

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 773**

51 Int. Cl.:

C07H 19/10	(2006.01) C07H 19/04	(2006.01)
C07H 19/24	(2006.01) A61K 31/664	(2006.01)
C07H 19/207	(2006.01) A61K 31/716	(2006.01)
C07H 19/20	(2006.01) C07F 7/18	(2006.01)
C07H 19/06	(2006.01) C07F 9/6558	(2006.01)
C07H 19/052	(2006.01) C07F 9/24	(2006.01)
A61K 31/7072	(2006.01) C07F 9/655	(2006.01)
A61P 31/14	(2006.01) C07F 9/6561	(2006.01)
C07H 19/044	(2006.01) A61P 31/00	(2006.01)
C07F 9/22	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2011** **E 17172585 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.10.2021** **EP 3290428**

54 Título: **Comprimido que comprende (S)-isopropilo 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2h)-il)-4-fluoro3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato cristalino**

30 Prioridad:

31.03.2010 US 319513 P
31.03.2010 US 319548 P
20.05.2010 US 783680

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2022

73 Titular/es:

GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)
c/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

ROSS, BRUCE S;
SOFIA, MICHAEL JOSEPH;
PAMULAPATI, GANAPATI REDDY;
RACHAKONDA, SUGUNA;
ZHANG, HAI-REN;
CHUN, BYOUNG-KWON y
WANG, PEIYUAN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

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

ES 2 900 773 T3

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

DESCRIPCIÓN

Comprimido que comprende (S)-isopropilo 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 cristalino

Campo de la invención

[0001] En el presente documento se describen fosforamidados de nucleósidos y su uso como agentes para el tratamiento de enfermedades virales. Estos compuestos son inhibidores de la replicación viral del 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

[0002] La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud importante que conduce a enfermedades hepáticas crónicas, como cirrosis y carcinoma hepatocelular, en un número sustancial de individuos infectados, estimado en 2-15% de la población mundial. Se estima que hay 4,5 millones de personas infectadas solo en los Estados Unidos, según el Centro para el Control de Enfermedades de EE. UU. Según la Organización Mundial de la Salud, hay más de 200 millones de personas infectadas en todo el mundo, con al menos 3 a 4 millones de personas infectadas cada año. Una vez infectadas, aproximadamente el 20% de las personas eliminan el virus, pero el resto puede albergar el VHC por el resto de sus vidas. Entre el diez y el veinte por ciento de las personas con infección crónica eventualmente desarrollan cirrosis o cáncer que destruyen el hígado. La enfermedad viral se transmite por vía parenteral a través de sangre y productos sanguíneos contaminados, agujas contaminadas o sexual y verticalmente de madres infectadas o portadoras a su descendencia. Los tratamientos actuales para la infección por VHC, que se limitan a la inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina, tienen un beneficio clínico limitado. Además, no existe una vacuna establecida para el VHC. En consecuencia, existe una necesidad urgente de mejores agentes terapéuticos que combatan eficazmente la infección crónica por VHC.

[0003] El virión del VHC es un virus de cadena positiva de ARN envuelto con una sola secuencia genómica oligorribonucleótido de aproximadamente 9600 bases que codifica una poliproteína de aproximadamente 3010 aminoácidos. Los productos proteicos del gen del VHC consisten en 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 la maquinaria catalítica para la replicación viral. La proteasa NS3 libera NS5B, la ARN polimerasa dependiente de ARN de la cadena de poliproteínas. La polimerasa HCV NS5B es necesaria para la síntesis de un ARN bicatenario a partir de un ARN viral monocatenario que sirve como molde en el ciclo de replicación del VHC. Por lo tanto, la polimerasa NS5B se considera un componente esencial en el complejo de replicación del VHC (K. Ishi, et al, Hepatology, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., Virology, 1998, 249: 108-118). La inhibición de la polimerasa HCV NS5B previene la formación del ARN del HCV bicatenario y, por lo tanto, constituye un enfoque atractivo para el desarrollo de terapias antivirales específicas del HCV.

[0004] El HCV pertenece a una familia mucho mayor de virus que comparten muchas características comunes.

