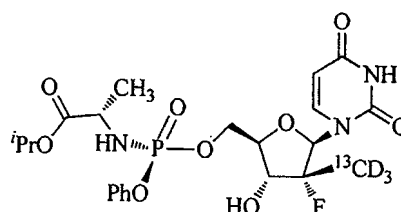
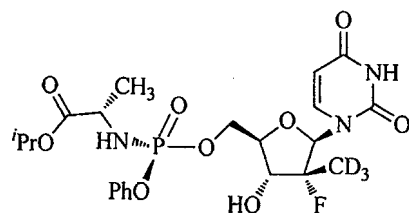
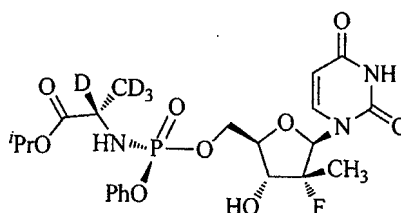
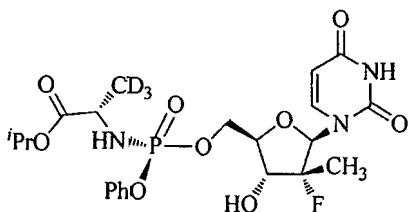
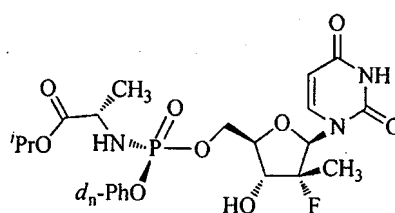
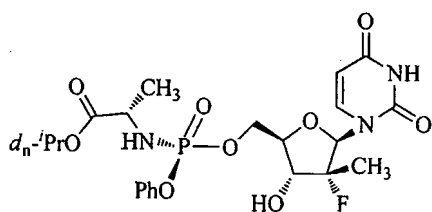
En un quinto aspecto de la decimoséptima modalidad, el haluro de t-butilmagnesio es cloruro de t-butilmagnesio.

Una decimoctava modalidad se refiere a un proceso para preparar 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo sustancialmente puro, el cual comprende:

obtener 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo de acuerdo con cualquiera de las modalidades relevantes descritas en la presente, y

cristalizar el 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino) propanoato de (S)-isopropilo así formado.

Una decimonovena modalidad se refiere un análogo marcado de forma isotópica de R_p -4 o S_p -4. El término análogo "marcado de forma isotópica" se refiere a un análogo de R_p -4 o S_p -4 que es un "análogo deuterado", un "análogo marcado con ^{13}C " o un "análogo deuterado/marcado con ^{13}C ". El término "análogo deuterado" significa un compuesto descrito en la presente, por el cual un isótopo ^1H , es decir, hidrógeno (H), está sustituido por un isótopo ^2H , es decir, deuterio (D). La sustitución con deuterio puede ser parcial o completa. La sustitución parcial con deuterio significa que al menos un hidrógeno está sustituido por al menos un deuterio. Por ejemplo, para R_p -4 o S_p -4, un experto puede contemplar al menos los siguientes análogos parcialmente deuterados (donde " d_n " representa una cantidad n de átomos de deuterio, tal como, para un grupo isopropilo $n = 1-7$, mientras que para un grupo fenilo, $n = 1-5$), así como los representados a continuación.



Pese a que los grupos metilo descritos anteriormente se muestran como completamente deuterados, se reconocerá que las variaciones parcialmente deuteradas también son posibles, tal como, $-\text{CDH}_2$ y $-\text{CD}_2\text{H}$. También se contemplan las etiquetas isotópicas en la furanosa y la base. Asimismo, los términos "análogo marcado con ^{13}C " y "análogo deuterado/marcado con ^{13}C " se refieren a un compuesto descrito en la presente, donde el átomo de carbono está

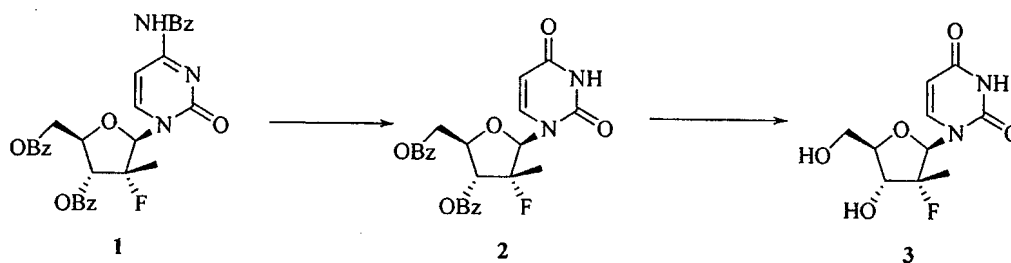
enriquecido con un isótopo ^{13}C , lo que significa que el grado de enriquecimiento excede la abundancia natural general de alrededor de 1.1%.

Ejemplos

Sin pretender limitarse a modo de ejemplo, los siguientes ejemplos sirven para facilitar una mejor comprensión de la descripción.

Aspectos sintéticos

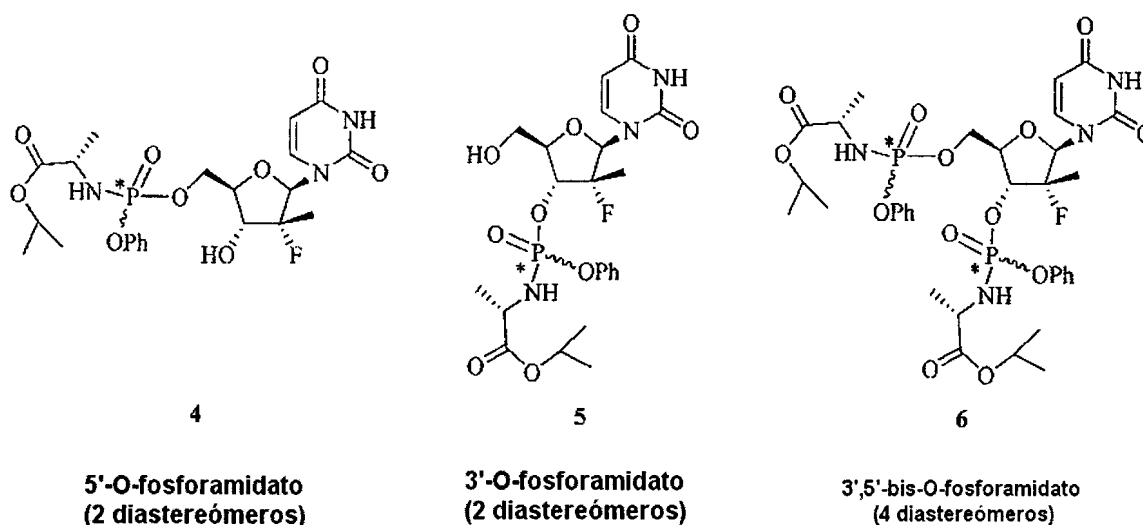
Para preparar el nucleósido de uridina, se podría tomar ventaja de un intermedio de citidina tribenzoilada avanzado en la síntesis de determinados análogos 3',5'-diacilados de **3** (véase a continuación) ya producidos eficazmente en una escala de planta piloto (véase el documento WO 2006/031725 o US 2006/0122146, ambos incorporados mediante esta referencia en su totalidad). Se ha encontrado que el siguiente método es mensurable y rentable.



Se obtiene 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina (**1**) mediante un método descrito en los documentos WO 2006/031725 y WO 2008/045419, los cuales se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. **1** se trata con ácido acético acuoso al 70% para formar 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (**2**). Los ésteres de benzoílo también se pueden hidrolizar a través de una cantidad de métodos, por ej., alcóxidos en un solvente alcohólico, tal como metóxido de sodio en metanol, carbonato de potasio en metanol, o en análogos de etanol, alquilaminas, tales como metilamina en metanol, butilamina, etc. Se eligió amoníaco metanólico para el trabajo a mayor escala. El producto de uridina (**3**) puede purificarse mediante cristalización para proporcionar un 70% de rendimiento de la citidina tribenzoilada (**1**).

Varios procedimientos de la bibliografía detallan diferentes vías y condiciones para fabricar fosforamidatos usando varios más equivalentes de

reactivos. Véase, por ejemplo, McGuigan et ál. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 3504-3515 y McGuigan et ál. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7215. Para el trabajo a escala de procesos, solo existe un ejemplo conocido en la actualidad, que se describe en Lehsten et ál., *Org. Process Res. Dev.* 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). En esta referencia, los autores introducen el concepto de "procedimiento de un solo recipiente", en el cual una sal de clorhidrato de aminoácido y fenil diclorofosfato reaccionan entre sí con N-metilimidazol en diclorometano. Luego se agrega el nucleósido para formar el producto de 5'-O-fosforamidato deseado, que en este caso proporcionaría un compuesto representado por la fórmula 4. Lamentablemente, el procedimiento Lehsten tenía desventajas. Por ejemplo, el procedimiento Lehsten utilizaba un exceso mucho mayor de reactivos de lo necesario lo que hizo más costosa y difícil la purificación cromatográfica. Además, Lehsten sugirió que uno podría controlar la selectividad de la reacción en el 5'-hidroxilo sobre el 3'-hidroxilo comparado con una referencia a la bibliografía por medio del uso de temperaturas más bajas y la adición lenta del nucleósido.



El uso del procedimiento Lehsten para los compuestos descritos en la presente proporcionaron alrededor de 1-5% de diastereómeros 3'-O-fosforamidato monosustituídos (5) y alrededor de 10-30% del producto bis-sustituído (6). Debido a que la polaridad de los 3'-diastereómeros era muy similar a los 5'-diastereómeros (4), la separación cromatográfica fue muy exigente. El aumento proporcional del proceso era casi imposible sin descartar una porción considerable de los 5'-diastereómeros menos polares (4) o aceptar un nivel mayor de contaminación de los 3'-diastereómeros (5). En un aumento proporcional inicial de 50 g, el producto resultante contenía una contaminación del 3'-diastereómero (5) de alrededor de 3%, que se eluyó conjuntamente con el 5'-diastereómero (4) menos polar.

En la presente se describen condiciones de reacción que usan cantidades menores de reactivos y un método para quitar selectivamente la impureza de los diastereómeros 3'-O-fosforamidato (**5**) con una separación cromatográfica más fácil, proporcionando así los diastereómeros 5'-O-fosforamidato deseados en una pureza mucho mayor (**4**).

Para la estequiometría del reactivo, se realizó un estudio en el cual la estequiometría de los reactivos se cambió sistemáticamente y los resultados se monitorearon por NMR fosforosa de la reacción cruda tal como lo informó Lehsten. En las ejecuciones más exitosas se compararon el rendimiento y pureza aislados del producto deseado. Se observó que el 5'-hidroxilo primario reacciona a una velocidad más rápida que el 3'-hidroxilo secundario. Esto crea una situación conflictiva entre el progreso de reacción del consumo de todos los nucleósidos iniciales y la conversión de los productos 5'- y 3'-monosustituídos (**4** y **5**) a los productos 5',3'-bis sustituídos (**6**). El producto 3'-monosustituído se convierte en el producto bis a una velocidad más rápida que el producto 5'-monosustituído, de forma que es posible reducir el nivel de contaminación del 3'-diastereómero empujando la reacción más a los productos bis-sustituídos. Sin embargo, con una forma eficaz de quitar los diastereómeros 3', la reacción se puede optimizar para producir más del diastereómero 5' deseado sin tener que sacrificar tanto diastereómero 5' que se convierte en el bis-sustituído (**6**). También se observó que el clorhidrato de aminoácido es muy higroscópico. Debido a que cualquier cantidad de agua presente consumiría una cantidad equivalente del reactivo de diclorofosfato de fenilo, se debe tener cuidado de mantener el aminoácido sustancialmente anhidro o se debe hacer sustancialmente anhidro antes de su uso. En resumen, Lehsten había informado que la relación óptima de aminoácido a diclorofosfato de fenilo a nucleósido era de 3.5:2.5:1 respectivamente. Se descubrió que la relación óptima de aminoácido a diclorofosfato de fenilo a nucleósido de alrededor de 1.6 a alrededor de 1,3 a alrededor de 1 es óptima en condiciones en las cuales el diastereómero 3' puede quitarse eficazmente y cuando el clorhidrato de aminoácido es sustancialmente anhidro. Por medio del uso de una cantidad menor de reactivos, se realiza un ahorro de costos junto con una simplificación de la separación cromatográfica del producto deseado de los productos derivados del reactivo y del nivel reducido de bis diastereómeros.

En un procedimiento alternativo, un derivado bloqueado por 3'-hidroxi de **3** se preparó usando un grupo bloqueante t-butildimetilsililo en dos etapas. Esto luego se convirtió en su derivado de 5'-fosforamidato. Se deseaba que el grupo sililo se pudiese quitar después y que no hubiese isómeros 3' (**5**) o 3',5'-bis fosforamidatos (**6**). Borch y Fries (patente estadounidense 5.233.031) demostraron un enfoque similar en un rendimiento global bajo en un fosforamidato de alquilo.

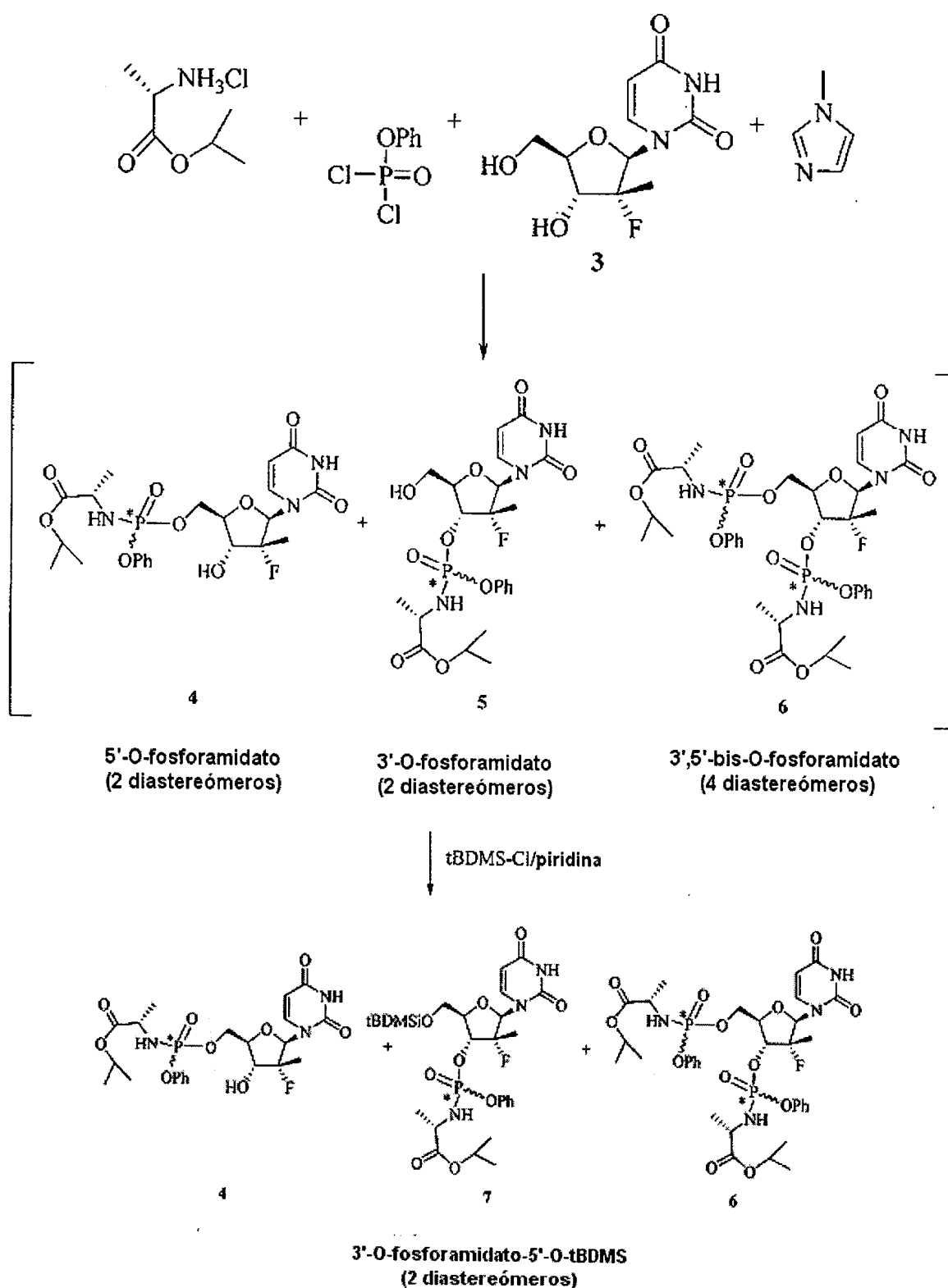
Otro enfoque alternativo era usar la síntesis directa y luego usar química para ayudar a diferenciar las impurezas del diastereómero 3' **5** de los diastereómeros 5' deseados **4** para ayudar a la separación. Se deseaba un grupo que reaccionara selectivamente con el hidroxilo primario libre de la impureza del 3'-O-fosforamidato **5** sobre el hidroxilo secundario libre del 5'-O-fosforamidato **4** deseado. También se deseaba que el grupo bloqueante cambiara de manera significativa la polaridad del producto resultante de 3'-O-fosforamidato bloqueado por 5'-O del 5'-O-fosforamidato deseado **4**. No se necesitaría ninguna etapa adicional para quitar el grupo bloqueante ya que los diastereómeros 5' deseados **4** no se cambiarían. Los diastereómeros 3' químicamente alterados luego permitirían una separación cromatográfica o separación por medio de soportes de barrido especiales o por extracciones más fácil.

Específicamente, el grupo bloqueante terc-butildimetilsililo (tBDMS) cumplía con estos criterios y fue el primero en ser demostrado y utilizado posteriormente en una escala de multi-kilogramos. En ciertas condiciones, tales como piridina como solvente y base, el grupo tBDMS reacciona con alta selectividad en la posición de hidroxilo primaria sobre la posición de hidroxilo secundaria 3'. La reacción de fosforamidato usa N-metilimidazol (NMI) como base. En presencia de NMI, la silación es menos selectiva. Preferentemente, la cantidad de NMI debería reducirse. Esto se puede lograr fácilmente luego de la reacción de fosforamidato por medio del lavado de la solución de reacción con un ácido clorhídrico 1N. El NMI y el nucleósido inicial restante se eliminan, dejando una mezcla cruda de productos mono y bis sustituidos y productos derivados de reactivos. Luego esto se disuelve en piridina y se trata con cloruro de terc-butildimetilsililo. El producto 3'-monosustituido **5** se convierte en 5'-O-tBDMS-3'-O-fosforamidato **7** en unas pocas horas o menos. El progreso de reacción puede monitorearse por HPLC. La polaridad de este producto silado **7** es menor a la del bis-fosforamidato **6** y se quita fácilmente mediante cromatografía. Usando este

método, fue posible reducir el nivel de 3'-monofosforamidato **5** a menos del 0.1% del producto 5' **4** comparado con el 1-3% sin el tratamiento con sililo. De manera similar, el tratamiento con cloruro de dimetoxitriifenilmetilo (DMT-Cl) en las mismas condiciones funcionó de igual forma. También era más fácil identificar el producto de reacción de DMT por TLC, ya que las moléculas que contienen DMT se tiñen de anaranjado brillante luego del calentamiento o exposición a un ácido. También se pueden prever muchos otros grupos bloqueantes, tal como se describe anteriormente.

Tanto las condiciones de reacción como el barrido de la impureza 3' son métodos generales y se podrían aplicar a la mayoría de los fosforamidatos de nucleósido con un hidroxilo 3' libre. El resto de fosforamidato podría ser cualquier combinación de éster de aminoácido y alcohol aromático. El resto de nucleósido podría ser cualquier nucleósido donde un 5' fosforamidato llevaría a un 5'-monofosfato y podría ser metabolizado adicionalmente en su forma de 5'-trifosfato.