Virus de la familia Flaviviridae

[0005] Virus de la familia Flaviviridae comprenden al menos tres géneros distintos: *pestivirus*, que provocan enfermedades en ganado y cerdos; *flavirus*, que son la causa principal de enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla; y *hepacivirus*, cuyo único miembro es el HCV. El género flavivirus incluye más de 68 miembros separados en grupos sobre la base de la relación serológica (Calisher et al., J. Gen. Virol, 1993, 70, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica (Fields Virology, Editors: Fields, BN, Knipe, DM y Howley, PM, Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, PA, 1996, Capítulo 31, 931-959). Los flavivirus de preocupación mundial que están asociados con enfermedades humanas incluyen los virus de la fiebre hemorrágica del dengue (DH), el virus de la fiebre amarilla, el síndrome de choque y el virus de la encefalitis japonesa (Halstead, SB, Rev. Infect. Dis., 1984, 6, 251-264; Halstead, SB, Science, 239: 476-481, 1988; Monath, TP, New Eng. J. Med, 1988, 319, 64 1-643).

[0006] El género pestivirus incluye virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV, también llamado virus del cólera del cerdo) y el virus de enfermedad de la frontera (BDV) de ovejas (Moennig, V. et al. Adv. Vir. Res 1992, 41, 53-98). Las infecciones por pestivirus del ganado domesticado (bovinos, porcinos y ovinos) provocan importantes pérdidas económicas en todo el mundo. El BVDV causa enfermedades de las mucosas en el ganado y tiene una importancia económica significativa para la industria ganadera (Meyers, G. y Thiel, HJ, Advances in Virus Research, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al, Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Los pestivirus humanos no se han caracterizado tan ampliamente como los pestivirus animales. Sin embargo, los estudios serológicos indican una exposición considerable a pestivirus en humanos.

[0007] Grupos de virus pestivirus y hepacivirus están estrechamente relacionados dentro de la familia Flaviviridae. Otros virus estrechamente relacionados en esta familia incluyen el virus GB A, agentes similares al virus GB A, virus

GB-B y virus GB-C (también llamado virus de la hepatitis G, HGV). El grupo de los hepacivirus (virus de la hepatitis C; HCV) consta de varios virus estrechamente relacionados pero distinguibles genotípicamente que infectan a los seres humanos. Hay al menos 6 genotipos del HCV y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre los pestivirus y los hepacivirus, combinadas con la escasa capacidad de los hepacivirus para crecer eficazmente en cultivos celulares, el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) se utiliza a menudo como sustituto para estudiar el virus del HCV.

[0008] La organización genética de pestivirus y hepacivirus es muy similar. Estos virus de ARN de cadena positiva poseen un único marco de lectura abierto (ORF) grande que codifica todas las proteínas virales necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que es co- y post-traduccionamente procesada por proteinasas tanto celulares como codificadas por virus para producir las proteínas virales maduras. Las proteínas virales responsables de la replicación del ARN del genoma viral se encuentran aproximadamente dentro del extremo carboxi-terminal. Dos tercios de las 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 pestivirus y hepacivirus es muy similar. Tanto para los pestivirus como para los hepacivirus, las proteínas maduras no estructurales (NS), en orden secuencial desde el extremo amino de la región codificante de la proteína no estructural hasta el extremo carboxi terminal del ORF, constan de p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

[0009] Las proteínas NS de pestivirus y hepacivirus comparten dominios de secuencia que son característicos de funciones proteicas específicas. Por ejemplo, las proteínas NS3 de virus en ambos grupos poseen motivos de secuencia de aminoácidos característicos de serina proteinasas y helicasas (Gorbalenya et al., Nature, 1988, 333, 22; Bazan y Fletterick Virology, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya y col., Nucleic Acid Res., 1989, 17, 3889-3897). De manera similar, las proteínas NS5B de pestivirus y hepacivirus tienen los motivos característicos de las ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, EV y Dolja, VV, Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 1993, 28, 375-430).

[0010] Las funciones reales y funciones de las proteínas NS de pestivirus y hepacivirus en el ciclo de vida 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 aguas abajo de su posición en el ORF (Wiskerchen y Collett, Virology, 1991, 184, 341-350; Bartenschlager et al., J. Virol. 1993, 67, 3835-3844; Eckart y col. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1993, 192, 399-406; Grakoui y col., J. Virol. 1993, 67, 2832-2843; Grakoui y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 1993, 90, 10583-10587; Hijikata y col., J. Virol. 1993, 67, 4665-4675; Tome y col., J. Virol., 1993, 67, 4017-4026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager et al., J. Virol. 1994, 68, 5045-5055; Failla et al., J. Virol. 1994, 68, 3753- 3760; Xu y col., J. Virol., 1997, 71:53 12-5322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1995, 215, 160-166; Jin y Peterson, Arch. Biochem. Biophys., 1995, 323, 47 -53; Warrenner y Collett, J. Virol. 1995, 69, 1720-1726). Finalmente, las proteínas NS5B de pestivirus y hepacivirus tienen la actividad de ARN polimerasas dirigida por ARN predicha (Behrens et al., EMBO, 1996, 15, 12-22; Lechmann et al., J. Virol., 1997, 71, 8416- 8428; Yuan y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1997, 232, 231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; Zhong y col., J. Virol., 1998, 72, 9365-9369).

[0011] En la actualidad, hay opciones limitadas de tratamiento para las personas infectadas con el virus de la hepatitis C. La opción terapéutica aprobada actualmente es el uso de inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina. Esta terapia tiene una eficacia clínica limitada y solo el 50% de los pacientes tratados responden a la terapia. Por lo tanto, existe una necesidad significativa de terapias más eficaces y novedosas para abordar la necesidad médica insatisfecha que plantea la infección por HCV.

[0012] Un número de dianas moleculares potenciales para el desarrollo de fármacos de antivirales de acción directa como agentes terapéuticos anti-HCV ahora se han identificado incluyendo, pero no limitado a la autoproteasa NS2-NS3, la proteasa NS3, la helicasa NS3 y la polimerasa NS5B. La polimerasa de ARN dependiente de ARN es absolutamente esencial para la replicación del genoma de ARN monocatenario de sentido positivo y esta enzima ha suscitado un interés significativo entre los químicos médicos.

[0013] Los inhibidores de NS5B del HCV como terapias potenciales para la infección por HCV han sido revisados: Tan, S.-L., y otros, Nature Rev. Drug Discov, 2002, 1, 867-881; Walker, MP y col., Exp. Opin. Investigational Drugs, 2003, 12, 1269-1280; Ni, ZJ., et al., Current Opinion in Drug Discovery and Development, 2004, 7, 446-459; Beaulieu, P. L., et al., Current Opinion in Investigational Drugs, 2004, 5, 838-850; Wu, J., et al., Current Drug Targets-Infectious Disorders, 2003, 3, 207-219; Griffith, R.C., et al, Annual Reports in Medicinal Chemistry, 2004, 39, 223-237; Carrol, S., et al., Infectious DisordersDrug Targets, 2006, 6, 17-29. El potencial para la aparición de cepas de HCV resistentes y la necesidad de identificar agentes con una amplia cobertura de genotipos respalda la necesidad de continuar los esfuerzos para identificar nucleósidos nuevos y más eficaces como inhibidores de la NS5B del HCV.

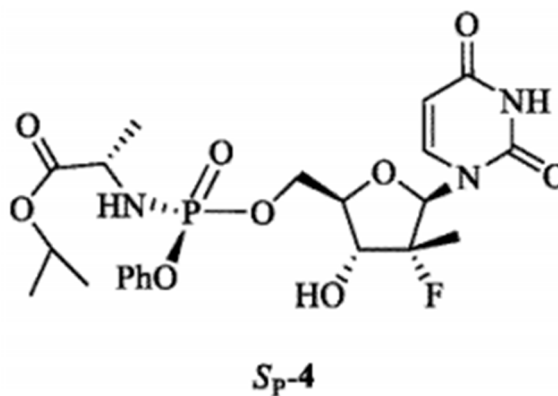
[0014] Los inhibidores de nucleósidos de la polimerasa NS5B puede actuar como un sustrato no natural que da como resultado la terminación de cadena o como un inhibidor competitivo que compite con el nucleótido de unión a la polimerasa. Para funcionar como un terminador de cadena, el análogo de nucleósido debe ser absorbido por la célula y convertido *in vivo* en un trifosfato para competir por el sitio de unión del nucleótido de la polimerasa. Esta conversión en trifosfato está mediada comúnmente por quinasas celulares que imparten requisitos estructurales adicionales a un potencial inhibidor de la nucleósido polimerasa. Desafortunadamente, esto limita la evaluación directa de nucleósidos como inhibidores de la replicación del HCV a ensayos basados en células capaces de fosforilación *in situ*.