El siguiente esquema es el esquema de reacción principal ilustrado para elaborar isopropil L-alanato fenil fosforamidatos de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina con el producto mayor como el 5'-O-fosforamidato deseado (**4**, dos diastereómeros) y el producto menor como el 3'-O-fosforamidato (**5**, dos diastereómeros) y el 3',5' -bis-O-fosforamidato (**6**, cuatro diastereómeros). Los reactivos se agregan en las relaciones estequiométricas tal como se describe en la sección del método de preparación. Se deja continuar a la reacción hasta que alrededor del 5% del material de partida permanece según se juzga mediante visualización UV en cromatografía de capa fina (TLC). Además, la UPLC/MS mostró que aproximadamente un 10% del 3',5' bis-fosforamidato **6** se había formado en comparación con el producto 5' deseado. Luego de la inactivación y un procesamiento acuoso ácido, el residuo crudo de la capa orgánica se preparó para la sililación. Conforme a las condiciones de reacción descritas, el grupo sililo preferencialmente reaccionó con el 5'-hidroxilo libre del 3'-O-fosforamidato para formar **7**. La reacción se continuó hasta que el 3'-O-fosforamidato ya no se podía detectar mediante UPLC/MS.



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

Métodos de preparación

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

En un matraz de 10 L, se agregó 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N⁴-benzoilcitidina (500 g, 0.874 mol) y de ácido acético acuoso al 70% (7.5 L). La solución se calentó a reflujo (110°C) durante 20 h. La TLC indicó que se había completado la reacción (R_f 0.6 en metanol al 5% en diclorometano (DCM)). La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con agua (2 L). Luego de agitar durante 2 h, el precipitado resultante se recolectó 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 intermedio de dibenzoiluridina se usó directamente en la siguiente etapa al agregarlo a amoníaco metanólico recién preparado (5.4 L, ca 25%) a 0°C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 h y luego se dejó calentar hasta 15°C durante 24 h. La TLC indicó que la reacción se había completado (R_f 0.4 en 10% metanol en DCM). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y se concentró a presión reducida para proporcionar el producto bruto (216 g). El producto bruto se agitó con acetato de etilo (325 mL) durante 3 h a temperatura ambiente. El sólido resultante se recolectó por filtración y se lavó con acetato de etilo (216 mL). El sólido se secó al vacío a temperatura ambiente durante 4 h para proporcionar 160 g (78%) del producto deseado en 98.7% de pureza por HPLC.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 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-MS M-1 259.

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

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

Un matraz de 3 cuellos de 5 L se equipó con un agitador mecánico, baño de hielo de salmuera, termómetro interno y una atmósfera de nitrógeno. El matraz se cargó con clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (82.0 g, 0.490 moles) y diclorometano anhidro (0.80 L). Mientras esto se agitaba, se agregó diclorofosfato de fenilo (85.0 g, 0.40 moles) en una porción y se agitó. Mientras que se mantuvo la temperatura interna entre -5 a 5°C, se agregó una solución de N-metilimidazol

(NMI, 250 g, 3.07 moles) en diclorometano (250 mL) durante un período de media hora. La solución se dejó agitar durante 1 h en este intervalo de temperatura. Se agregó 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (**3**, 80.0 g, 0.307 moles) a 0°C en una porción y luego el matraz de reacción se dejó calentar lentamente en el baño de salmuera. Luego de 1 h, la temperatura interna había alcanzado -2°C. La TLC (metanol al 5% en DCM) luego de 1 h mostró que más del 50% del nucleósido se había consumido. Se retiró el baño y el matraz de reacción alcanzó temperatura ambiente durante 1 h más. La TLC luego de 3 h y en un total de 5 h mostró que el 95% del nucleósido de partida se había consumido. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de metanol (100 mL) y la agitación de la reacción durante 5 minutos.

La mezcla de reacción se lavó con HCl 1N (500 mL, 2 veces) seguido de solución de bicarbonato de sodio saturada (500 mL, 2 veces). La capa orgánica separada se secó sobre sulfato de sodio anhidro (50 g) y se filtró. La solución se evaporó a presión reducida y luego a alto vacío hasta sequedad para proporcionar el producto bruto como un aceite viscoso (170 g). Se tomaron las NMR del producto bruto (^{31}P y ^1H). La ^{31}P -NMR indicó que alrededor de un 1% de la integración total de fósforo se debía a la presencia del isómero 3' **5**.

Se agregó piridina anhidra (1700 mL) al producto bruto. El solvente se evaporó a presión reducida y luego a alto vacío para reducir el contenido de agua de la mezcla bruta mediante evaporación conjunta. El aceite resultante se volvió a disolver en piridina anhidra (500 mL) y luego se agregó exceso de cloruro de t-butildimetilsililo (9.0 g, 60 mM). La reacción se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó por UPLC/MS. Después de 3 horas, la impureza de 3' **5** no se pudo detectar más y la reacción se inactivó mediante la adición de metanol (50 mL).

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

El aceite bruto se diluyó con el mismo volumen de diclorometano y se cargó en un cartucho de gel de sílice de 2.5 Kg en un módulo de compresión radial a 100 psi de presión de aire. Usando una bomba de gradiente a 60 psi y una velocidad de flujo de 400 mL/min, el cartucho se lavó con cloruro de metileno (4L) seguido por un gradiente de metanol al 1-4% en cloruro de metileno (48 L). La mayoría de las impurezas más importantes de fosfato de (di-(isopropilalanil)fenilo, 3',5'-bis fosforamidato (**6**), aducto 3'-fosforamidato-5'-TBDMS (**7**)) se eluyeron con ~3% de gradiente. El producto deseado eluyó entre 3 y 4% de metanol. Las fracciones que contenían el producto se clasificaron en dos porciones. La primera contenía pequeñas cantidades de impurezas superiores y la última era producto puro. El primer grupo de fracciones contenía pequeñas cantidades de impurezas menos polares (impurezas superiores) tales como 3',5'-bis fosforamidato y fosfato de di-alanilfenilo y mayormente el diastereómero R_p y requirió una segunda purificación de columna. (La terminología relativa, superior contra inferior, se refiere a la elución en cromatografía de gel de sílice en fase normal, donde el "isómero superior" significa el primer isómero eluyente). El segundo grupo de fracciones no tenía una cantidad importante de impurezas –solamente los diastereómeros R_p y mayormente S_p restantes. Luego se recombino con las fracciones sometidas a cromatografía en columna dos veces. El solvente se evaporó a presión reducida y la espuma blanca resultante se secó adicionalmente (0.20 mmHg) durante 1 h para proporcionar 42 g de la porción impura (4:1 isómero superior contra inferior basado en ^{31}P -NMR) y 38 g de la porción pura (1:3 isómero superior contra inferior). La porción impura se volvió a someter a cromatografía en columna de manera similar para proporcionar 3.8 g de 97% de isómero superior puro (fracción apartada) y 36 g de producto puro en una relación 4:1. Las dos porciones principales se disolvieron en DCM, se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se secaron (50°C, 0.2 mmHg, 24 h) para obtener 74 g (45.7%) de producto puro **4** con una relación diastereomérica de 48:51, como una espuma blanca, pf de alrededor de 75-85°C.

Para producir un sólido amorfo de la mezcla diastereomérica, se agitaron 74 g de la espuma blanca con éter t-butil metílico (750 mL) dando como resultado una solución parcial y un residuo sólido gomoso. Mientras se agitaba, se agregaron heptanos (750 mL) lentamente y la suspensión se agitó mecánicamente durante 1 hora hasta que la mayoría de la goma se convirtió en un sólido blanco. El sólido se reunió con una espátula y la lechada resultante se filtró. El sólido se

lavó con heptanos (50 mL, 4 veces) y se secó al vacío (50°C, 0.2 mmHg, 24 h) para proporcionar un polvo amorfo blanco (64 g) con un amplio rango de fusión de ca 70-80°C. Las ^1H y ^{31}P NMR se adaptaron a la estructura y la HPLC mostró una pureza de 99.8% con una relación diastereomérica de 46:54 (también confirmado por ^{31}P NMR).

Método alternativo para realizar la mezcla sólida de **4**. Luego de la cromatografía, el residuo se evaporó conjuntamente con diclorometano dos veces (5 mL/g) y se secó durante 24 h a 35-40°C a 35-45 mTorr. El residuo espumoso se tamizó a través de una pantalla de 250 micrones y se secó adicionalmente en las mismas condiciones hasta que el diclorometano residual cayó por debajo de 400 ppm, según la medición del espacio de cabeza GC. El polvo fino blancuzco a blanco amorfo resultante tiene un intervalo de temperatura de transición vítrea de 53.7 a 63.5°C.

Caracterización de la mezcla de isómeros (**4**):

^1H -NMR (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, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$, R_P/S_P), 4.46-4.33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-O H, 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 -NMR (CDCl_3) δ 3.60 (R_P), 3.20 S_P relativo a trifenilfosfato a -17.80 ppm. ES-MS $M+1$ 530.2. Análisis elemental: % calculado (incluyendo 0.29% de agua según se encontró mediante análisis de Karl Fisher).

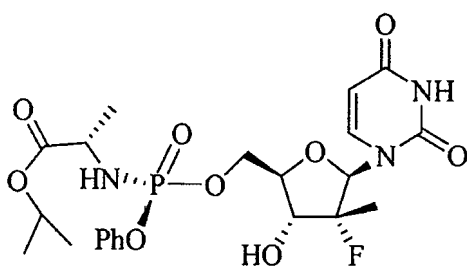
C, 49.75; H, 5.54; N, 7.90, F, 3.58, P, 5.84. % encontrado: C, 49.50; H, 5.44; N, 7.85; F, 3.62; P, 6.05.

Discusión acerca de la separación de isómeros

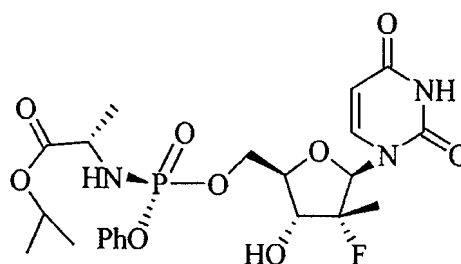
El compuesto **4**, debido a la quiralidad en fósforo, se compone de dos diastereómeros, los cuales se denominan R_P -**4** y S_P -**4**. La asignación

estereoquímica se llevó a cabo según el análisis de rayos X de cristales simple de *S_p*-4. Tanto *R_p*-4 como *S_p*-4 proporcionaron un producto cristalino.

A continuación se resumen los procedimientos para la cristalización.



S_p-4



R_p-4

Ejemplo 3. Cristalización del isómero *R_p*-4. La fracción cromatografiada que contenía el primer isómero *R_p*-4 menos polar y eluyente (3.8 g, 97% puro) se disolvió en isopropanol (36 g) y se diluyó con heptanos hasta quedar turbia (72 g). La solución se sembró y se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El sólido resultante se recolectó por filtración al vacío, se lavó con heptanos (20 mL, 2 veces) y se secó (50°C, 0.2 mm, 24 h) hasta conseguir 2.3 g de agujas blancas muy pequeñas *mp* 136.2-137.8°C. Se descubrió que la pureza por HPLC del material resultante era del 99.02%.

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

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

Método 1: Precipitación directa a partir del producto bruto 4: A una solución agitada de clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (10.5 g, 61.5 mmol, secada azeotrópicamente, dos veces, con 50 mL de tolueno cada vez) en diclorometano (100 mL) se agregó fenil diclorofosfato (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, 384.3 mmol) en 30 mL de diclorometano durante un período de 30 min. Luego de completar la adición, la mezcla se agitó entre -10 y -

15°C durante 1 h. A la mezcla que precede se le agregó 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**) (10 g, 38.4 mmol) en una porción y la mezcla se agitó por debajo de -10°C durante 3 h y luego se dejó calentar lentamente hasta 20°C (6 h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante la noche (15 h) y luego se inactivó con 10 mL de metanol. El solvente se evaporó y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (200 mL). La capa de EtOAc se lavó con agua (100 mL), HCl 1N (75 mL, 3 veces), solución de NaHCO₃ acuosa al 2% (50 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se lavó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se secó a alto vacío durante 2 h para proporcionar una espuma blanca (22 g).

La espuma anterior se disolvió en 33 mL de DCM y luego se agregaron 65 mL de IPE (éter isopropílico) para proporcionar una solución saturada. La solución se filtró a través de una pequeña almohadilla de Celite y el filtrado se agitó con semillas de *Sp-4* durante 72h a temperatura ambiente (alrededor de 22°C –cabe destacar que enfriar la suspensión hasta 0°C provocó la eliminación del aceite del producto bruto). El sólido blanco se filtró, se lavó con IPE (20 mL) y se secó para proporcionar 4.58 g (~85:15 mezcla de *Sp-4*:*Rp-4* respectivamente, determinado mediante ³¹P NMR) de un polvo blanco. El sólido anterior se suspendió en 23 mL de DCM y luego se sometió a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se agitó durante 15 h. El sólido blanco se filtró, se lavó con 4.5 mL de DCM frío y se secó a alto vacío a 45°C para proporcionar *Sp-4* puro, pf 93.9-104.7°C, pureza por HPLC 99.74% (3.11 g, 15.2 % del nucleósido de uridina).

Sp-4 ¹H-NMR (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: Eliminación del aceite del producto bruto **4**: A una solución agitada de clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (20.6 g, 123 mmol, secada azeotrópicamente, dos veces con 75 mL de tolueno cada vez) en diclorometano (200 mL) se agregó fenil diclorofosfato (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 período de 30 min. Luego de completar la adición, la mezcla se agitó entre -10°C y -15°C durante 1h. A la mezcla que precede se le agregó 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**) (20 g, 76.9 mmol) en una porción y la mezcla se agitó por debajo de -10°C durante 3 h y luego se dejó calentar lentamente hasta 20°C (6 h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante la noche (15 h) y luego se inactivó con 10 mL de metanol. El solvente se evaporó y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (400 mL). La capa de EtOAc se lavó con agua (200 mL), HCl 1N (100 mL, 3 veces), solución de NaHCO₃ acuoso al 2% (100 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se secó a alto vacío durante 2 h para proporcionar una espuma blanca (43 g). La espuma anterior se disolvió en 86 mL de EtOAc en un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con un agitador mecánico. Mientras se agitaba, se agregaron 100 mL de heptano lentamente y la suspensión se agitó durante 1 h. La capa superior se decantó y el residuo se agitó nuevamente con 50 mL de 2:3 soluciones de EtOAc/heptanos durante 10 min y luego se decantó. El residuo se secó a alto vacío para proporcionar una espuma blanca (31 g).

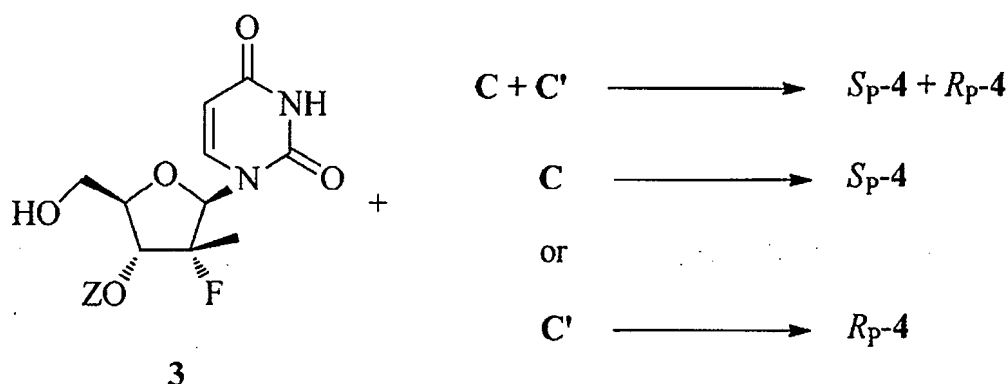
La espuma anterior se disolvió en 46 mL de DCM y luego se agregaron 95 mL de IPE para proporcionar una solución saturada. La solución se filtró con una pequeña almohadilla de Celite y el filtrado se agitó con semillas de *S_p-4* durante 72 h a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró, se lavó con IPE (30 mL) y se secó para proporcionar 7.33 g (~85:15 mezcla de *S_p-4* : *R_p-4* respectivamente determinado mediante ³¹P NMR) de polvo blanco. El sólido anterior se suspendió en 36 mL de DCM y luego se sometió a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se agitó durante 15 h. El sólido blanco se filtró, se lavó con 7.5 mL de DCM frío y se secó a alto vacío a 45°C para proporcionar *S_p-4*, >99% puro (4.78 g, 11.6 % del nucleósido de uridina).

Método 3: Carga de gel de sílice del producto bruto **4**: Se produjeron 5.0 g de producto bruto **4** de la misma manera que la mezcla de diastereómeros justo antes de la etapa de cromatografía en columna, comenzando con aproximadamente 2.5 g de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**). El producto bruto se disolvió en 10 mL de DCM y se agregaron 10 g de gel de sílice a la solución. El solvente se evaporó para proporcionar una lechada seca. La lechada 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 se lavó luego con de MeOH/DCM al 15% (100 mL) y se recolectó por separado. El solvente se evaporó y se secó a alto vacío para proporcionar 4.0 g de residuo (espuma). El residuo se disolvió en DCM (6 mL) y luego se agregaron ~9 mL de IPE para realizar una solución saturada. La mezcla se agitó suavemente durante la noche con semillas de S_p -4 a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró y lavó con IPE (5 mL) para proporcionar 1.28 g del producto. La ^{31}P NMR reveló que el producto que precede contiene una mezcla 77:23 de S_p -4 : R_p -4 respectivamente. Esto se volvió a cristalizar a partir de 20 mL de DCM para obtener 0.75 g de S_p -4 >99% puro (alrededor de 12% del nucleósido de uridina). Esta preparación de S_p -4 no necesita la etapa de sililación de la mezcla, por lo que todo el proceso de reacción se mostró anteriormente. A continuación se presentan aspecto de formas polimórficas y cristalinas simples de S_p -4.

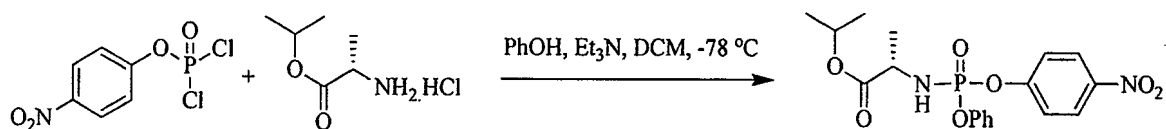
Método 4: Se disolvieron 40.0 g de mezcla 1:1 de 4 en 90 mL de diclorometano. Se agregó éter diisopropílico (70 mL) a la solución anterior para proporcionar una solución saturada. (La cantidad de éter diisopropílico puede basarse en la pureza del producto.) La solución se sembró con S_p -4 puro (> 99%) y la mezcla se agitó suavemente con una barra de agitación a temperatura ambiente durante 20 h (después de 2 h se observó la formación de un sólido). El sólido se filtró, se lavó con 40 mL de la mezcla de diisopropiléter/diclorometano (1:1) y se secó para proporcionar un sólido blanco (16.6 g, S_p -4 89.35 % puro mediante NMR). El sólido se suspendió en 83 mL de diclorometano y se sometió a reflujo durante 3 h. La suspensión se enfrió hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El sólido se filtró y se lavó con 10 mL de DCM frío. El sólido se secó al vacío para proporcionar S_p -4 (13.1 g, 99.48 % puro mediante HPLC). 11g de este sólido se volvieron a disolver en 330 mL de DCM en condiciones de calor. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se dejó a esta temperatura durante la noche. El producto cristalino se filtró y se secó para proporcionar 10.5 g de S_p -4 (99.74 % mediante HPLC).