[0015] En algunos casos, la actividad biológica de un nucleósido se ve obstaculizada por sus características de sustrato pobre para una o más de las quinasas necesarios para convertir a la forma trifosfato activo. La formación del monofosfato por una nucleósido quinasas se considera generalmente como el paso limitante de la velocidad de los tres eventos de fosforilación. Para evitar la necesidad del paso de fosforilación inicial en el metabolismo de un nucleósido al análogo de trifosfato activo, se ha informado de la preparación de profármacos de fosfato estables. Se ha demostrado que los profármacos de fosforamidato de nucleósidos son precursores del trifosfato de nucleósido activo e inhiben la replicación viral cuando se administran a células enteras infectadas con virus (McGuigan, C., et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., et al., Proc. National Acad Sci USA, 1996, 93, 7295-7299; Siddiqui, AQ, et al., J. Med. Chem., 1999, 42, 4122-4128; Eisenberg, EJ, et al., Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2001, 20, 1091-1098; Lee, WA y col., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49, 1898); WO 2010/135569; US 2006/0241064; y WO 2007/095269.

[0016] También la limitación de la utilidad de los nucleósidos como agentes terapéuticos viables es su veces pobres propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. Estas malas propiedades pueden limitar la absorción intestinal de un agente y limitar la captación en el tejido o la célula diana. Para mejorar sus propiedades se han empleado profármacos de nucleósidos. Se ha demostrado que la preparación de fosforamidatos de nucleósidos mejora la absorción sistémica de un nucleósido y, además, el resto de fosforamidato de estos "pronucleótidos" se enmascara con grupos lipofílicos neutros para obtener un coeficiente de partición adecuado para optimizar la captación y el transporte dentro de la célula mejorando drásticamente la concentración intracelular del análogo de nucleósido monofosfato en relación con la administración del nucleósido original solo. La hidrólisis mediada por enzimas del resto de éster de fosfato produce un monofosfato de nucleósido en donde la velocidad que limita la fosforilación inicial es innecesaria. Con este fin, la solicitud de patente de EE. UU. Varios compuestos descritos en el documento US 2010/0016251 se probaron como posibles candidatos clínicos para la aprobación de la FDA.

Resumen de la invención

[0017] Según un primer aspecto, la presente invención proporciona una tableta que comprende (S)-isopropil 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5k)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato cristalino representado por la Fórmula Sp-4:



que tiene reflejos XRPD 2θ ($\pm 0,2^\circ$) en 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.

[0018] Según una forma de realización, el comprimido es para uso en el tratamiento de una infección por virus de la hepatitis C.

Breve descripción de los dibujos

[0019]

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

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

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

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

Figura 5. Difractograma XRD de alta resolución de **Sp-4·CH₂l₂** (Forma 2).

Figura 6. Difractograma XRD de alta resolución de $S_P-4 \cdot CHCl_3$ (Forma 3).

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

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

Figura 9. Difractograma XRD 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 (isotrópica) de rayos X para $S_P-4 \cdot CH_2Cl_2$ (Forma 2)

Figura 12. Estructura cristalina (anisotrópica) de rayos X para $S_P-4 \cdot CH_2Cl_2$ (Forma 2)

Figura 13. Estructura cristalina de rayos X para $S_P-4 \cdot CHCl_3$ (Forma 3)

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

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

Figura 16. Espectro FT-IR de S_P-4

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

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

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

Figura 20A. Estructura 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 XRD de alta resolución de S_P-4 (Forma 6).

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

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

Descripción detallada de la invención

Definiciones

[0020] La frase "una" o "la" entidad tal como se utiliza aquí se refiere a una o más de esas entidades; 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 indistintamente en el presente documento.

[0021] Los términos "opcional" u "opcionalmente" como medios usados en el presente documento que puede pero no necesita ocurrir un evento o circunstancia descrito a continuación, y que la descripción incluye casos en los ocurre el evento o circunstancia y casos en que no. Por ejemplo, "enlace opcional" significa que el enlace puede estar presente o no, y que la descripción incluye enlaces simples, dobles o triples.