Los compuestos S_p -4 y R_p -4 pueden prepararse de manera alternativa, de acuerdo con la novena o décima modalidad, haciendo reaccionar un nucleósido (protegido o desprotegido) 3 con un isopropil-alanil-fosforamidato (mezcla de C y C', C o C'), como se muestra en la siguiente ecuación.



P.D. Howes et ál. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2003, Tomo 22, Nos. 5-8, págs. 687-689 ("Howes") describe 2'- y 5'-fosforamidatos obtenidos mediante una reacción con cloruro de t-butilmagnesio. Ahí, Howes describe que cuando un nucleósido de 3'-desoxi-citidina se hace reaccionar con éster metílico del ácido (S)-2-[cloro-fenoxi-fosforilamino] propiónico en presencia de 1.2 equivalentes de cloruro de t-butilmagnesio, ocurre la fosforilación selectiva en la posición 2', pero ocurre la que tiene un equivalente adicional de la fosforilación selectiva de cloruro de t-butilmagnesio en la posición 5'. Esta descripción debería compararse con aquella descrita en el Esquema 1 de Howes.

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

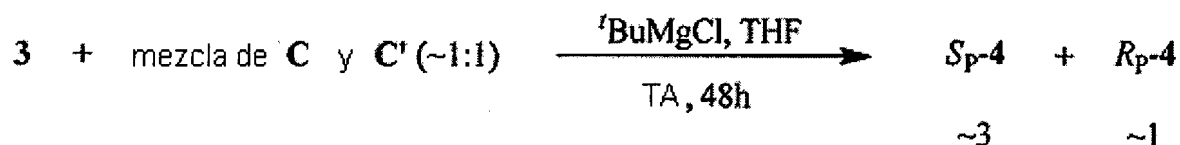


A una solución agitada de fosforodichloridato de 4-nitrofenilo (12.8 g, 50 mmol) en diclorometano (100 mL) se agregó una solución de fenol y trietilamina (7.7 mL, 55 mmol) en diclorometano (100 mL) a -78°C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (8.38 g, 50 mmol) en diclorometano (100 mL) a 0°C. A la mezcla se agregó una segunda porción de trietilamina (14.6 mL, 105 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y luego el solvente se evaporó. El residuo se trituroó con acetato de etilo (150 mL) y el sólido blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido. El compuesto bruto se sometió a cromatografía usando gradiente de acetato de etilo/hexanos al 0-20% para proporcionar el producto (17 g, 83% de

rendimiento) como una mezcla de diastereómeros en una relación de alrededor de 1:1.

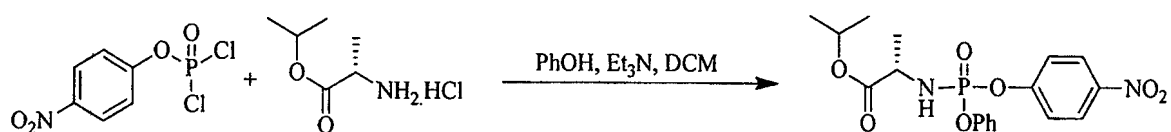
^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.31, -0.47; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.31- 8.27 (m, 2H), 7.51-7.37(m, 4H), 7.27-7.19(m, 3H), 6.70-6.63(m, 1H), 4.85-4.78(m, 1H), 3.97-3.86(m, 1H), 1.21-1.19(m, 3H), 1.11-1.09 (m, 6H); MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -2.05, -2.10; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 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); MS (ESI) m/z 407 (M-1) $^+$.

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



A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (130 mg, 0.5 mmol) en THF seco (1.5 mL) se agregó una solución 1.0 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1.05 mL, 1.05 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un período de 5 min. Luego de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (mezcla de isómeros 1:1, 408 mg, 1 mmol) en THF (1.5 mL) gota a gota durante un período de 5 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 48 h y luego se inactivó 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, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo amarillo pálido. La cromatografía en columna del residuo usando gradiente de MeOH/diclorometano al 0-2% proporcionó un sólido espumoso blanco (125 mg, 47% de rendimiento, mezcla de S_P -4/ R_P -4 en una relación de alrededor de 3.05:1.0).

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



El clorhidrato del éster isopropílico de L-alanina (330 g, 1.97 mol) se secó previamente mediante evaporación conjunta con tolueno (400 mL, 2 veces) a presión reducida y luego se secó en un horno de vacío (50°C, 0.2 mmHg, 17 h). A una solución saturada 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 una temperatura interna de -60°C durante un período de 3 horas. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 minutos adicionales y luego se dejó calentar hasta -5°C durante 2.5 horas. El éster de aminoácido previamente secado se agregó a -5~0°C en una atmósfera de nitrógeno durante 10 min. El residuo de sal de aminoéster en el matraz de adición se transfirió a la mezcla de reacción mediante un enjuague con diclorometano (100 mL, 2 veces). La mezcla se agitó a 0°C durante 40 min y se agregó una segunda porción de trietilamina (571 mL, 4.10 mol) durante un período de 40 min a 0°C. La mezcla se agitó a 0~10°C durante 3 h y luego el sólido blanco (clorhidrato de trietilamina) se retiró por filtración y se enjuagó con diclorometano (300 mL, 3 veces). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se trituró con metil-t-butilico éter (MTBE, 4 L). La sal de sólido adicional formada de esta manera se retiró por filtración y se enjuagó con MTBE (150 mL, 3 veces). El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color pardo claro transparente. El residuo se evaporó conjuntamente con hexanos (140 mL, 2 veces) para eliminar todo MTBE residual y se secó adicionalmente al vacío a 40°C durante 2 horas. El residuo seco se mezcló con éter diisopropílico (IPE, 1.1 L) y se agitó a 5 °C en un baño de agua helada. Se agregó una pequeña cantidad de cristales de siembra del isómero S_p deseado del producto a la solución y la mezcla se agitó a 5°C durante más de 22 h para formar una lechada medianamente espesa. Esto se dejó reposar en un congelador (-10°C) durante 44 h. El producto precipitado se recolectó por filtración y se enjuagó con solventes de IPE y hexanos (1:1, 3 x 190 mL) mezclados y enfriados previamente. El sólido se secó al vacío (0.5 mm Hg) a temperatura ambiente hasta que se obtuvo un peso constante para proporcionar 227.23 g (rendimiento: 28.5%) como un sólido en polvo blanco. La relación de los dos

diastereómeros $S_P:R_P$ fue de 9.65/1 basándose en ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6 , δ -0.31 (S_P), -0.47). El producto se volvió a cristalizar disolviéndolo en IPE (840 mL) mientras se calentaba en un baño a 60°C. La solución anterior se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se agregó una pequeña cantidad de semillas de isómero S_P cristalizado. Se formó un sólido en polvo blanco en un período 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, se lavó con IPE previamente enfriado (50 mL, 3 veces) y se secó al vacío (temperatura ambiente, 0.5 mm Hg) hasta conseguir un peso constante para proporcionar un sólido blanco esponjoso (177.7 g, 22% de rendimiento total o 44% de rendimiento total basado en el rendimiento teórico del isómero S_P) con una relación diastereomérica 48/1 basada en ^{31}P -NMR. Pf 62-66°C.

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.31; ^1H NMR (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, $J=13.6, 10.0\text{Hz}$, 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 NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -2.05; (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0.31; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.22 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.41-7.33(m, 4H), 7.26-7.18(m, 3H), 5.05-4.96(m, 1H), 4.14-4.05(m, 1H), 3.93-3.88(m, 1H), 1.38(d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H), 1.22 (dd, $J=6.2$ & 3.0Hz , 6H); ^1H NMR (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, $J=13.6, 10.0\text{Hz}$, 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)

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

La estereoquímica de **8** (isómero S_P) ha sido confirmada mediante cristalografía de rayos X cristales simples, véanse los detalles al respecto a continuación.

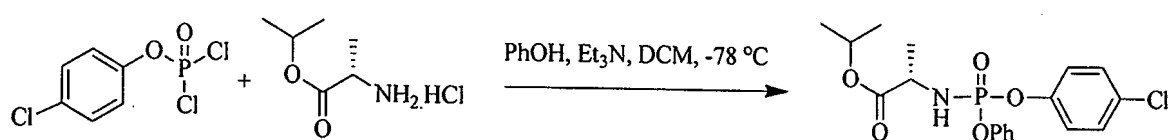
Ejemplo 7. Separación de la mezcla diastereomérica del éster isopropílico del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico mediante SFC

Una muestra de la mezcla de diastereómeros (4.8 g) enriquecidos con el isómero R_P se sometió a SFC usando una columna ChiralPak AD-H (2x15 cm) y se eluyó con isopropanol al 35% en dióxido de carbono a 100 bar. Se usó una carga de inyección de 4 mL de muestra a una concentración de 17 mg/mL de metanol. El isómero R_P de éster isopropílico del ácido [(S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] se eluyó en primer lugar. Las fracciones adecuadas de múltiples ejecuciones se combinaron y concentraron a presión reducida para proporcionar 2.9 g del isómero R_P del éster isopropílico del ácido [(S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico] como un aceite viscoso amarillo claro y 1.9 g del isómero S_P del éster isopropílico 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 antes mencionado.

Datos analíticos para el éster isopropílico del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (8, isómero R_P):

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ - 0.47; ^1H NMR (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); MS (ESI) m/z 407 ($M-1$) $^+$.

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



A una solución agitada de fosforodichloridato de 4-cloro-fenilo (2.45 g, 10.0 mmol) en diclorometano (20 mL) se agregó una solución de fenol (0.94 g, 10 mmol) y trietilamina (1.56 mL, 11 mmol) en diclorometano (20 mL) a -78°C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (1.67 g, 10 mmol) en diclorometano (50 mL) a 0°C .

A la mezcla se agregó una segunda porción de trietilamina (2.92 mL, 21 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y luego el solvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (30 mL) y el sólido blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido. El compuesto bruto se sometió a cromatografía usando gradiente de acetato de etilo/hexanos al 10-20% para proporcionar el producto (2.0 g, 50 % de rendimiento) como una mezcla de diastereómeros en una relación de alrededor de 1:1.

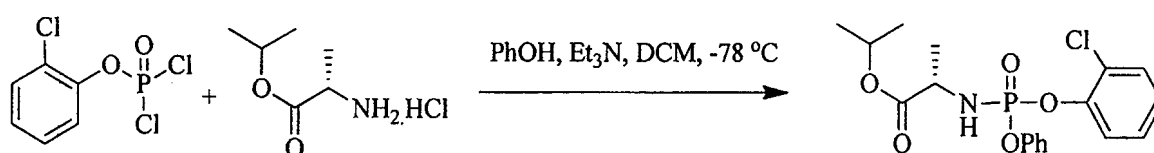
^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -1.58, -1.62; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.06-7.51 (m, 8H), 7.15-7.28 (m, 2H), 7.29-7.47 (m, 2H), 4.0-4.10 (m, 1H), 3.82-3.88 (m, 3H), 1.35-1.36 (dd, 6H); 1.19-1.22 (m, 3H). MS (ESI) m/z 398 ($\text{M}-1$) $^+$.

El producto resultante se purificó por extracción, cristalización o cromatografía, tal como se describe anteriormente.

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-pirimidina-2,4-diona (**3**, 2.6 g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12.4 mL, 21 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, se agregó una solución de **éster isopropílico del ácido (2-[(4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico racémico** (4.08 g, 10 mmol) en THF (15 mL) gota a gota durante un período de 10 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 72. El manchado de dos sustancias en TLC con producto auténtico mostró que alrededor de 5% del producto deseado se había formado en comparación con el nucleósido de partida.

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



A una solución agitada de fosforodicloridato 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 período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (6.7 g, 40 mmol) en diclorometano (150 mL) a 0°C . A la mezcla se agregó una segunda porción de trietilamina (11.6 mL, 84 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y luego el solvente se evaporó. El residuo se trituró con acetato de etilo (100 mL) y el sólido blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido. El compuesto bruto se sometió a cromatografía usando gradiente de acetato de etilo/hexanos al 10-20% para proporcionar el producto (11.3 g, 72 % de rendimiento) como una mezcla de diastereómeros en una relación de alrededor de 1:1.

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -1.58, -1.61; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.06-7.51 (m, 8H), 5.02-5.94 (m, 1H), 4.10-4.16 (m, 1H), 3.31-3.94 (m, 1H), 1.18-1.35 (m, 3H), 1.38-1.40 (dd, 6H); MS (ESI) m/z 398 ($\text{M}-1$) $^{+}$.

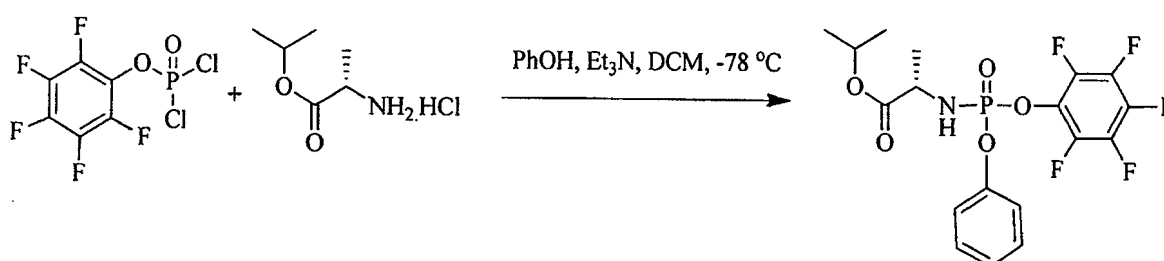
El producto resultante se purificó por extracción, cristalización o cromatografía, tal como se describe anteriormente.

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-metiltetrahidrofuran-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-pirimidina-2,4-diona (**3**, 2.6 g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12.4 mL, 21 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (2-[(2-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico

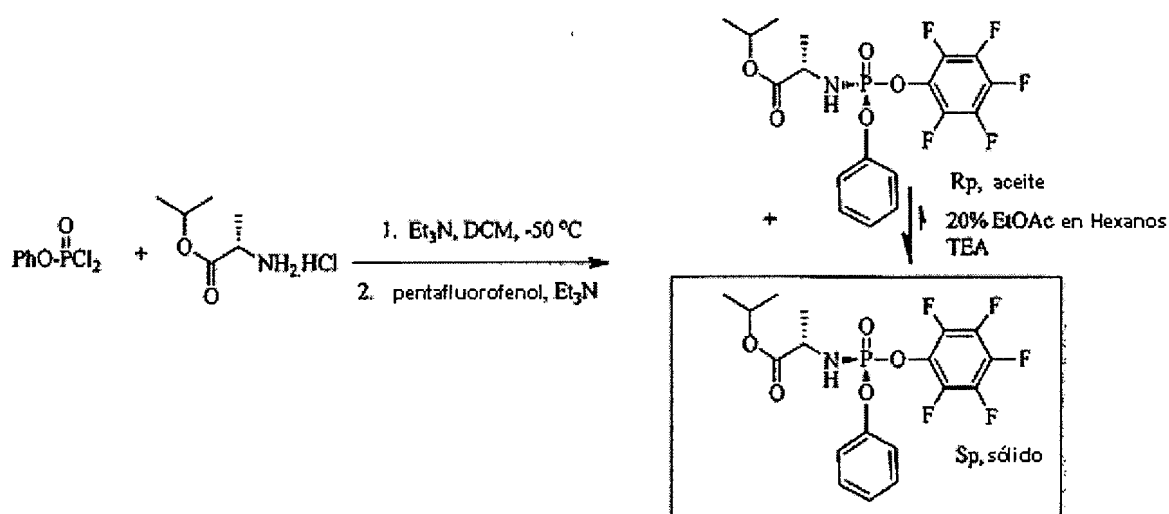
(4.08 g, 10 mmol, racémico) en THF (15 mL) gota a gota durante un período de 10 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 72 h. El manchado de dos sustancias en TLC con producto auténtico mostró que alrededor de 5-10% del producto deseado se había formado en comparación con el nucleósido de partida.

Ejemplo 10-1. Preparación de éster isopropílico 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 período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (3.35 g, 20 mmol) en diclorometano (100 mL) a 0°C . A la mezcla se agregó una segunda porción de trietilamina (5.84 mL, 42 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y luego se evaporó el solvente. El residuo se trituroó con acetato de etilo (60 mL) y el sólido blanco se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido como una mezcla de diastereómeros en una relación de alrededor de 1:1. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -0.49, -0.58. El producto resultante se purifica por extracción, cristalización o cromatografía, tal como se describe anteriormente.

Ejemplo 10-2. Preparación de la mezcla diastereomérica éster isopropílico del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico y aislamiento del diastereómero único éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico mediante resolución dinámica inducida por cristalización con múltiples cosechas.



A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 2 L equipado con un agitador mecánico y un termómetro de temperatura baja, se agregaron 60 g (284 mmol) de diclorofosfato de fenilo y 300 mL de diclorometano anhidro. La solución se enfrió hasta 0°C en una atmósfera de nitrógeno y se agregó sal de clorhidrato de *iso*-propil alanato (secada en un horno al vacío, 47.7 g, 284 mmol) rápidamente como un sólido. La mezcla se agitó y se enfrió hasta -55°C en un baño de acetona-hielo seco. Se agregó una solución de 60.32 g de trietilamina (596 mmol) en 300 mL de diclorometano a través de un embudo de adición durante 70 minutos. La mezcla blanca turbia se agitó a -55°C durante media hora y luego la temperatura se aumentó hasta -5°C lentamente durante 1.5 h. Se agregó una mezcla enfriada previamente (a temperatura ambiente) de pentafluorofenol (52.42 g, 284 mmol) y trietilamina (32.11 g, 317 mmol) en 180 mL de diclorometano a la mezcla a través de un embudo de adición durante 1 h a 0°C y la mezcla resultante se agitó a 0°C durante 4 horas. El precipitado blanco ($\text{TEA}\cdot\text{HCl}$) se retiró por filtración y se enjuagó con diclorometano (50 mL, 3 veces). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo sólido blanco se trituró en 880 mL de éter metil *t*-butílico (TBME) a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión blanca se filtró y el sólido se enjuagó con TBME (150 mL, 3 veces). El sólido se distribuyó en una mezcla de acetato de etilo (600 mL) y agua (150 mL). La capa orgánica se separó y se lavó con agua (100 mL, 3 veces). La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró para proporcionar 29.92 g (66 mmol) de producto (isómero S_p , confirmado por cristalografía de rayos X, *infra*) como un sólido blanco pluma.

El filtrado de la trituración con TBME que precede se concentró a presión reducida hasta conseguir un residuo sólido blanco y el sólido se trituró en 450 mL de acetato de etilo y hexanos mezclados (20:80 v/v) a temperatura ambiente durante 75 minutos. Se recogió sólido (sólido 1) por filtración y se enjuagó con acetato de etilo al 20% en hexanos (75 mL, 30 mL 2 veces). El licor madre se concentró para proporcionar un sólido blancuzco que se trituró en acetato de etilo al 20% en hexanos (185 mL) a temperatura ambiente durante 17 horas. Se recogió un sólido blanco (sólido 2) por filtración y se enjuagó con acetato de etilo al 20% en hexanos (10 mL, 2 veces). El sólido 1 y el sólido 2 se combinaron y se disolvieron en 1.2 L de acetato de etilo. La solución se lavó con agua (150 mL, 3 veces), salmuera (50 mL) y se secó sobre MgSO_4 . La solución se concentró a presión reducida para proporcionar 72.8 g (161 mmol) de producto puro. La cantidad total de producto fue de 102.72 g (226 mmol, 80%).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.38-7.33 (m, 2 H), 7.27-7.24 (m, 2 H), 7.23-7.19 (m, 1 H), 5.04 (hept, 1 H), 4.18-4.09 (m, 1H), 4.01-3.96 (m, 1 H), 1.45 (d, 3 H), 1.25 (dd, 6 H). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz) δ : -0.50.

Ejemplo 10-3: Preparación de mezcla diastereomérica éster isopropílico del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico y aislamiento del diastereómero único éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico mediante resolución dinámica inducida por cristalización en una sola cosecha.

A un matraz seco de tres cuellos de 1 L equipado con un termómetro de temperatura baja y un agitador mecánico, se cargó fosforodichloridato de fenilo (25 g, 118.5 mmol). Se agregó diclorometano anhidro (125 mL) y la solución se enfrió hasta 0°C. La sal de éster de alanina (secada en horno) (19.86 g, 1 eq) se agregó rápidamente en N_2 mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta ca -50°C (temperatura interna (en un baño de acetona/hielo seco en N_2)). Se agregó una solución de trietilamina (25.2 g, 2.1 eq) en DCM (125 mL) gota a gota con un embudo de adición durante 0.5 h a -50°C y la lechada blanca se agitó a alrededor de -50°C durante 0.5 h. La mezcla se dejó calentar hasta 0°C durante 1.5 h y luego se agregó una solución enfriada pre-mezclada de pentafluorofenol (21.82 g, 1 eq) y TEA (13.2 g, 1.1 eq) (cuidado: se libera calor cuando se mezclan el

pentafluorofenol y la TEA) en 75 mL de DCM durante 0.5 h a 0°C mediante un embudo de adición. La mezcla se agitó a 0°C durante 4 h adicionales.

La mezcla se filtró a través de un embudo Büchner y el clorhidrato de trietilamina sólido recogido se enjuagó con DCM (40 mL, 3 veces). El filtrado se verificó mediante ^{31}P -NMR (la relación ca 1.14:1 favoreció al diastereómero S_p - pico campo abajo) y se dividió en dos partes de igual peso. Una de estas se concentró a presión reducida. El residuo sólido blanco (31 g) se trituró en una mezcla de EtOAc y hexanos (150 mL, 20:80, v/v) a TA durante 17 h dejando tiempo para la resolución dinámica del isómero S_p menos soluble. La lechada blanca se filtró y el sólido se enjuagó con EtOAc al 20% en hexanos (25 mL, 2 veces). El sólido (22.58 g) se verificó mediante ^1H -NMR y ^{31}P -NMR y contenía producto como un isómero contaminado con sal de clorhidrato de trietilamina. El sólido se disolvió y se dividió en 310 mL de EtOAc y 100 mL de agua. Luego de separar la capa orgánica, la capa acuosa se retroextrajo con EtOAc (50 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (80 mL, 3 veces), salmuera (50 mL) y se secó sobre MgSO_4 . La solución se concentró a presión reducida y luego se secó a alto vacío a TA hasta un peso constante para proporcionar 17.36 g de producto como un sólido blanco de la mitad de la reacción. El rendimiento fue de 64%. El licor madre anterior se concentró hasta proporcionar un residuo gomoso (7.89 g) que contenía los reactivos con una relación de 1:1.2 (deseado/indeseado) en función de ^{31}P -NMR.

Ejemplo 10-4. Preparación de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico.

Se cargó DCM (11.5 L) en el reactor de vidrio limpio y seco. Se cargó fenildiclorofosfato (2.3 kg, 10.9 mol) al reactor en nitrógeno. Luego la solución se enfrió hasta 0°C. Luego se agregó clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (1.83 kg, 10.9 mol) en una porción y se continuó agitando durante 30 min. La masa de reacción se enfrió hasta -50°C de temperatura interna usando un baño de hielo seco/acetona. Se agregó una mezcla de TEA (2.1 eq, 3.17 L) en DCM (11.5 L) a la solución de reacción anterior lentamente durante un período de 8 h para mantener la temperatura interna entre -40 y -50°C. Luego de completar la adición, la reacción se mantuvo en el mismo rango de temperatura durante alrededor de 1 h. La mezcla se dejó calentar hasta 0°C durante alrededor de 4 h.

Mientras tanto, en otro reactor, se cargó DCM (6.9 L) y luego se agregó pentafluorofenol (2.0 Kg, 10.9 mol) en nitrógeno. La solución se enfrió hasta 0°C, luego se agregó TEA (1.1 eq, 1.65 L) a la solución de pentafluorofenol (exotérmica) durante un período de alrededor de 2 h. A su vez, la solución resultante se agregó lentamente a la primera solución que contenía el diclorofosfato de fenilo y el éster de aminoácido mientras se mantenía la temperatura entre 0 y 5°C durante un período de alrededor de 7 h. Luego de completarse la adición, se continuó agitando en ese intervalo de temperatura durante alrededor de 4 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante HPLC. Cuando quedaba menos que el 5% del pentafluorofenol, la reacción se detuvo. Nótese que la HPLC quiral indicó una mezcla uniforme de diastereómeros del producto en este punto.

La suspensión de reacción se filtró a través de un filtro Nutsche para quitar la mayoría de la sal de clorhidrato de trietilamina suspendida. La torta de sal se lavó con cantidad en exceso de DCM (9 L) y este lavado se agregó al filtrado principal. El filtrado se concentró a presión reducida a 35°C para proporcionar un residuo sólido. El residuo sólido se evaporó conjuntamente con hexano (4 L) para reducir adicionalmente los niveles de DCM residual. A este sólido residual, se agregaron 6 L de MTBE/Hexano al 20% y la suspensión se agitó durante alrededor de 17 h a temperatura ambiente y se monitoreó mediante HPLC. El pH de la solución se mantuvo básico debido a la TEA residual. Durante este tiempo, se llevó a cabo una solución dinámica en la cual el sólido precipitado era el S_p -diastereomero deseado y el sobrenadante se mantuvo en equilibrio entre S_p -diastereomero y R_p -diastereomero.

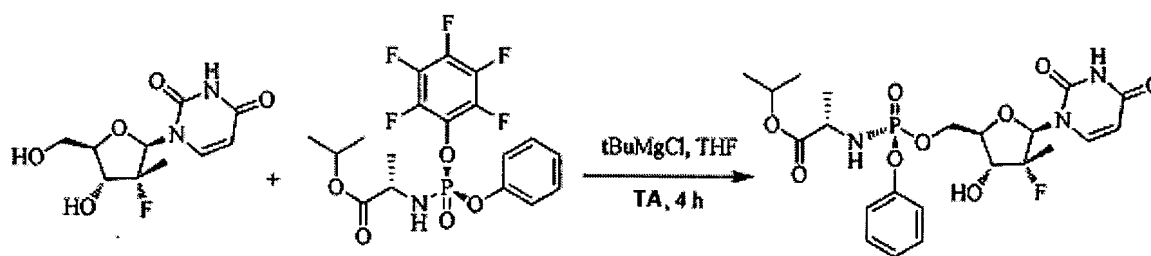
La suspensión se pasó a través de un filtro Nutsche y el producto sólido deseado, todavía contaminado con clorhidrato de TEA, se lavó con MTBE/Hexano al 5% (1 L). El sólido se disolvió en acetato de etilo (35 L) y la solución se lavó con agua (35 L, 3 veces) y salmuera (10 L) y luego la solución se secó sobre sulfato de sodio sólido, se filtró, se concentró a presión reducida, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 44°C. El residuo sólido se evaporó conjuntamente con hexano (4 L). El reactor se trajo a temperatura ambiente y se agregó MTBE/Hexano al 5% (5 L). La suspensión espesa se agitó durante 15 min y luego el sólido se recogió a través de filtración. El sólido recogido se lavó con

hexano (2.5 L) y se secó a alto vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante para proporcionar el producto final (S_p -diastereomero) como un sólido blanco, 2.6 kg (53%); 99.5% puro por HPLC, 0.4% de otro R_p -diastereomero.

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

A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (**3**, 2.6g, 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 período de 15 min. Después de 30 min, se agregó una solución de **éster isopropílico del ácido (2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico** bruto racémico (4.08 g, 10 mmol) en THF (15 mL) gota a gota durante un período de 10 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 72 h. TLC co-spot con producto auténtico mostró que alrededor de 40-50% del producto deseado se había formado en comparación con el nucleósido de partida.

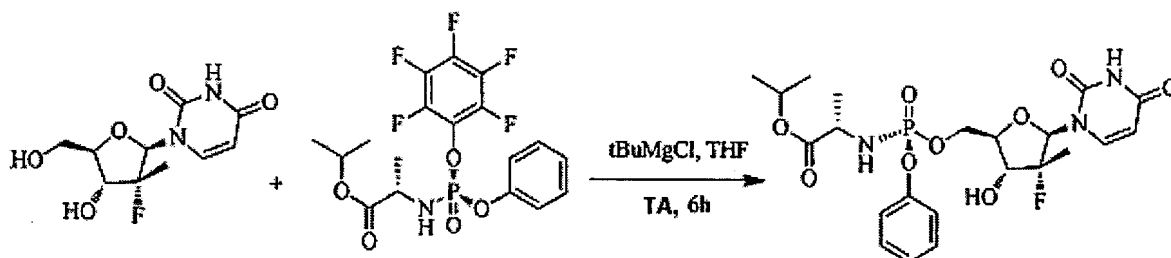
Ejemplo 10-6. Preparación de 2-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino) propanoato de (S)-Isopropilo (S_p -4) usando éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico y purificación solo por cristalización.



A una solución agitada de **3** (10 g, 38.46 mmol, secado al vacío a 50°C durante 20 h) en THF seco (165mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de *tert*-butilmagnesio en THF (47.5 mL, 80.77 mmol) durante un período de 20 min mientras se mantuvo el matraz en una baño de agua fría (5°C) en una atmósfera

de nitrógeno. Luego de completar la adición, el baño frío se quitó y la suspensión blanca se agitó a temperatura ambiente (20°C) durante 30 min. Luego se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico (20.9 g, 46.11 mmol) en THF anhidro (165 mL) a la mezcla de reacción durante un período de 30 min. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (20°C) durante 3.5 h. Se continuó agitando durante 1.5 h adicional, en cuyo momento la TLC indicó >95% de conversión y ninguna diferencia significativa en la intensidad de la impureza de 3',5'-bis-fosforamidato de 2 h. La mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl ac. saturado (10 mL) y luego el solvente se evaporó a 25°C. El residuo se dividió entre acetato de etilo (400 mL) y una mezcla de cloruro de amonio saturado (60 mL)/agua (20 mL). La capa orgánica se separó, se lavó con cloruro de amonio saturado (80 mL) y agua (60 mL, 3 veces). Hasta este momento, la capa acuosa se mantuvo separada. La capa orgánica se lavó con carbonato de sodio ac. al 5% (50 mL, 3 veces) y agua (60 mL, 2 veces). La primera capa acuosa se extrajo con acetato de etilo adicional (100 mL), se lavó con agua (20 mL, 2 veces) y luego la capa acuosa obtenida de los lavados con carbonato de sodio se extrajo con el mismo extracto de acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua (20 mL, 2 veces) y se combinó con la porción principal. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar un sólido espumoso (19.32 g). El residuo se disolvió en 60 mL de diclorometano (se retiró un sólido blanco por precipitación y se formó una torta en alrededor de cinco minutos) y luego se agregaron 25 mL de IPE. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El sólido blanco se filtró, se lavó con mezcla 1:1 de IPE frío /diclorometano (20 mL) (0°C) y se secó para proporcionar 11.77 g (58% de rendimiento) del producto como un sólido blanco amorfo. El sólido anterior se volvió a disolver en diclorometano (350 mL), se filtró y se evaporó a presión atmosférica (temperatura de baño 45 °C) a un volumen de ~120 mL. La solución se dejó reposar a temperatura ambiente (21°C) durante 20 h. El sólido blanco cristalino (solvato de diclorometano) se recogió por filtración, se lavó con diclorometano frío (0°C) (10 mL) y se secó a alto vacío durante 4 h a temperatura ambiente para proporcionar producto puro no solvatado (10.62 g, 52% de rendimiento) como agujas blancas. Pureza por HPLC de 99.8%. Las propiedades espectrales coinciden con los valores informados en la presente.

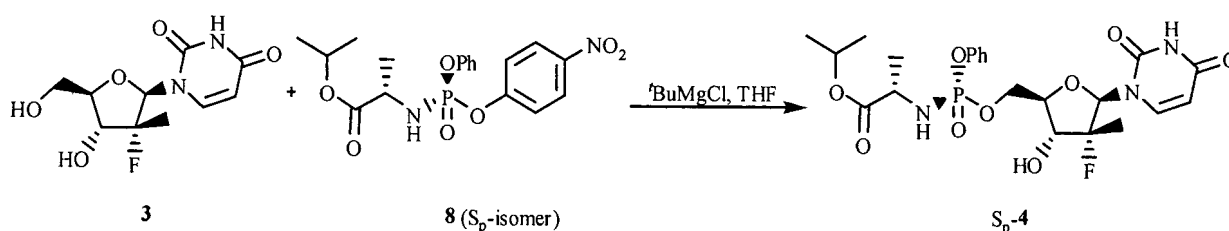
Ejemplo 10-7. Preparación de 2-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino) propanoato de (S)-Isopropilo (*S_p*-4) usando éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico, condiciones de reacción modificadas y procesamiento y purificación solo por cristalización.



A una suspensión agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (3,5.0 g, 19.1 mmol, secado al vacío a 50°C durante 20 h) en THF seco (75 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de terc-butilmagnesio en THF (23.7 mL, 40.35 mmol) usando un embudo de adición durante un período de 30 min a -5°C. La suspensión blanca se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se calentó hasta temperatura ambiente (20°C), a dicha temperatura se agitó durante 30 min adicionales. La mezcla de reacción se enfrió hasta 5°C y luego se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico (10.45 g, 23.06 mmol) en THF (50 mL) durante un período de 30 min. La mezcla se agitó a 5°C durante 18 h, se enfrió hasta -5°C y luego se inactivó con HCl 2N (25 mL). Se agregó tolueno (100 mL) a la mezcla y se calentó hasta temperatura ambiente. Luego de 20 min, las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con HCl 1N (10 mL, 2 veces), agua (10 mL), Na₂CO₃ acuoso al 5% (10 mL, 4 veces), agua (10 mL, 2 veces) y salmuera (10 mL). Todas las capas acuosas se volvieron a extraer con tolueno (20 mL), se lavaron con Na₂CO₃ acuoso al 5% (5 mL, 2 veces), agua (10 mL) y salmuera (5 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta llegar a un volumen aproximado de 20 mL. Se agregó diclorometano (20 mL) a la solución y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El sólido se filtró, se lavó con mezcla 1:1 de MTBE/DCM (10 mL, 2 veces) y se secó a alto vacío para proporcionar un sólido blanco (7.7 g). La HPLC del sólido en este momento indicó un 98.21% de *S_p*-4, 0.18% de **3** sin reaccionar y 0.67% de

impureza de 3'5'-bis-fosforamidato. El sólido anterior de S_p -4 se volvió a disolver en diclorometano (77 mL, calentado en un recipiente a presión a 55°C) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 h. El sólido cristalino se filtró, se lavó con diclorometano frío (5 mL, 0°C) y se secó a alto vacío para proporcionar producto puro como un sólido blanco (6.9 g, 68% de rendimiento, 99.79% puro por HPLC).

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



Ejemplo 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-hidroxi-metil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona **3** (32 mg, 0,12 mmol) en THF seco (1 mL) se agregó una solución 1M de cloruro de t-butilmagnesio (0.26 mL, 0.26 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un período de 3 min. Luego de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero S_p) en THF (0.5mL) gota a gota durante un período de 3 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 42 h y luego se inactivó 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 se concentró. El residuo se sometió a cromatografía usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-4% para proporcionar S_p -4 como un sólido espumoso (29 mg, 44.5% de rendimiento). La ^1H y ^{31}P NMR están 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-hidroxi-metil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (2.6 g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se agregó a una solución 1.7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (12.4 mL, 21 mmol, 2.1 equiv)) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Luego de

30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero S_p , 4.08g, 10 mmol) en THF (15 mL) gota a gota durante un período de 10 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 6 0h [sic] y luego se inactivó 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% (20 mL, 3 veces) y agua (20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo amarillo pálido (3.8 g). El residuo se disolvió en diclorometano (7.6 mL) y luego se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró, se lavó con IPE/diclorometano 1:1 (5 mL) y se secó al vacío para proporcionar el producto puro como un sólido blanco (1.85 g, 35% de rendimiento).

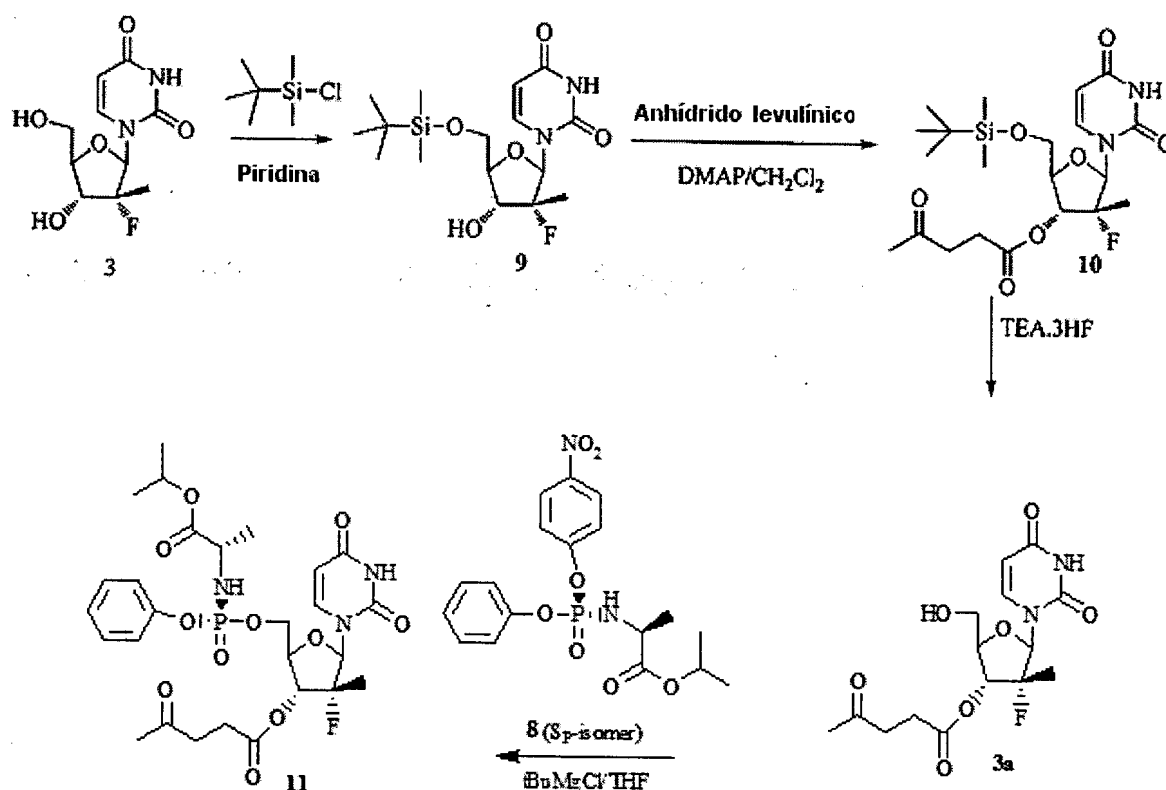
Ejemplo 13. Preparación de S_p -4 usando NaHMDS: A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (71 mg, 0.27 mmol) en THF seco (2.0 mL) se agregó una solución 2.0 M de bis(trimetilsilil)amida de sodio (NaHMDS) en THF (270 μL , 0.54 mmol) a -78°C durante un período de 2 min. Luego de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero S_p , 111 mg, 0.27 mmol) en THF (1 mL) a la mezcla. La mezcla de reacción se dejó agitar a esta temperatura durante 2 h y luego se calentó hasta -20°C , temperatura a la cual se agitó por 20 h adicionales. La TLC indicó ~30% de material de partida de nucleósido sin reaccionar. Por consiguiente, se agregaron 0.5 equivalentes adicionales del reactivo (55 mg, 0.14 mmol) en THF (0.5 mL) a la mezcla de reacción y se agitó durante otras 6 h. La mezcla de reacción se inactivó 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 se concentró para proporcionar un residuo pardo claro. La cromatografía en columna del producto bruto usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-5% proporcionó S_p -4 (22 mg, 15% de rendimiento), 3'-fosforamidato (**5**, isómero S_p , 11.5 mg, 16% de rendimiento) y bis fosforamidato (**6**, S_p , isómero S_p , 12.6 mg).