[0022] El término "P*" significa que el átomo de fósforo es quiral y que tiene una designación de Cahn-Ingold-Prelog de "R" o "S", que tienen sus significados aceptados de fricción correspondiente.

[0023] El término "purificado", tal como se describe en el presente documento, se refiere a la pureza de un compuesto dado. Por ejemplo, un compuesto se "purifica" cuando el compuesto dado es un componente principal de la composición, es decir, al menos 50% p/p puro. Por lo tanto, "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 el 97% de pureza, al menos el 98% de pureza, al menos el 99% de pureza, al menos el 99,5% de pureza y al menos el 99,9% de pureza.

[0024] El término "metabolito", como se describe en el presente documento, se refiere a un compuesto producido in vivo después de la administración a un sujeto en necesidad del mismo.

[0025] El término "aproximadamente" (también representado por ~) significa que el valor numérico citado es parte de un rango que varía dentro del error experimental estándar.

[0026] La expresión "sustancialmente como se muestra en..." un patrón de XRPD especificado significa que las posiciones de los picos que se muestran en el patrón de XRPD son sustancialmente los mismos, dentro de la inspección visual o recurren a los listados de los picos seleccionados ($\pm 0,2^\circ 2\theta$). Un experto en la materia comprenderá que las intensidades pueden variar según la muestra.

[0027] El término "sustancialmente anhidro" significa que una sustancia contiene como máximo 10% en peso de agua, preferiblemente como máximo 1% en peso de agua, más preferiblemente como máximo 0,5% en peso de agua y lo más preferiblemente como máximo 0,1% en peso de agua.

[0028] Un disolvente o anti-disolvente (tal como se utiliza en las reacciones, cristalización, etc., o de celosía y/o disolventes adsorbidos) incluye al menos uno de un C₁ a C₈ alcohol, un C₂ a C₈ éter, un C₃ a C₇ cetona, un C₃ a C₇ éster, un C₁ a C₂ clorocarbon, un C₂ a C₇ nitrilo, un disolvente diverso, un C₅ a C₁₂ hidrocarburo saturado, y un C₆ a C₁₂ hidrocarburo aromático.

[0029] El C₁ a C₈ alcohol se refiere a un alcohol lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número de carbonos. El alcohol C₁ a C₈ incluye, pero no se limita a, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, hexanol y ciclohexanol.

[0030] El C₂ a C₈ éter se refiere a una recta/ramificado/o cíclico/acíclico éter que tiene tal número y de carbonos. El C₂ a C₈ éter incluye, pero no se limita a, dimetil éter, dietil éter, di-isopropil éter, éter di-n-butilo, éter metil-butilo (MTBE), tetrahidrofurano, y dioxano

[0031] C₃ a C₇ cetona se refiere a una cetona lineal/ramificada y/o cíclica/acíclica que tiene tal número y de carbonos. C₃ a C₇ cetona incluye, pero no está limitada a acetona, metil etil cetona, propanona, butanona, metil isobutil cetona, metil butil cetona y ciclohexanona.

[0032] El C₃ a C₇ éster se refiere a un éster lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico que tiene tal número y de carbonos. El C₃ a C₇ éster incluye, pero no se limita a acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de n-butilo, etc.

[0033] El C₁ a C₂ clorocarbon se refiere a un clorocarbon que tiene tal número de carbonos. El clorocarburo C₁ a C₂ incluye, pero no se limita a cloroformo, cloruro de metileno (DCM), tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano y tetracloroetano.

[0034] El nitrilo a C₂ a C₇ se refiere a un nitrilo que tiene tal número de carbonos. El C₂ a C₇ nitrilo incluye, pero no se limita a acetonitrilo, propionitrilo, etc.

[0035] Un disolvente diverso refiere a un disolvente comúnmente empleado en la química orgánica, que incluye, pero no se limita a dietilenglicol, diglima (éter dimetílico de dietilenglicol), 1,2-dimetoxietano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, glicerina, hexametilfosforamida, triamida hexametilfosforosa, N-metil-2-pirrolidinona, nitrometano, piridina, trietilamina y ácido acético.

[0036] El término C₅ a C₁₂ hidrocarburo saturado se refiere a un hidrocarburo lineal/ramificado y/o cíclico/acíclico. El C₅ a C₁₂ hidrocarburo saturado incluye, pero no se limita a n-pentano, éter de petróleo (ligroína), n-hexano, n-heptano, ciclohexano, y cicloheptano.