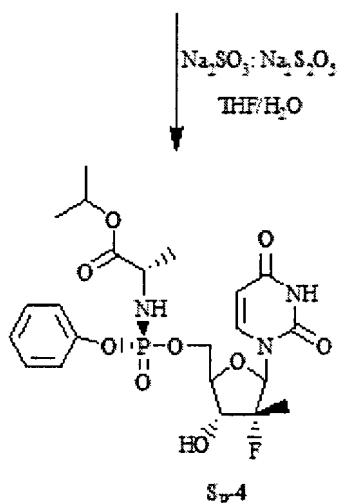
Ejemplo 14. Preparación de R_p -4 (escala de 260 mg): A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H

pirimidina-2,4-diona (260 mg, 1 mmol) en THF seco (6 mL) se agregó a una solución 1.7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1.23 mL, 2.1 mmol, 2.1 equiv) a temperatura ambiente durante un período de 5 min. Luego de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero R_p) en THF (3 mL) gota a gota durante un período de 3 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 96 h y luego se inactivó con NH_4Cl acuoso saturado (10 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo (50 mL) y agua (20 mL, 2 veces). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida para proporcionar un residuo amarillo pálido (490 mg). El residuo se sometió a cromatografía usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-5% para proporcionar el producto como un sólido blanco (160 mg, 30% de rendimiento).

La preparación de S_p -**4** o R_p -**4** también puede lograrse haciendo reaccionar **3** protegido con $3'$ **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** con **3a** como un intermediario sintético





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 TBDMSCI (103.19 g, 685.6 mmol) en piridina seca (500 mL) durante un período de 45 min a temperatura ambiente. La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 24 h. Se agregó metanol (85 mL) a la mezcla de reacción y se dejó agitar durante 10 min y luego los solventes se destilaron a presión reducida. Se agregó agua caliente (45°C) (1 L) a la masa de reacción y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (500 mL, 2 veces), se lavó con agua (500 mL, 1 vez). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El acetato de etilo se retiró por destilación y el residuo obtenido se evaporó conjuntamente con tolueno (500 mL, 2 veces) para proporcionar **9** bruto como una espuma blanca. Rendimiento = 116.9 g (cuantitativo).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.1 (s, 6H), 0.91 (s, 9H), 1.22 (d, 3H, J = 21 Hz), 2.50 (s, 2H), 3.75-4.05 (m, 4H), 5.54 (d, 1H, J = 9 Hz), 5.73 (s, 1H), 6.0 (d, 1H, J = 18 Hz), 7.81 (d, 1H, J = 9 Hz), 8.57 (br, s, 1H), 11.1 (s, 1H).

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 dejó agitar a TA durante 20 min. Se agregó una solución de anhídrido levulínico (133.6 g, 642.3 mmol) en

DCM (200 mL) a la mezcla y se dejó agitar durante 24 h. La TLC de la mezcla indicó que la reacción estaba completa. Se agregó agua fría (500 mL) 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), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego el solvente se destiló a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo. Rendimiento bruto: 197.6 g (135 %). El material se usó tal como está para la próxima etapa.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.11 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 1.34 (d, 3H, $J = 21$ Hz), 2.22 (s, 3H), 2.6-2.89 (m, 4H), 3.72 (m, 1H), 4.01 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4.23 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 5.33 (dd, 1H, $J = 15$ Hz), 5.73 (d, 1H, $J = 6$ Hz), 6.26 (d, 1H, $J = 15$ Hz), 8.12 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 8.72 (br, s, 1H).

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

El **10** bruto (197.6 g, ~312.1 mmol) se disolvió en DCM (1 L) a lo cual se agregó TEA.3HF (50.3 g, 312.1 mmol) y se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. TLC de la mezcla indicó aproximadamente el 50 % de finalización de la reacción. Se agregó otro equivalente de TEA.3HF (50.3 g, 312.1 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 6 h. En este momento, TLC indicó aproximadamente 10 % del material de partida sin reaccionar. Se agregaron otros 0.25 eq de TEA.3HF (12.5 g, 78.0 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción hasta sequedad para proporcionar un aceite amarillo. Se purificó el producto bruto de todas los lotes mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-2% en DCM) para proporcionar 124.1 g de 3'-levulinato como un sólido de espuma blanca (90% de rendimiento purificado en tres etapas a partir de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina).

^1H NMR: (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.55 (d, 3H, CH_3 , $J = 20$ Hz), 2.36 (s, 3H, CH_3), 2.8-3.03 (m, 5H, CH_2CH_3), 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 (S)-isopropílico 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 dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante media hora. A esta mezcla se agregó el reactivo (ca. 97% de pureza quiral) éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (**8**, isómero S_p) (408 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq.) en una porción y se dejó agitar a ta. Luego de 16 h, permaneció ~30% del material de partida. La mezcla de reacción se inactivó con 10 mL de solución de NH₄Cl saturado y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (25 ml, 3 veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad para proporcionar una espuma amarilla pálida (500 mg). Esta se purificó mediante cromatografía en gel de sílice utilizando 2-5% de metanol en cloruro de metileno para proporcionar el producto como una espuma blanca (275 mg) de aproximadamente 97% de pureza quiral P y un material de partida sin reaccionar (162 mg). Con base en el material de partida consumido, el rendimiento fue de 76%.

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): 3.7 ppm; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.22 (dd, 6H, J = 6.4 Hz), 1.37 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.63-2.9 (m, 4H), 4.0 (d, 1H, J = 8 Hz), 4.2-4.33 (m, 1H), 4.57 (d, 1H, J = 8Hz), 4.96-5.00 (sept, 1H), 5.2 (dd, 1H, J = 9 Hz), 5.42 (d, 1H, J = 8Hz), 6.19 (d, 1H, J = 18Hz), 7.15-7.35 (m, 5H), 7.5 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 8.2 (br, s, 1H).

Ejemplo 15-5. Síntesis del éster (S)-isopropílico del ácido (S)-2-[[[(1R,4R,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-hidrox-4-metil-tetrahidro-furan-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino}-propiónico (S_p -4)

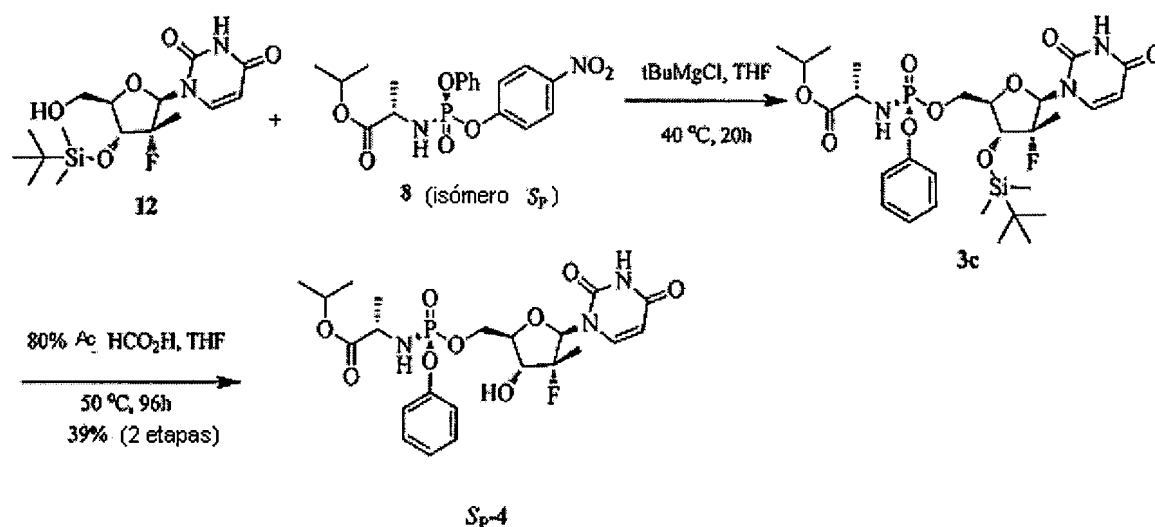
Se preparó una solución de sulfito de sodio agregando Na₂S₂O₃ (1.51 g) y Na₂S₂O₅ (0.57 g) en agua (25 mL). A una solución de levulinato (**11**, 250 mg, 0.40 mmol) en THF anhidro (2.5 mL) se agregó 1.0 ml de solución de sulfito de sodio. Esta se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de la reacción se vertió en agua (15 mL) y se extrajo con acetato de etilo (25 mL, 3 veces), se

secó y se evaporó para proporcionar cuantitativamente un producto sólido blanco con alrededor de 97% de pureza quiral P que coincidía con las propiedades físicas y espectrales de S_p-4 producido directamente a partir del nucleósido desprotegido.

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

A una solución agitada del éster (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 terc-butilmagnesio (1.07 mL, 1.82 mmol) a temperatura ambiente durante un período de 2 min. Inicialmente, se observó un precipitado blanco y luego de 10 min la mezcla de reacción se convirtió en una solución amarillo oscuro. Luego de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8** (isómero S_p), 382 mg, 0.94 mmol) en THF (1.5 mL) gota a gota durante un período de 3 min. La mezcla se calentó a 40°C durante 5 h, en dicho momento la TLC y ¹H NMR indicaron menos de un 2% de material de partida sin reaccionar. La reacción se inactivó con cloruro de amonio saturado acuoso y luego se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se lavó con solución de Na₂CO₃ acuoso al 10% (10 mL, 3 veces), seguido de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar un residuo de color pardo (410 mg). El producto bruto 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 dicha etapa se observó solo alrededor de 10% de conversión por TLC, por lo que se agregaron el sulfito de sodio (74 mg) y metabisulfito de sodio (448 mg) adicionales y se continuó calentando por 52 h adicionales. En este momento, se observó alrededor de 40% de conversión por TLC. La mezcla de reacción se dividió entre agua y acetato de etilo. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar un residuo pardo (210 mg). La cromatografía en columna del residuo utilizando gradiente de MeOH/DCM al 0-5% proporcionó material de partida sin reaccionar (89 mg) y S_p-4 (57 mg, 18% de rendimiento, 24% basándose en material de partida recuperado).

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



Ejemplo 17-1. Preparación de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilaniloxy)-3-fluoro-5-hidroxi-3-metil-tetrahidro-furan-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona, 12.

A una solución de 3 (10.0 g, 38.43 mmol) en piridina (50 mL) se agregó diclorometano (50 mL). La solución se enfrió a 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. Se agregó metanol (5 mL) para inactivar la reacción. La solución se concentró hasta sequedad a 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 se secó (sulfato de sodio, 4 g). El solvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (100 mL). A la solución se le agregó imidazol (7.83 g, 115 mmol) y cloruro de t-butildimetilsililo (8.68 g, 57.6 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se agregó metanol para inactivar la reacción (5 mL) y el solvente se retiró a 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 se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 10-40% en hexano) para proporcionar el producto intermedio 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS. A su vez, esto se trata con ácido trifluoroacético al 1% en diclorometano (200 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregó agua (20 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. Se agregó metanol (5 mL) lentamente y la solución se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. Se agregó hidróxido de amonio para ajustar el pH de la solución a 7. La solución orgánica se

separó, se secó (sulfato de sodio, 4 g) y se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con gel de sílice (metanol al 1-5% en diclorometano) para proporcionar **12** como un sólido blanco 7.5 g en 50% de rendimiento en las tres etapas.

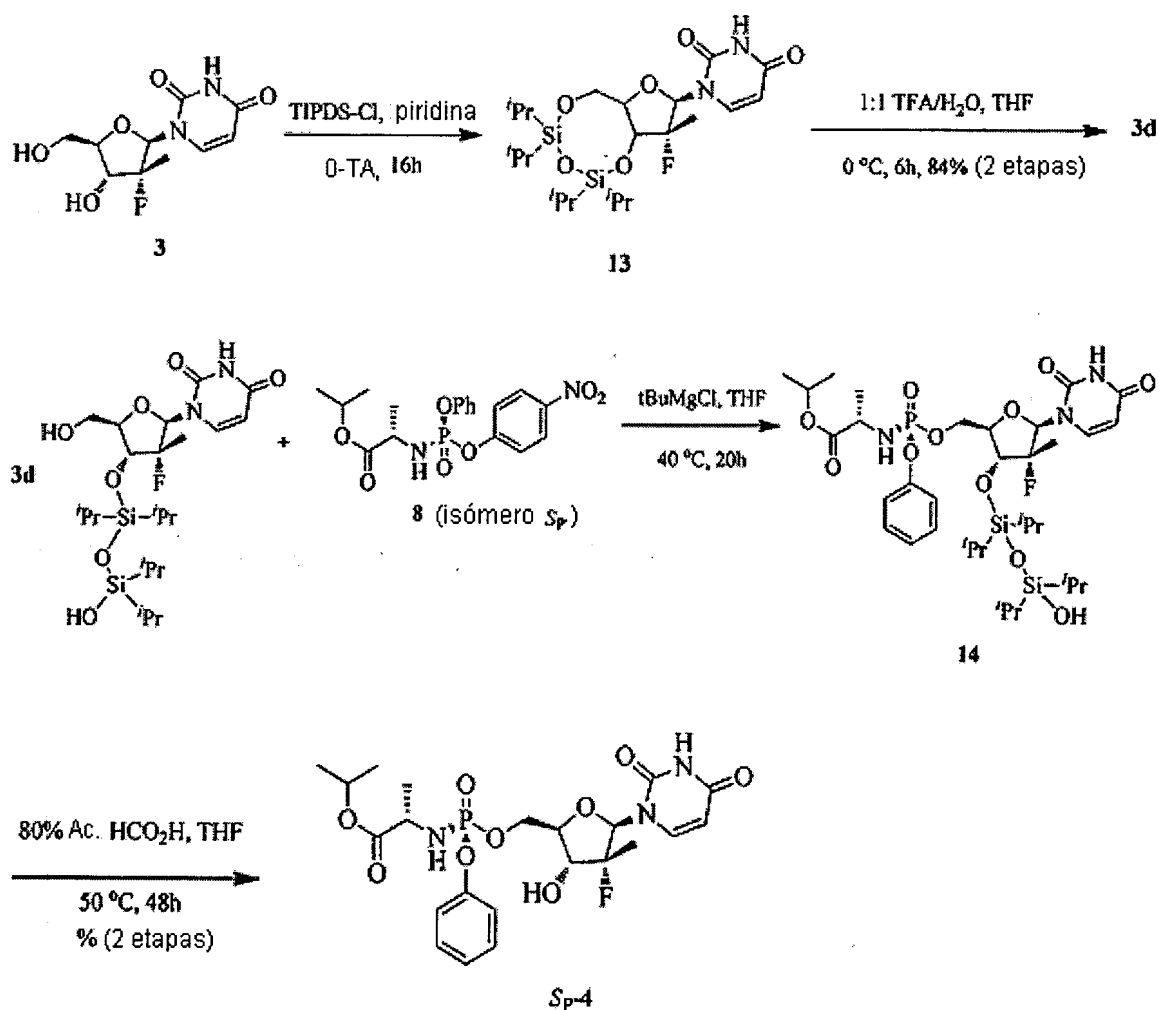
^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 11.48 (br s, 1H, NH), 7.94 (d, 1H, H-6), 6.00 (d, 1H, H-1'), 5.69 (d, 1H, H-5), 4.06 (dd, 1H, 3'-H), 3.85 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3.58 (br d, 1H, H-5'b), 1.27 (d, 3 H, 2- CH_3), 0.89 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.12 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

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

A una solución agitada de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona (**12**, 374 mg, 1 mmol) en THF seco (3 mL) se agregó una solución 1.7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1.8 mL, 3.1 mmol) a temperatura ambiente durante un período de 2 min. Inicialmente, se observó un precipitado blanco y luego de 10 min, la mezcla de reacción se convirtió en una solución amarillo oscuro transparente. Después de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (**8**, isómero S_p , 653 mg, 1.6 mmol) en THF (2.5 mL) gota a gota durante un período de 3 min. La mezcla se calentó a 40°C durante 20 h, en dicho momento la TLC y ^1H NMR indicaron menos de un 5% de material de partida sin reaccionar. La mezcla de reacción se inactivó con cloruro de amonio saturado acuoso y luego se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con solución de Na_2CO_3 acuoso al 10% (10 mL, 3 veces), seguido de agua (20 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar un residuo pardo que contenía 3c (850 mg). El producto bruto se disolvió en tetrahydrofurano (2 mL) y se agregaron 0.8 mL de ácido acuoso al 80% a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 96 h. Se observó alrededor de 70% de conversión por TLC. La mezcla de reacción se vertió en bicarbonato de sodio saturado acuoso frío y luego se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar un residuo pardo (220 mg). La cromatografía en columna del residuo utilizando

gradiente de MeOH/DCM al 0-5% proporcionó material de partida sin reaccionar (21 mg) y S_p -4 (77 mg, 35% de rendimiento, 39% de rendimiento basándose en el material de partida recuperado).

Ejemplo 18. Preparación de S_p -4 con 3d como un intermedio 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 período de 15 min. La mezcla se dejó calentar lentamente hasta temperatura ambiente, a dicha temperatura se agitó durante 16 h. La piridina se evaporó y el residuo se evaporó conjuntamente con tolueno (50 mL). Luego el residuo fue triturado con hexanos y el precipitado blanco se retiró por filtración usando una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido espumoso (12.97 g). El producto bruto (13) se volvió a disolver en tetrahidrofurano (75 mL) y se agregó una solución acuosa de TFA (75

mL, 1:1 TFA/agua) a 0°C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 6 h. La TLC indicó ~5% de material de partida. La mezcla de reacción se inactivó con una solución de NaHCO₃ acuosa saturada hasta llegar a pH 8 y luego se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó con agua, se secó y se concentró para proporcionar un sólido blanco cristalino. La trituración adicional del sólido con hexanos (30 mL) proporcionó un sólido blanco, el cual se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar **3d** (10.1 g, 84 % de rendimiento en 2 etapas).

¹H NMR (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).

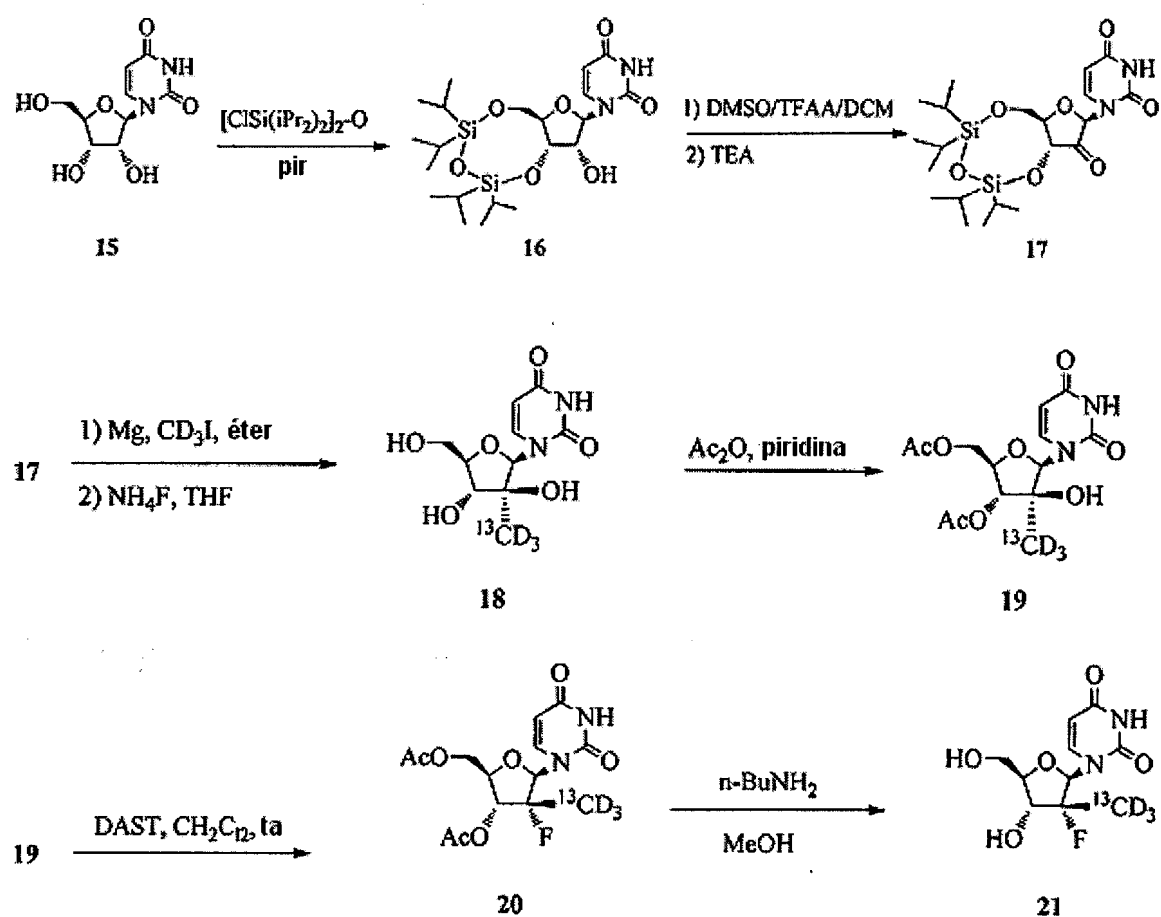
Ejemplo 18-2. Preparación de S_p-4

A una solución agitada de **3d** (520 mg, 1 mmol) en THF seco (5 mL) se agregó a una solución 1.7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1.8 mL, 3.1 mmol, 3.1 equiv) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Luego de 30 min, se agregó una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (**8**, isómero S_p, 653 mg, 1.6 mmol) en THF (1 mL) gota a gota durante un período de 3 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 60 h. La ¹H y ³¹P NMR se la muestra en bruto indicó una mezcla de diastereómeros en alrededor de 1:0.76. La mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (20 mL). La mezcla se dividió entre acetato de etilo (150 mL) y, secuencialmente, Na₂CO₃ acuoso al 10% (20 mL, 3 veces) y agua (20 mL). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo amarillo pálido (**14**, 878 mg).

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 20 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y luego se inactivó con bicarbonato de sodio saturado acuoso (pH 7.0). Luego la mezcla de reacción se dividió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para proporcionar 560 mg del residuo. El residuo

se sometió a cromatografía usando gradiente de metanol/diclorometano al 0-5% para proporcionar material de partida sin reaccionar (**14**, 242 mg) y **S_p-4** (80 mg, 15% de rendimiento) como un sólido blanco.

Ejemplo 19. Preparación de **S_p-4** marcado isotópicamente



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

Se evaporó uridina (**15**, 100.0 g, 409.5 mmol) a sequedad conjuntamente 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. Luego de agitar la suspensión fina durante 17 h a temperatura ambiente, la reacción se inactivó agregando metanol (20 mL) y luego se concentró a presión reducida. El residuo se dividió entre acetato de etilo (1.5 L) y agua (2 L). La capa orgánica se lavó adicionalmente con ácido clorhídrico al 5% (1 L, 2

veces), salmuera (500 mL), se secó sobre sulfato de sodio (50 g), se filtró y se concentró a presión reducida hasta proporcionar el producto bruto, 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 al 20-65%. Las fracciones de producto puro, según se determinó por TLC homogénea (R_f 0.55 in 1:1 hexanos-acetato de etilo), se combinaron a presión reducida y se secaron (40°C, 0.2 mm Hg, 24 h) para proporcionar 145.5 g (76%) de **16** como un sólido blanco espumoso. También se recogió una fracción adicional (35 g) de **16** ligeramente impuro.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 11.35 (s, 1H, NH), 7.66 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H -6), 5.57 (d, 1H, J = 4.8 Hz, 2'-OH), 5.50-5.49 (m, 2H, 1'- H y H -5), 4.14-4.18 (m, 3H, 2', 3', 4'- H), 3.97-3.87 (m, 2H, 5'- H_a y H_b), 1.02-0.95 (m, 28H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

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)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, 17

A un matraz seco redondo de tres cuellos se agregó DCM anhidro (600 mL) y DMSO (30.82 g, 394.5 mmol). La solución se enfrió hasta -78°C en un baño de hielo seco/acetona en una atmósfera de nitrógeno. Se agregó anhídrido trifluoroacético (puro, 77.7 g, 369.8 mmol) con una jeringa durante 40 min y proporcionó una mezcla turbia. A la mezcla se agregó una solución de derivado de uridina **16** en DCM (600 mL) gota a gota durante 75 min a -78°C mediante un embudo de adición. La mezcla heterogénea se agitó durante 2 h a -78~-65°C y luego se agregó trietilamina anhidra (92 mL) rápidamente con una jeringa para formar una solución transparente amarillo claro. Luego de 1 h a baja temperatura, la reacción se completó como se mostró por TLC (EtOAc al 30% en hexanos). El baño de enfriamiento se quitó y la mezcla de reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se inactivó mediante la adición de NH_4Cl sat. (180 mL). Se agregó agua (200 mL) y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se volvió a extraer con DCM (300 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (400 mL, 3 veces), salmuera (150 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 . Al quitar el solvente se obtuvo un residuo pardo pegajoso.

El residuo de aceite bruto (contenía rastros de DCM) se almacenó en el congelador durante la noche. Después de la noche se observó un poco de cristal

sólido en el aceite. El aceite se disolvió en 500 ml de hexanos a temperatura ambiente. La solución se almacenó en el congelador durante 24 horas y se formó más sólido. El sólido se recogió mediante filtración y se enjuagó con DCM al 10% en hexanos (1 L) para quitar la mayoría del color anaranjado. El sólido (**17**) se secó al vacío durante 2 h y luego se secó al aire durante 24 h. El sólido pesaba 21 g luego de secarse a 50 °C al vacío. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (acetato de etilo al 10-70% en hexanos) para proporcionar 37 g adicionales (rendimiento combinado del 97%) de **17** como un sólido anaranjado claro.

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

Magnesio (3.53 g, 147 mmol), lavado con ácido clorhídrico al 5% y secado (50°C, 0.2 mmHg, 24 h), se colocó en una matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con un agitador magnético y un condensador. El recipiente se llenó con gas de argón y luego se agregó éter anhidro (80 mL). Al magnesio en éter se le agregó yoduro de metilo - perdeuterio ¹³C (15.06 g, 110.3 mmol) lentamente, lo cual generó una reacción exotérmica. Luego de que la mezcla de reacción se enfrió, el sobrenadante se transfirió a una solución de compuesto **17** seco (50°C, 0.2 mmHg, 15 h) (10.0 g, 20.63 mmol) en THF anhidro (1 L) a -50°C durante 20 min. La temperatura se dejó aumentar hasta -40°C y la mezcla se agitó a entre -40 y -25 °C durante 4 h. Luego de completada la reacción, la mezcla se diluyó con EtOAc (1 L) a -50 °C y luego se agregó salmuera (300 mL) lentamente. La capa orgánica se separó y luego se lavó con solución de cloruro de amonio saturado (300 mL, 2 veces) y se secó con sulfato de sodio. Luego de la filtración y concentración a presión reducida, el residuo se disolvió en MeOH (250 mL). Se agregaron fluoruro de amonio (12 g) y TBAF (400 mg). La mezcla resultante se agitó a 90°C durante 7 h y luego se concentró con gel de sílice (20 g) a presión reducida. Luego de secar al vacío rigurosamente, el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:20 a 1:10) para proporcionar el compuesto **18** (5 g, 46%) como un sólido blanco.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 11.26 (s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-6), 5.77 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H-1'), 5.57 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.46 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, HO-3'), 5.24 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, HO-2'), 5.14 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, HO-5'), 3.74-3.56 (m, 4H, H-3', 4', 5', 5'').

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

A una solución del compuesto **18** (5.00 g, 19.1 mmol) en piridina anhidra (100 mL) se agregó anhídrido acético (3 mL) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 h, se diluyó con EtOAc (250 mL), se lavó con agua (50 mL, 3 veces) y se secó con sulfato de sodio. Luego de la filtración y concentración, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH de 0 a 5% en CH_2Cl_2) para proporcionar el compuesto **19** (4.0 g, 68%) como un sólido gris.

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

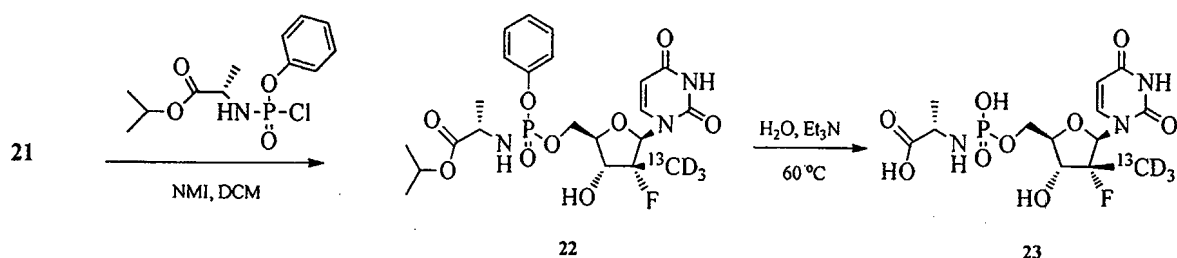
A una solución del compuesto **19** (2.33 g, 6.73 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (60 mL) se agregó DAST (1.33 mL, 10.1 mmol) lentamente a -78°C . La mezcla resultante se agitó durante 30 min y luego se expuso a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo dos reacciones de escala de 2.33 g y una reacción de escala de 1.00 g adicionales exactamente de la misma forma. Las cuatro mezclas de reacción se combinaron, se diluyeron con CH_2Cl_2 (300 mL) y se lavaron con agua helada (100 mL, 2 veces) y luego solución de NaHCO_3 acuoso frío (100 mL, 2 veces). Luego del secado, filtración y concentración, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc de 0% a 50% en hexanos, el compuesto salió a alrededor de 48%) para proporcionar el compuesto **20** (2.0 g, 24% de un total de 7.99 g del compuesto **19**) como un sólido blanco.

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 8.27 (s, 1H, NH), 7.55 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-6), 6.17 (d, 1H, $J = 18.8$ Hz, H-1'), 5.78 (dd, 1H, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-5), 5.12 (dd, 1H, $J = 9.6, 21.6$ Hz, H-3'), 4.40-4.31 (m, 3H, H-4', 5', 5''), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.15 (s, 3H, CH_3).

Ejemplo 19-6. Preparación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3- ^{13}C -perdeuteriometil-tetrahidrofuran-2-il)pirimidina-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 15 h y se concentró con gel de sílice al vacío. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida con gel de sílice (MeOH de 0 a 10% en CH_2Cl_2) para proporcionar el compuesto **21** (1.3 g, 85%) como un sólido blanco.

^1H NMR (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''), ESMS ($M+1$) estimado 265, observado 265.



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

A una solución del nucleósido desprotegido **21** (207 mg, 0.783 mmol) y *N*-metilimidazol (0.4 mL, 5 mmol) en THF (4 mL) se agregó el fosforocloridato pre-fabricado en THF (1.0 M, 2.35 mL, 2.35 mmol) a 0°C gota a gota. La reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente durante 1 hora y luego se agregó agua (1 mL) y EtOAc (5 mL). La solución orgánica se lavó con citrato de sodio

monobásico ac. sat. (2 ml, 2 veces), NaHCO₃ ac. sat. (2 ml, 1 vez), se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de sílice usando ⁱPrOH de 0 a 5% en CH₂Cl₂ como eluyentes para proporcionar el fosforamidoato, 22 (216 mg, 52%, 1:1 mezcla de diastereómeros P) como un sólido blanco:

¹H NMR (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 NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.90, 4.77; LRMS (ESI) [M + H]⁺ calculado para C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534.5, encontrado 534.4.

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

Se suspendió fosforamidoato 22 (147 mg, 0.276 mmol) en trietilamina (2 mL) y agua (0.5 mL) y se calentó a 60°C durante 30 h. Luego se evaporaron los componentes volátiles a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de sílice eluyendo con ⁱPrOH al 50-70% en CH₂Cl₂ y luego, NH₄OH al 0 a 20% en ⁱPrOH para proporcionar 23 como un sólido blanco (95 mg, 83%):

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 19.2 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.02-3.81 (m, 4H), 1.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12; LRMS (ESI) [M + H]⁺ calculado para C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₉P 416.3, encontrado 416.4.

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

Se analizaron muestras de R_p-4, 4, y S_p-4 mediante difracción de rayos X en polvo (XRPD), espectrometría de resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR), calorimetría por barrido diferencial (DSC), análisis térmico gravimétrico (TGA), adsorción gravimétrica de

vapor (GVS), solubilidad acuosa termodinámica, y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Ejemplo 20. Difracción de Rayos X en polvo

Se analizaron muestras de R_p -4, 4, y S_p -4 mediante difracción de rayos X en polvo (XRPD) bajo el siguiente régimen.

a. Bruker AXS/Siemens D5000

Los patrones de difracción de rayos X en polvo se recogieron en un difractómetro Siemens D5000 usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro θ - θ , divergencia de V20 y rendijas receptoras, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. Se verifica el desempeño del instrumento usando un estándar Corundum certificado (NIST 1976). El software utilizado para la recolección de datos fue Diffac Plus XRPD Commander v2.3.1 y los datos se analizaron y presentaron usando Diffac *Plus* EVA v 11.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Condiciones ambientales

Las muestras que se ejecutaron en condiciones ambientales se prepararon como especímenes de placa plana usando el polvo como se recibió. Se empaquetaron cuidadosamente aproximadamente 35 mg de la muestra en una cavidad perforada en una oblea de silicio zero-background (510). La muestra se rotó sobre su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recolección de datos son: rango angular: 2 a 42°2 θ ; tamaño de etapa: 0.05°2 θ ; y tiempo de recolección: 4 s.etapa⁻¹.

b. Bruker AXS C2 GADDS

Los patrones de difracción de rayos X en polvo se recogieron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), etapa XYZ automatizada, microscopio de video láser para posicionamiento automático de muestras y un detector de área HiStar de dos dimensiones. La óptica de rayos X consiste en un único espejo de Göbel con múltiples capas acoplado con un colimador estenopeco de 0.3 mm.

La divergencia del haz, es decir, el tamaño eficaz del haz de rayos X en la muestra, fue de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de análisis θ - θ continuo con una muestra - distancia de detector de 20 cm, lo cual proporciona una rango 2θ eficaz de 3.2° - 29.7° . Típicamente, la muestra estaría expuesta al haz de rayos X durante 120 segundos. El software utilizado para la recolección 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

Las muestras que se ejecutaron en condiciones ambientales se prepararon como especímenes de placa plana usando el polvo como se recibió sin molerlo. Se presionaron suavemente aproximadamente 1-2 mg de la muestra en un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana.

Difracción de Rayos X en polvo (XRPD)

Se descubrió por XRPD que **4** era amorfo (véase la **Fig. 1**). El análisis de XRPD de alta resolución de R_p -**4** preparado de acuerdo con el Ejemplo 3 confirmó un sólido cristalino que exhibía un patrón de polvo diferente al de S_p -**4** (preparado de acuerdo con el Ejemplo 4, Método 4), que también se confirmó era un sólido cristalino. La tabla de resultados de XRPD para R_p -**4**, y S_p -**4** se muestra en la **Tabla 1**, excluyendo todos los picos que exhiben una intensidad de $\leq 5\%$ (R_p -**4**) y $\leq 3\%$ (S_p -**4**).

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

Datos de XRPD para R_p -4		Datos de XRPD para S_p -4 (Forma 1)	
Ángulo 2-Theta °	% de Intensidad	Ángulo 2-Theta °	% de Intensidad
6.616	51.1	4.900	6.8
7.106	40.5	5.190	19.8
8.980	30.0	7.501	100.0
11.020	21.7	8.355	4.1
11.559	77.1	8.965	7.7

11.950	12.8	9.619	21.2
13.023	5.2	10.145	3.6
14.099	6.2	14.393	4.9
15.121	5.7	16.300	7.0
15.624	5.4	16.688	10.6
16.003	17.8	17.408	5.5
17.882	100.0	17.820	8.2
18.567	8.8	18.262	31.5
19.564	22.7	18.600	6.3
20.280	5.6	18.900	7.3
20.728	42.5	19.150	6.1
21.047	19.9	19.696	4.8
21.671	22.0	20.398	4.4
21.943	23.3	20.710	6.9
22.214	18.9	21.950	6.1

Datos de XRPD para R_p -4		Datos de XRPD para S_p -4	
(Forma 1)			
Ángulo 2-Theta °	% de Intensidad	Ángulo 2-Theta °	% de Intensidad
23.074	28.5	22.175	12.2
24.145	30.3	22.511	5.6
24.355	39.1	22.924	3.1
25.366	7.6	23.360	6.5
26.146	36.2	23.538	7.1
27.000	9.0	23.910	7.4
27.313	15.6	24.873	3.7
27.677	22.7	25.123	4.9
28.219	12.8	25.649	4.2
28.661	6.2	26.748	5.2
29.450	6.8	27.339	3.7
29.735	9.4	27.646	3.5
31.372	8.2	28.066	3.1
31.967	10.9	29.050	3.0
32.295	6.4	29.541	3.6

33.001	11.4	30.178	3.8
33.774	11.8	31.648	3.1
34.385	6.6	32.721	3.5
34.734	6.5	33.154	3.0
35.600	7.3	33.923	3.5
35.965	13.1	34.341	3.1
36.409	14.7	35.465	3.5
36.880	7.0	36.923	3.1
37.509	5.9	37.760	3.4
37.870	6.0	38.404	3.3
38.313	5.8	40.416	3.1
38.943	8.4		
40.093	6.6		
40.511	7.8		
41.429	6.5		

Se molió una muestra de Sp-4 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. Esta muestra volvió a analizarse mediante XRPD de alta resolución, confirmando que no había ocurrido ningún cambio en la forma.

Ejemplo 21. Estudios de cristalización para Sp-4.

El Sp-4 cristalino exhibe polimorfismo. Por lo tanto, un aspecto se refiere al Sp-4 cristalino y sus formas polimórficas individuales. Sp-4 puede existir en al menos cinco formas polimórficas, designadas como Formas 1 a 5. Además, también puede prepararse Sp-4 amorfo. Una cristalización típica tiene prevista la disolución alrededor de 100 mg de Sp-4 en un volumen apropiado de 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 permitir la evaporación de la solución 5 °C. Se obtuvieron varias formas cristalinas, pero cada forma, al filtrarse y/o secarse, proporcionó la Forma 1.