[0037] El término C₆ a C₁₂ aromático se refiere a hidrocarburos sustituidos y no sustituidos que tienen un grupo fenilo como su columna vertebral. Los hidrocarburos preferidos incluyen benceno, xileno, tolueno, clorobenceno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, xilenos, siendo más preferido el tolueno.

[0038] El término "halo" o "halógeno" como se usa en el presente documento, incluye cloro, bromo, yodo y fluoro.

[0039] El término "grupo de bloqueo" se refiere a un grupo químico que exhibe las siguientes características. El "grupo" se deriva de un "compuesto protector". Grupos que son selectivos para hidroxilos primarios sobre hidroxilos secundarios que se pueden aplicar en condiciones consistentes con la estabilidad del fosforamido (pH 2-8) e impartir al producto resultante propiedades físicas sustancialmente diferentes que permiten una separación más fácil de los 3'-producto del grupo fosforamido-5'-nuevo del compuesto deseado sin reaccionar. El grupo debe reaccionar selectivamente con buen rendimiento para dar un sustrato protegido que sea estable a las reacciones proyectadas (ver Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª ed. T.W. Greene y P.G.M. Wuts, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999). Ejemplos de grupos incluyen, pero no se limitan a: benzoílo, acetilo, benzoílo sustituido con fenilo, tetrahidropiraniilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, pixil (9-fenilxanten-9 -

il) grupo tiopixil (9-feniltioxanten-9-il) o 9-(p-metoxifenil) xantina-9-il (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O) Ph, C(O) arilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, *tert*-butildimetilsililo, *tert*-butildifenilsililo. Los acetales, como MOM o THP y similares, se consideran grupos posibles. Los compuestos fluorados también se contemplan en la medida en que pueden unirse al compuesto y pueden eliminarse selectivamente pasando a través de un medio de extracción en fase sólida fluorada (FluoroFlash®). Un ejemplo específico incluye un análogo de tritilo fluorado, 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 el cloruro de p-toluenosulfonilo pueden reaccionar selectivamente en la posición 5'. Los ésteres se pueden formar de forma selectiva, como acetatos y benzoatos. Se pueden usar anhídridos dicarboxílicos tales como anhídrido succínico y sus derivados para generar un enlace éster con un ácido carboxílico libre, tales ejemplos incluyen, pero no se limitan a oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, adipilo, pimelilo, superilo, azelailo, sebacilo, ftalilo, isoftalilo, tereftalilo, etc. El ácido carboxílico libre aumenta drásticamente la polaridad y también se puede utilizar como asa para extraer el producto de reacción en fases acuosas levemente básicas tales como soluciones de bicarbonato de sodio. El grupo fosforamido es relativamente estable en medios ácidos, por lo que también podrían usarse grupos que requieran condiciones de reacción ácidas, tales como tetrahidropirranilo.

[0040] El término "grupo protector" que se deriva de un "compuesto protector," tiene su significado claro y ordinario, es decir, al menos un protector o grupo de bloqueo está unido a al menos un grupo funcional (p. ej., -OH, -NH₂, etc.) que permite la modificación química de al menos otro grupo funcional. Ejemplos de grupos protectores incluyen, entre otros, a, benzoílo, acetilo, benzoílo sustituido con fenilo, tetrahidropirranilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixil (9-fenilxanten-9-il), tiopixil (9-feniltioxanten-9-il) o 9-(p-metoxifenil) xantina-9-il (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, C(O)O(alquilo inferior), C(O)O(alquilen inferior) arilo (p. ej., -C(O)OCH₂Ph), C(O) Oarilo, CH₂O-alquilo, CH₂Oarilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, un grupo protector que comprende al menos un átomo de silicio, tales como, *tert*-butildimetilsililo, *tert*-butildifenilsililo, Si(alquilo inferior)₂OSi(alquilo inferior)₂OH (tales como, -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH).

[0041] El término "compuesto protector" como se usa en el presente documento y a menos que se defina lo contrario, 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.