Las Formas 1, 2 y 3 son formas no solvatadas, 1:1 solvato de DCM y 1:1 solvato de cloroformo, respectivamente, según se confirmó mediante análisis rayos X de un solo cristal y XRPD. Las Formas 4 y 5 se obtuvieron a partir de la

cristalización de S_p-4 a partir de soluciones de acetonitrilo y anisol, respectivamente. No puedo recogerse suficientes datos para determinar si las Formas 4 y 5 son no solvatadas, hidratadas o solvatadas, ya que no se obtuvieron cristales simples de suficiente calidad. Las formas 4 y 5 se transforman en la Forma 1 al filtrarse. Se obtienen dos formas adicionales al cristalizar S_p-4 a partir de acetato de n-butilo (n BuAc) y una solución de éter metil-t-butílico (MTBE) y heptano; al filtrar ambas formas cristalinas se convierten en la Forma 1. Las Formas 2 y 3 se también se transforman en la Forma 1 al aislarse. La Forma 1 es una forma no solvatada que exhibe una endotermia de fusión amplia con una temperatura inicial de 94.3°C y ΔH_{fus} de 24.0 kJ mol^{-1} . Un patrón de XRPD de la Forma 1 de S_p-4 se representa en la **Figura 4**.

Conversión de la Forma 1 de S_p-4 a la Forma 6 de S_p-4

La Forma 1 puede convertirse en la Forma 6 de al menos dos formas.

Primero, dejando que los cristales finos de la Forma 1 se expongan a la humedad atmosférica durante varios días, se produce un monohidrato de la Forma 1 con la apariencia de una goma solidificada. Luego de moler el monohidrato sólido hasta convertirlo en un polvo fino, el patrón de XRPD permanece coherente con la Forma 1. Al dejar reposar en un recipiente abierto durante 6-10 semanas, el material molido cambia lentamente a la Forma 6 como un sólido anhidro. La Forma 1 es estable por al menos 2 años en un contenedor sellado.

De manera alternativa, la Forma 1 puede suspenderse en agua 5-50 mg/mL a temperatura ambiente y durante unas horas transformarse en la Forma 6. La eficacia del proceso de transformación en agua puede mejorarse calentando el agua hasta el punto que se disuelve más Forma 1 y aumentar la fluidez de la porción inmiscible de S_p-4 de una goma rígida a un aceite suspendido a alrededor o más [sic]. Con el tiempo, la Forma 6 puede comenzar a cristalizarse a 50°C . Enfriar adicionalmente la suspensión hasta $0-10^{\circ}\text{C}$ lleva a una recuperación mayor de sólido. La cristalización a partir de agua también quita más rastros de impurezas polares, llevando a una pureza general mejorada.

Volver a disolver la Forma 6 en como [sic] un solvente orgánico tal como diclorometano o acetonitrilo seguido por cristalización proporciona la Forma 1, aun cuando se siembra con la Forma 6 cristalina.

A un matraz de fondo redondo de un cuello de 100 mL equipado con una membrana de goma y una barra de agitación magnética, se cargaron 1.04 gramos de S_p-4, Forma 1. Pureza por HPLC de 99.7%. Cargado con 40 mL de agua desionizada (DI). Se comenzó a agitar la suspensión vigorosamente mientras se calentaba hasta 50°C. Cuando la temperatura llegó a los 50°C, la solución prácticamente homogénea se mantuvo durante 60 min, durante dicho tiempo los sólidos comenzaron a precipitar a partir de la solución, formando una lechada fina. La lechada se enfrió hasta 20°C durante 90 min y se mantuvo durante 16 horas a 20°C enfriando adicionalmente hasta 0-5°C durante 30 min y se mantuvo a 0-5°C durante 2.5 horas. La lechada se filtró en un embudo de vidrio poroso de porosidad media y se lavó con 10 mL de agua helada. La torta mojada se secó por succión durante 2 horas antes de secar en un horno de vacío durante la noche durante 23 horas a 50°C. Se aislaron 0.88 g (84.6% de recuperación) de S_p-4, Forma 6.

La Forma 6 tiene un punto de fusión observado de alrededor de 124.5-126°C.

Ejemplo 21-1. Forma 1 de S_p-4

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

Ángulo	% de Intensidad
2-Theta °	%
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

Ángulo	% de Intensidad
2-Theta °	%
17.3	15.4
17.7	10.1
18.1	42.6
18.4	7.6
18.7	11.4
18.9	5.7
19.3	5.0
19.6	2.9
20.2	8.5
20.5	11.5
20.8	3.6
21.8	7.2
22.0	14.5
22.4	9.6
23.2	5.3
23.4	5.8
23.5	4.6
23.8	7.4
24.0	3.1
24.7	2.5
25.0	13.0
25.5	3.1
26.6	4.5
27.2	3.2

27.5	2.2
28.1	2.9
30.0	3.2

Ejemplo 21-2. Forma 2 de S_p-4

Se exhibe un patrón de XRPD de la Forma 2 de S_p-4 en la **Figura 5**.

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

Ángulo	% de Intensidad
2-Theta °	%
4.9	44.1
5.1	19.1

Ángulo	% de Intensidad
2-Theta °	%
6.9	62.1
8.7	6.8
9.8	28.6
10.1	10.4
13.7	7.0
16.7	3.1
19.5	8.9
19.8	45.5
20.1	18.6
20.4	3.6
20.6	25.6
20.9	15.9
21.1	10.9
22.1	3.4
24.6	38.7
24.7	100.0
25.1	61.2

26.1	53.3
39.0	6.3

Ejemplo 21-3. Forma 3 de Sp-4

Se exhibe un patrón de XRPD de la Forma 3 de Sp-4 en la **Figura 6**.

Un listado de picos de la Forma 3 de Sp-4 se presenta en la **Tabla 4**.

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

Ejemplo 21-4. Forma 4 de Sp-4

Se exhibe un patrón de XRPD de la Forma 4 de Sp-4 en la **Figura 7**.

Un listado de picos de la Forma 4 de Sp-4 se presenta en la **Tabla 5**.

Ángulo	% de Intensidad
2-Theta °	%
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. Forma 5 de S_p-4

Se exhibe un patrón de XRPD de la Forma 5 de S_p-4 en la **Figura 8**.

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

Ángulo	% de Intensidad
2-Theta °	%
5.2	52.9
6.6	100.0
7.1	25.9
9.7	12.1
10.4	16.4
13.4	11.4

Ángulo	% de Intensidad
2-Theta °	%
15.7	25.8
19.1	31.1
19.9	12.9
20.0	9.0
21.3	3.5
25.0	22.3
25.6	2.3

26.3	5.9
26.9	2.0
31.7	2.1

Ejemplo 21-5. Forma 6 de S_p-4

En la Figura 21 se exhibe un patrón de XRPD de la Forma 6 de S_p-4.

Un listado de picos de la Forma 6 de S_p-4 se presenta en la siguiente tabla.

Ángulo 2- Theta °	espaciado d Å	% de Intensidad
6.08	14.51	66.7
8.2	10.77	62.1
10.38	8.52	29.8
10.85	8.14	10.4
12.17	7.26	12.0
12.7	6.96	66.4
13.73	6.44	14.9
14.1	6.27	13.8
15.91	5.57	3.1
16.83	5.26	8.7
17.17	5.16	19.7
17.66	5.01	56.2
17.95	4.93	37.7
18.79	4.72	59.0
19.1	4.64	14.3
19.41	4.57	37.2
19.8	4.48	46.0
20.11	4.41	68.8
20.82	4.26	100.0
21.81	4.07	36.8
22.03	4.03	7.4

23.03	3.86	14.2
-------	------	------

Ángulo 2- Theta °	espaciado d Å	% de Intensidad
23.26	3.82	21.6
23.64	3.76	6.3
23.89	3.72	7.0
24.73	3.6	3.3

Ejemplo 21-7. S_p-4 (amorfo)

Se exhibe un patrón de XRPD de S_p-4 amorfo en la **Figura 9**.

Ejemplo 22 Cristalografía de rayos X de cristales simples de S_p-4 y sus solvatos

Ejemplo 22-1. Cristalografía de rayos X de cristales simples de S_p-4 (Forma 1)

La Figura 10 muestra una estructura de rayos X cristalina para la Forma 1 de S_p-4. Allí, la figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 1 a partir de la estructura cristalina, mostrando la disposición de numeración utilizada. Se muestran los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópico para los átomos que no son de hidrógeno en el nivel de probabilidad de 50%. Los átomos de hidrógeno se exhiben con un radio arbitrariamente pequeño.

La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinado de mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con peso $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0592P)^2 + (0.6950P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en un algoritmo de interpolación SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.0871$ para todos los datos, R_1 convencional = 0.0329 en valores de F de 7090 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1.016$ para todos los datos y 870 parámetros. $\Delta/\sigma(\text{máx})$ final 0.001, $\Delta/\sigma(\text{medio})$, 0.000. Mapa de diferencia final entre +0.534 y -0.36 e Å⁻³.

Tabla 7. Parámetros de cristales simples de la Forma 1

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

Ejemplo 22-2. Cristalografía de rayos X de cristales simples de S_p-4 (Forma 2)

La Figura 11 muestra una estructura de rayos X cristalina para la Forma 2 de S_p-4. Allí, esta figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 2 a partir de la estructura cristalina, mostrando la disposición de numeración utilizada. Los heteroátomos se resolvieron de forma isotrópica debido a datos muy débiles. No se exhiben los átomos de hidrógeno.

La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, refinado de mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con peso $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) +$

$(0.0975P)^2 + (10.6969P)$, donde $P = (F_o^2 + 2 F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópicos, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementados en un algoritmo de interpolación SCALE3 ABSPACK. $wR^2 \text{ final} = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.1883$ para todos los datos, $R_1 \text{ convencional} = 0.0741$ en los valores de F de 2525 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1.05$ para todos los datos y 158 parámetros. $\Delta/\sigma(\text{máx})$ final 0.000, $\Delta/\sigma(\text{medio})$, 0.000. Mapa de diferencia final entre +1.388 y -0.967 e Å³.

Tabla 8. Parámetros de cristales simples de la Forma 2

Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ FN ₃ O ₉ P				
Peso molecular	614.38				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo espacial	$P2_1$	a	12.8315(3) Å	α	90°
		b	6.14530(10) Å	β	91.752(2)°
		c	17.6250(4) Å	γ	90°
V	1389.14(5) Å ³				
Z	2				
D_c	1.469 g.cm ⁻¹				
μ	3.196 mm ⁻¹				
Fuente, λ	Cu-K, 1.54178 Å				
$F(000)$	640				
T	293(2) K				
Datos truncados a	0.80 Å				
$\theta_{\text{máx}}$	62.23°				
Completitud	91,1%				
Reflexiones	3528				
Reflexiones únicas	2562				
R_{int}	0.0227				

Ejemplo 22-3. Cristalografía de rayos X de cristales simples de Sp-4 (Forma 2)

La Figura 12 representa una estructura cristalina de rayos X (ORTEP - anisotrópico) Sp-4 (Forma 2). Una estructura cristalina del solvato de cloruro de

metileno de *Sp-4* (Forma 2), $C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$, proporciona un grupo espacial monoclinico $P2_1$ (ausencias sistemáticas 0k0: k=primo) con $a=12.8822(14)$ Å, $b=6.1690(7)$ Å, $c=17.733(2)$ Å, $\beta=92.045(3)^\circ$, $V=1408.4(3)\text{Å}^3$, $Z=2$ y $d_{\text{calc}}=1.449$ g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron en un detector de área Rigaku Mercury CCD que utiliza radiación Mo-K α monocromada de grafito ($\lambda=0.71073$ Å) a una temperatura de 143K. El indexado preliminar se realizó a partir de una serie de doce imágenes rotadas 0.5° con exposiciones de 30 segundos. Se recogió un total de 648 imágenes de rotación con un a distancia de cristal a detector de 35 mm, un ángulo de giro 2θ de -12° , anchos de rotación de 0.5° y exposiciones de 30 segundos: el análisis N° 1 fue un análisis Φ de 315° a 525° a $\omega=10^\circ$ y $\chi=20^\circ$; el análisis N° 2 fue un análisis ω de -20° a 5° a $\chi=-90^\circ$ y $\Phi=315^\circ$; el análisis N° 3 fue un análisis ω de -20° a 4° a $\chi=-90^\circ$ y $\Phi=135^\circ$; el análisis N° 4 fue un análisis ω de -20° a 5° a $\chi=-90^\circ$ y $\Phi=225^\circ$; el análisis N° 5 fue un análisis ω de -20° a 20° a $\chi=-90^\circ$ y $\Phi=45^\circ$. Las imágenes de rotación se procesaron usando CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), produciendo un listado de valores F^2 y $\sigma(F^2)$ sin promediar que luego se pasaron al paquete de programas CrystalStructure (CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigaku/MSO (2002)) para procesamiento adicional y solución de estructura en una computadora Dell Pentium III. Se midieron un total de 7707 reflexiones en los rangos de $5.48 \leq 2\theta \leq 50.04^\circ$, $-14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$, proporcionando 4253 reflexiones únicas ($R_{\text{int}}=0.0180$). Los datos de intensidad se corrigieron para efectos Lorentz y de polarización y para la absorción usando REQAB (transmisión mínima y máxima 0.824, 1.000).

La estructura se resolvió por métodos directos (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). *J. Appl. Cryst.*, **32**, 115-119). El refinado se realizó mediante mínimos cuadrados de matriz completa basados en F^2 usando SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.*, **A64**, 112-122). Todas las reflexiones se usaron durante el refinado. El plan 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 que no eran de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de "anclaje". El refinado convergió 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 únicas que no son cero y las 358 variables ($R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR_2 = \{ \sum w (F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w (F_o^2)^2 \}^{1/2}$; $GOF = \{ \sum w (F_o^2 - F_c^2) / (n - p) \}^{1/2}$; donde n = la cantidad de reflexiones y p = la cantidad de parámetros refinados). El Δ/σ máximo en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0.000 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0.312 y -0.389 e/Å³. El parámetro de estructura absoluta Flack se refinó hasta -0.06(6), corroborando, por lo tanto, la estereoquímica del compuesto del título.

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

Tabla 9. Resumen de la determinación de la estructura del compuesto S_p -4·CH₂Cl₂.

Fórmula:	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ PO ₉ FCl ₂
Peso de la fórmula	614.38
Clase de cristal:	Monoclínico
Grupo espacial:	P2 ₁ (#4)
Z	2
Constantes celulares	
a	12.8822(14) Å
b	6.1690(7) Å
c	17.733(2) Å
β	92.045(3)°
V	1408.4(3) Å ³
μ	3.48 cm ⁻¹
tamaño del cristal, mm	0.42x0.12x0.10
D _{calc}	1.449 g/cm ³
F(000)	640
Radiación:	Mo-K _α (λ=0.71073Å)

rango 2θ	5.48-50.04°
hkl recogido:	-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>4σ)
Nº de reflexiones usadas en el refinado	4253
Nº de parámetros	358
Índices R (F>4σ)	R ₁ =0.0328 wR ₂ =0.0817
Índices R (todos los datos)	R ₁ =0.0348 wR ₂ =0.0838
GOF:	1.056
Picos de diferencia finales, e/Å ³	+0.312, -0.389

Ejemplo 22-4. Cristalografía de rayos X de cristales simples de S_p-4 (Forma 3)

La Figura 13 muestra una estructura de rayos X cristalina para la Forma 3 de S_p-4. Allí, esta figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 3 a partir de la estructura cristalina, mostrando la disposición de numeración utilizada. Se muestran los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópico para los átomos que no son de hidrógeno en el nivel de probabilidad de 50%. Los átomos de hidrógeno se exhiben con un radio arbitrariamente pequeño.

La solución de la estructura se obtuvo mediante métodos directos, mínimos cuadrados con 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 anisotrópico, corrección de absorción empírica usando armónicos esféricos, implementado en un algoritmo de interpolación SCALE3 ABSPACK. wR^2 final = $\{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.0796$ para todos los datos, R_1 convencional = 0.0294 en valores de F de 2486 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1.068$ para todos los datos y 377 parámetros. $\Delta/\sigma(\text{máx})$ final 0.001, $\Delta/\sigma(\text{medio})$, 0.000. Mapa de diferencia final entre +0.211 y -0.334 e Å⁻³.

Tabla 10. Parámetros de cristales simples de la Forma 3

Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₀ Cl ₃ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Peso molecular	648.82				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo espacial	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	1.507.cm ⁻¹				
μ	3.977 mm ⁻¹				
Fuente, λ	Cu-Kα, 1.54178 Å				
F(000)	672				
T	100(1) K				
Cristal	Aguja incolora, 0.22 x 0.03 x 0.02 mm				
Datos truncados a	0.80 Å				
θ _{máx}	74.41°				
Compleitud	69.1%				
Reflexiones	3062				
Reflexiones únicas	2607				
R _{int}	0.0198				

Ejemplo 23. Estabilidad a temperaturas elevadas y humedad relativa

Se almacenó una muestra de *R_p-4* en una cámara de humedad a 40°C y 75% de humedad relativa durante una semana y la muestra se volvió a analizar mediante XRPD. El patrón de polvo obtenido para *R_p-4* no mostró un cambio sustancial durante el curso del experimento, lo que quiere decir que no se observó ningún cambio en la forma del sólido. Esto debe contrastarse con una muestra de **4**, que se tornó líquida dentro de alrededor de 16 horas de almacenarse a 40°C y 75 % de humedad relativa. Efectivamente, una ilustración de la naturaleza delicuescente de **4** se ilustra a continuación. Una muestra de **4** se pasó a través de un tamiz de 250 μm y luego se almacenaron muestras a 40°C / 75 % de HR y 25°C / 53 % de humedad relativa y se realizaron observaciones visuales en intervalos regulares. Los resultados se proporcionan en la **Tabla 4**.

Tabla 11. Estabilidad de 4 a humedad relativa elevada.

Condiciones	t = 1.5 h	t = 4.5 h	t = 6.5 h	t = 8.5 h	t = 73 h
40°C / 75% HR	Delicuescencia	-	-	-	-
25°C / 53% HR	Sin delicuescencia	Sólido pegajoso	Delicuescencia parcial	Delicuescencia casi completa	Delicuescencia

Al almacenar a 40 °C y 75 % de humedad relativa, una muestra de S_p-4 se tornó líquida dentro de 16 horas. Por ejemplo, se molió una muestra de S_p-4 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. Las muestras de este material se almacenaron a 40°C y 75% de humedad relativa y 25°C y 53 % de HR y se realizaron observaciones visuales en intervalos regulares. Los resultados se proporcionan en la **Tabla 5**.

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

Condiciones	t = 1.5 h	t = 4.5 h	t = 104 h
40 °C / 75 % HR	Sin delicuescencia	Delicuescencia	-
25 °C / 53 % HR	Sin delicuescencia	Sin delicuescencia	Sin delicuescencia

El análisis XRPD de la muestra luego del almacenamiento a 25°C y 53% de HR durante 104 horas no mostró cambios significativos en los difractogramas producidos, indicando que no había ocurrido un cambio en la forma.

Ejemplo 24. Espectrometría de infrarrojo transformado de Fourier (FT-IR)

Los datos se recogieron en un Spectrum One de Perkin-Elmer equipado con un accesorio de muestreo de Reflectancia Total Atenuada (ATR) universal. Los datos se recogieron y analizaron usando software Spectrum v5.0.1.

El espectro IR obtenido para **4**, **R_p-4** y **S_p-4** se muestra en las Figs. 5-7, respectivamente. A continuación se presentan picos seleccionados en números de onda (cm^{-1}):

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. Calorimetría de barrido diferencial (DSC). Análisis gravimétrico térmico (TGA).

Los datos de DSC se recogieron en un TA Instruments Q2000 equipado con un procesador de muestras automático de 50 posiciones. La calibración para la capacidad térmica se llevó a cabo usando zafiro y la calibración de energía y temperatura se llevó a cabo usando indio certificado.

La DSC de temperatura modulada se llevó a cabo típicamente en 0.8-1.2 mg de cada muestra, en un platillo de aluminio perforado, usando una tasa de calentamiento subyacente 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. Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a $50 \text{ ml}.\text{min}^{-1}$ sobre la muestra.

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

Los datos de DSC se recogieron en un Mettler DSC 823e equipado con un procesador de muestras automático de 34 posiciones. El instrumento se calibró en cuanto a energía y temperatura usando indio certificado. Típicamente, se calentaron 0.8-1.2 mg de cada muestra, en un platillo de aluminio perforado, a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ desde 25°C a 250°C . Se mantuvo una purga de nitrógeno a $50 \text{ ml}.\text{min}^{-1}$

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

Los datos de DSC para S_p-4 (Forma 6) se recogieron usando un instrumento DSC (TA Q2000), usando una tasa de calentamiento de 10 °C/ min bajo un flujo continuo de gas de nitrógeno seco (100 ml/min). Se pesaron aproximadamente 2.2 mg de muestra con precisión y se calentaron en un platillo 'Tzero' no sellada herméticamente con una tapa holgada. El instrumento se calibró (entalpía y temperatura) con un indio estándar y (capacidad de calor) con un zafiro estándar. Las incertidumbres se estiman en ± 0.1 °C para temperaturas y ± 5 % para entalpías medidas. Se utilizó software TA Universal Analysis para medir las temperaturas iniciales.

Los datos de TGA se recogieron en un Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un procesador de muestras automático de 34 posiciones. Se calibró la temperatura del instrumento usando indio certificado. Típicamente, se cargaron 8-12 mg de cada muestra en un crisol de aluminio pesado previamente y se calentaron a 10°C.min⁻¹ desde temperatura ambiente hasta 350°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml.min⁻¹ sobre la muestra. El software de control de instrumentos y análisis de datos fue STARe v9.20.

El análisis DSC de **4** mostró una única endotermia amplia con una temperatura inicial de 58.7°C (ΔH 14 J.g) que se confirmó se debía a la relajación molecular durante la transición del vidrio por análisis DSC modulado adicionalmente (Fig. 17). El análisis de TGA **4** no exhibió pérdida de peso antes de la descomposición por encima de los 240°C, confirmando que el material no es solvatado. Como el análisis de XRPD de **4** confirmó que el material era amorfo, se llevó a cabo un análisis de DSC modulado en un intento de calcular la temperatura de transición del vidrio, la que se descubrió fue de 57°C.

El análisis de DSC mostró una única endotermia aguda con una temperatura inicial de 136.2 °C (ΔH 76 J.g⁻¹) que se confirmó es una fusión mediante microscopía de etapa caliente. Véase la Fig. 18. El análisis de TGA de R_p-4 no mostró pérdida de peso antes de la descomposición por encima de los 240 °C, confirmando que el material no es solvatado.

El análisis de DSC de S_p-4 mostró una única endotermia amplia con una temperatura inicial de 93.9°C (ΔH 43 J.g⁻¹) que se confirmó es una fusión mediante microscopía de etapa caliente. Véase la Fig. 19. El análisis de TGA de S_p-4 no mostró pérdida de peso antes de la descomposición por encima de los 240°C, confirmando que el material no es solvatado.

El análisis de DSC de S_p-4 (Forma 6) mostró una única endotermia amplia con una temperatura inicial de 120.7°C (ΔH 79 J.g-1).

Ejemplo 26. Adsorción gravimétrica de vapor (GVS)

SMS DVS Intrinsic

Los isoterms de adsorción se obtuvieron usando un analizador de absorción de humedad SMS DVS Intrinsic controlado mediante software SMS Analysis Suite. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25 °C mediante los controles de instrumentos. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo con una velocidad de flujo total de 200 ml.min⁻¹. La humedad relativa se midió mediante una sonda Rotronic calibrada (rango dinámico de 1.0-100 % de HR), ubicado cerca de la muestra. El cambio de peso (relajación de masa) de la muestra como una función del % de HR se monitoreó constantemente mediante la microbalanza (precisión ±0.005 mg).

Típicamente, se colocaron 5-20 mg de la muestra en una cesta de acero inoxidable con malla tarada en condiciones ambientales. La muestra se cargó y se descargó a 40% de HR y 25°C (condiciones ambientales típicas). Se realizó un isoterma de adsorción de humedad como se resume a continuación (2 análisis proporcionando 1 ciclo completo). El isoterma estándar se llevó a cabo a 25°C en intervalos de 10% de HR sobre un rango de 0.5-90 % de HR.

Tabla 13. Parámetros de método para experimentos con SMS DVS Intrinsic

Parámetros	Valores
Adsorción – Análisis 1	40 - 90
Desorción/Adsorción – Análisis 2	90 – 0, 0 - 40

Intervalos (% de HR)	10
Cantidad de análisis	2
Velocidad de flujo (ml.min ⁻¹)	200
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C.min ⁻¹)	0.2
Tiempo de adsorción (horas)	6 horas de tiempo de espera

La muestra se recuperó luego de completar el isoterma y se volvió a analizar por XRPD.

El análisis de GVS mostró que *R_p-4* no era higroscópico y que exhibía captación reversible de aproximadamente 0.2% en peso de agua desde 0 hasta 90 % de humedad relativa. El segundo análisis de la muestra por XRPD luego del experimento de GVS no exhibió cambios en la forma.

Se molió una muestra de *S_p-4* 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 utilizando un método modificado de un único ciclo. La muestra se tomó desde 40 % de HR (aproximadamente ambiente) hasta 60 % de HR, en vez del 90 % para el método estándar, y luego se cicló hasta 0 % y devuelta a 40 % de HR. Este análisis mostró que *S_p-4* no es higroscópico hasta 60 % de HR, con captación reversible de ~0.2 % en peso de agua desde 0 hasta 60 % de HR.

Ejemplo 27. Solubilidad acuosa termodinámica

La solubilidad acuosa se determinó suspendiendo una cantidad suficiente de compuesto en agua para proporcionar una concentración máxima final de ≥10 mg.ml⁻¹ de la forma libre original del compuesto. La suspensión se equilibró a 25 °C durante 24 y luego se midió el pH. Luego la suspensión se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio C hacia una placa de 96 pocillos. Luego el filtrado se diluyó por un factor de 101. La cuantificación se realizó mediante HPLC con referencia a una solución estándar de aproximadamente 0.1 mg.ml⁻¹ en DMSO. Se inyectaron diferentes volúmenes de soluciones de muestra estándar, diluidas y no diluidas. La

solubilidad se calculó utilizando las áreas de los picos determinadas por integración del pico encontrado en el mismo tiempo de retención que el pico principal de la inyección estándar.

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

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

El análisis se llevó a cabo en las condiciones antes mencionadas en un sistema Agilent serie HP1100 equipado con un detector de haz de diodos y usando software ChemStation vB.02.01-SRI.

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

ID de la muestra	pH de la mezcla sin filtrar	solubilidad / mg.ml ⁻¹	Comentarios
<i>R_p</i> -4	7.12	1.58	Suspensión
4	7.03	6.11	Sólido residual
<i>S_p</i> -4	6.88	5.65	Sólido residual

Ejemplo 28. Determinación de pureza química por HPLC

Pueden usarse diversas condiciones de HPLC para determinar la pureza química de los compuestos descritos en la presente. Un ejemplo de estas se describió anteriormente en relación con los estudios de solubilidad acuosa termodinámica. Otros ejemplos se describen a continuación:

Condiciones de HPLC:

LC:	Waters Alliance 2695 Separations Module, detector Waters 2996 PDA y software Waters Empower 2 (Versión 6.00)	
Columna:	Phenomenex Luna C 18(2); 4.6 x 50 mm; 3 µm	
Velocidad de flujo:	1.2 mL/min	
Volumen de inyección:	10 µL	
Fase móvil:	Solvente A: 95% de agua con 5% de metanol y 10 mM Acetato de amonio;	
	pH~5.3	
	Solvente B: MeOH con acetato de amonio 10 mM	
Gradiente:	mantener a 0 % de B	3 min
	0-47% de B	3-4 min
	mantener a 47 % de B	4-10 min
	47%-74% de B	10-11min
	mantener a 74 % de B	11-13.5min
	volver a 0% de B	13.5-13.6 min
	mantener a 0 % de B	13.6-15.5 min

En estas condiciones, se determinó que la pureza de **4**, *R_p*-4, y *S_p*-4 era de un ~99.6, ~99%, y ~99.5%, respectivamente. Nótese que las purezas más altas pueden conseguirse optimizando los métodos descritos anteriormente.

La inspección de los difractogramas de XRPD muestra que los dos diastereómeros cristalinos simples proporcionaron patrones de XRPD claramente

diferentes. Adicionalmente, había una clara diferencia en el punto de fusión de los dos diastereómeros cristalinos, teniendo *R_p*-4 una temperatura inicial considerablemente mayor que *S_p*-4 (136°C contra 94°C).

Ejemplo 29. Métodos de separación adicionales

La siguiente separación por SFC (condiciones establecidas a continuación) proporcionó la separación adecuada de una mezcla de diastereómeros, *R_p*-4 y *S_p*-4.

Método preparativo:	Método analítico:
Chiralpak AS-H (2 x 25 cm) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25 x 0.46 cm)
metanol/CO ₂ al 20% (100 bar)	metanol/CO ₂ al 20% (100 bar)
50 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
Cono: 260 mg/30 ml de metanol, volumen de inyección: 1.5 ml	

La siguiente separación por SFC (condiciones establecidas a continuación) proporcionó la separación adecuada de una mezcla de diastereómeros, *R_p*-4 y *S_p*-4.

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

Análisis	<i>R_p</i> -4	4	<i>S_p</i> -4
NMR de Protón	Diastereoisómero único	1:1 Mezcla de diastereoisómeros	Diastereoisómero único
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	Véase arriba	Véase arriba	Véase arriba
Solubilidad ac (mg.ml ⁻¹)	1.58	6.11	5.65
Pureza de HPLC	96.9 %	99.6 %	99.5 %
40°C / 75 % HR	Sin cambio de forma	Delicuescencia dentro de 1.5 h	Delicuescencia dentro de 4.5 h
25°C / 53 % HR	-	Delicuescencia	Sin cambio de forma
GVS	No higroscópico hasta 90% de HR	-	No higroscópico hasta 60% de HR

Ejemplo 30. Cristalografía de rayos X de 8 (isómero *S_p*)

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

El indexado preliminar se realizó a partir de una serie de treinta y seis marcos rotados 0.5° con exposiciones de 30 segundos. Se recogió un total de 3608 marcos con una distancia de cristal a detector de 70.00 mm, anchos de rotación de 0.5° y exposiciones de 20 segundos:

tipo de análisis	2θ	ω	φ	χ	marcos
φ	-35.50	279.40	27.32	48.96	725
φ	24.50	22.31	35.56	69.08	692
ω	-13.00	321.68	247.79	69.08	95

φ	34.50	204.08	28.21	-92.80	293
φ	-30.50	310.60	214.10	54.21	361
φ	32.00	304.67	24.47	50.72	722
φ	-35.50	122.14	316.59	-78.84	720

Los marcos de rotación se integraron utilizando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) produciendo un listado de valores F^2 y $\sigma(F^2)$ sin promediar que luego se pasaron al paquete de programas SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) para procesamiento adicional y solución de estructura en una computadora Dell Pentium 4. Se midieron un total de 6909 reflexiones en los rangos de $1.58 \leq \theta \leq 25.09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$, proporcionando 6909 reflexiones únicas ($R_{int} = 0.0581$). Los datos de intensidad se corrigieron para efectos Lorentz y de polarización y para la absorción usando REQAB (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. Universidad de Gotinga, 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 refinado se hizo mediante mínimos cuadrados de matriz completa basados en F^2 usando SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* A64, 112-122.). Todas las reflexiones se usaron durante el refinado. El plan de peso utilizado fue $w=1/[\sigma^2(F_o^2)+ (0.0000P)^2 + 14.0738P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los átomos que no eran de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de anclaje. El refinado convergió a $R1 = 0.0847$ y $wR2 = 0.1899$ para 6173 reflexiones observadas para las cuales $F > 4\sigma(F)$ y $R1=0.0963$ y $wR2=0.1963$ y $GOF = 1.119$ para todas las 6909 reflexiones únicas que no son cero y las 512 variables ($R1 = \sum ||F_o|-|F_c|| / \sum |F_o|$; $wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2}$; donde n = la cantidad de reflexiones y p = la cantidad de parámetros refinados). El Δ/σ máximo en el ciclo final de los mínimos cuadrados fue de 0.000 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0.402 y -0.559 $e/\text{\AA}^3$. Las **Figs 20A y 20B** son ORTEP (30% de probabilidad de elipsoides térmicos) de las moléculas 1 y 2 de la unidad asimétrica.

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 cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Constantes celulares:	
a	5.3312(4) Å
b	15.3388(8) Å
c	23.7807(13) Å
β	92.891(3)°
Volumen	1942.2(2) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1.397 Mg/m ³
Coeficiente absorción	0.185 mm ⁻¹
F(000)	856
Tamaño del cristal	0.40 x 0.10 x 0.08 mm ³
Intervalo theta para la recolección de datos	1.58 a 25.09°
Intervalos de índice	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
Reflexiones recolectadas	6909
Reflexiones independientes	6909 [R(int)=0.0581]
Compleitud a theta = 25.09°	99.6%
Corrección de absorción	Semi-empírica de equivalentes
Transmisión máxima y mínima	0.07452 y 0.6093
Método de refinado	Mínimos cuadrados de matriz completa en F ²
Datos / límites / 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

Parámetro de estructura absoluta	0.1(2)
Mayor diferencia de pico y orificio	0.402 y -0.559 e.Å ⁻³

Ejemplo 32. Cristalografía de rayos X de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo

El 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)-amino) propanoato de (S)-isopropilo, C₁₈H₁₇NPO₅F₅, se cristaliza en el grupo espacial triclinico P1 con a = 5.2641(6) Å, b = 12.0548(13) Å, c = 16.4307(15) Å, α = 74.960(4)°, β = 83.959(4)°, γ = 80.275(4)°, V = 990.40(18) Å³, Z = 2 y d_{calc}=1.520 g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron en un detector de área Bruker APEXII CCD que emplea radiación Mo-Kα monocromada de grafito (λ = 0.71073 Å) a una temperatura de 143(1)K. El indexado preliminar se llevó a cabo a partir de una serie de treinta y seis marcos de rotación 0.5° con exposiciones de 20 segundos. Se recogió un total de 3593 marcos con una distancia de cristal a detector de 37.600 mm, anchos de rotación de 0.5° y exposiciones de 20 segundos:

tipo de análisis	2θ	ω	φ	χ	marcos
φ	-15.50	258.48	-351.72	19.46	739
φ	-20.50	-17.45	-37.67	-73.06	725
ω	-10.50	-53.05	-87.93	99.72	80
φ	19.50	-32.21	-88.94	36.30	219
ω	-10.50	-14.33	80.80	-60.33	122
ω	17.00	-38.90	-41.64	83.36	116
ω	17.00	-37.89	-175.56	82.07	114
φ	19.50	59.55	-11.29	-26.26	739
φ	-10.50	318.39	-335.56	52.47	739

Los marcos de rotación se integraron utilizando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) produciendo un listado de valores F² y σ(F²) sin promediar que luego se pasaron al paquete de programas SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) para procesamiento adicional y solución de estructura en una computadora Dell Pentium 4. Se midieron un total de 17880 reflexiones en los rangos de 1.77 ≤ θ ≤

25.12°, $-6 \leq h \leq 6$, $-14 \leq k \leq 14$, $-19 \leq l \leq 19$, proporcionando 6897 reflexiones únicas (Rint = 0.0212). Los datos de intensidad se corrigieron para efectos Lorentz y de polarización y para la absorción usando SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. Universidad de Gotinga, Alemania.) (transmisión mínima y máxima 0.6887, 0.7452).

La estructura se resolvió por métodos directos (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* A64, 112-122.)). El refinado se hizo mediante mínimos cuadrados de matriz completa basados en F^2 usando SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* A64, 112-122.). Todas las reflexiones se usaron durante el refinado. El plan de peso utilizado fue $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0344P)^2 + 0.1102P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los átomos que no eran de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron usando un modelo de anclaje. El refinado convergió a $R1 = 0.0259$ y $wR2=0.0609$ para 6527 reflexiones observadas para las cuales $F > 4\sigma(F)$ y $R1 = 0.0284$ y $wR2 = 0.0621$ y $GOF = 1.040$ para todas 6897 las reflexiones únicas que no son cero y las 548 variables. ($R1 = \sum \|F_o|-|F_c|\|/\sum |F_o|$; $wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2/\sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2/(n - p)]^{1/2}$; donde n = la cantidad de reflexiones y p = la cantidad de parámetros refinados.) El Δ/σ máximo en el ciclo final de los mínimos cuadrados fue de 0.001 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0.254 y -0.236 e/Å³. **Las Figs. 22A y 22B** son ORTEP (30% de probabilidad de elipsoides térmicas) de las moléculas 1 y 2 de la unidad asimétrica.

Tabla 18. Resumen de la determinación de la estructura de 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo

Fórmula empírica	C ₁₈ H ₁₇ NPO ₅ F ₅
Peso de fórmula	453.30
Temperatura	143(1) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema de cristal	triclinico
Grupo espacial	P1
Constantes celulares:	
A	5.2641(6) Å
B	12.0548 136) Å

C	16.4307(15) Å
α	74.960(4)°
β	83.959(4)°
γ	80.275(4)°
Volumen	990.40(18) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	1.520 Mg/m ³
Coeficiente de absorción	0.216 mm ⁻¹
F(000)	464
Tamaño de cristal	0.45 x 0.05 x 0.04 mm ³
Intervalo theta para la recolección de datos	1.77 a 25.12°
Intervalos de índice	-6 ≤ h ≤ 6, -14 ≤ k ≤ 14, -19 ≤ l ≤ 19
Reflexiones recogidas	17880
Reflexiones independientes	6897 [R(int) = 0.0212]
Compleitud a theta = 25.12°	99.5 %
Corrección de absorción	Semi-empírico de equivalentes
Transmisión máx. y mín.	0.7452 y 0.6887
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F ²
Datos / limitaciones / parámetros	6897/3/548
Bondad del ajuste de F ²	1.040
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R 1 = 0.0259, wR2 = 0.0609
Índices R (todos los datos)	R 1 = 0.0284, wR2 = 0.0621
Parámetro de estructura absoluta	-0,01(5)
Mayor orificio y pico diferentes	0.254 y -0.236 e.Å ³

Ejemplo 33. Actividad biológica

Se sembraron células que contenían replicón tanto a 3,000 células/pocillo (50 µL) en placas blancas/opacas de 96 pocillos como a 1,500 células/pocillo (25 µL) en placas blancas/opacas de 384 pocillos. Se agregaron 50 µL del compuesto 2X a la placa de 96 pocillos o se agregaron 25 µL del compuesto 2X a la placa de 384 pocillos. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ humificada al 5% durante 4 días. Luego de la incubación, se agregó un reactivo Bright-Glo (50

μL para una placa de 96 pocillos o 25 μL para una placa de 384 pocillos) para medir un indicador de la luciferasa de luciérnaga para la replicación del VHC. Se calculó la inhibición porcentual contra la ausencia de control de fármacos.

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

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

Esta solicitud es una continuación parcial de la patente estadounidense N° 12/783,680, presentada el 20 de mayo de 2012, que reivindican prioridad de las solicitudes provisionales de patente estadounidense N° 61/179.923, presentada el 20 de mayo de 2009 y 61/319.513, presentada el 31 de marzo de 2010, la materia de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

La materia de las patentes estadounidenses N° 12/783,680 y 12/053,015 y de las solicitudes provisionales de patente estadounidense N° 61/179.923, presentada el 20 de mayo de 2009 y 61/319.513, presentada el 31 de marzo de 2010, se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. La materia de todas las referencias citadas se incorpora a la presente mediante esta referencia. En el caso en que el significado de un término incorporado entre en conflicto con el significado de un término definido en la presente, prevalece el significado de los términos contenido en la presente descripción sobre el significado de los términos incorporados.

Resumen:

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