[0042] El término "grupo saliente", como se usa en el presente documento, tiene el mismo significado al experto en la materia (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 una molécula de sustrato y está unido a ella; en una reacción en donde la molécula de sustrato sufre una reacción de desplazamiento (con, por ejemplo, un nucleófilo, el grupo saliente se desplaza a continuación. Los ejemplos de grupos salientes incluyen, pero no se limitan a: halógeno (F, Cl, Br o I), preferiblemente Cl, Br o I; tosiloato, mesilato, triflato, acetato, canforsulfonato, arilóxido y arilóxido sustituidos con al menos un grupo atractor de electrones (p. ej., p-nitrofenóxido, 2-clorofenóxido, 4-clorofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, pentafluorofenóxido, etc.), etc. El término "grupo sustractor de electrones" recibe aquí su significado llano. Los ejemplos de grupos aceptores de electrones incluyen, entre otros, un halógeno, -NO₂, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)(arilo), -C(O)O(alquilo inferior), -C(O)O(arilo), etc.

[0043] El término "reactivo básico", como se usa aquí, significa un compuesto que es capaz de desprotonar un grupo hidroxilo. Los ejemplos de reactivos básicos incluyen, pero no se limitan a un óxido (alquilo inferior) ((alquilo inferior)OM) en combinación con un disolvente alcohólico, donde los óxidos (alquilo inferior) incluyen, pero no se limitan a MeO⁻, EtO⁻, ⁿPrO⁻, ⁱPrO⁻, ^tBuO⁻, ⁱAmO⁻ (iso-amilóxido), etc., y donde M es un catión de metal alcalino, tal como Li⁺, Na⁺, K⁺, etc. Los disolventes alcohólicos incluyen (alquilo inferior) OH" tal como, por ejemplo, MeOH, EtOH, ⁿPrOH, ⁱPrOH, ^tBuOH, ⁱAmOH, etc. También se pueden usar bases no alcoxi tales 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, como (alquilo inferior) Mg (halógeno), que incluyen, entre otros, MeMgCl, MeMgBr, ^tBuMgCl, ^tBuMgBr, etc.

[0044] El término "base" abarca el término "reactivo básico" y está destinado a ser un compuesto que es capaz de desprotonar un protón que contiene el compuesto, es decir, una base de Bronsted. Además de los ejemplos citados anteriormente, otros ejemplos de una base incluyen, pero no se limitan a piridina, colidina, 2,6-(alquilo inferior)-piridina, dimetil-anilina, imidazol, N-metilimidazol, pirazol, N-metil-pirazol, trietilamina, diisopropiletilamina, etc.

[0045] El término "base no nucleofílica" significa un compuesto que es capaz de actuar como una base de Bronsted, pero tiene una baja nucleofilia. Los ejemplos de bases no nucleófilas incluyen, pero no se limitan a 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-dimetilamino-piridina, piridina, una 2,6-di-alquilo C1-6-piridina, una 2,4,6-tri-alquilo C1-6-piridina, 1,5-diazabicyclo[4,3,0] non-5-eno y 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano.

[0046] El término "grupo aceptor de electrones" tendrá su sentido común. Los ejemplos de grupos aceptores de electrones incluyen, entre otros, un halógeno (F, Cl, Br o I), -NO₂, -C(O)(alquilo inferior), -C(O)(arilo), -C(O)O(alquilo inferior), -C(O)O(arilo), etc.

[0047] El término "co-cristalitos" incluyen co-cristalitos dE⁴, R_P-4, o S_P-4 en combinación con sales, que abarca sales farmacéuticamente aceptables.

[0048] El término "sales", como se describe en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende un catión y un anión, que puede producido por la protonación de un resto de aceptores de protones y/o desprotonación de un resto donante de protones. Cabe señalar que la protonación del resto aceptor de protones da como resultado la formación de una especie catiónica en donde la carga se equilibra con la presencia de un anión fisiológico, mientras que la desprotonación del resto donante de protones da como resultado la formación de una especie aniónica, en donde la carga se equilibra con la presencia de un catión fisiológico.

[0049] 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 formado 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-etanosulfónico, 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 básica formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos inorgánicos enumerados anteriormente, donde las bases conjugadas comprenden un componente catiónico seleccionado entre Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, NH₄R^{g+}, en donde R - es un alquilo C₁₋₃ y g es un número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4. Debe entenderse que todas referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolventes (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos) como se define en el presente documento de la misma sal de adición de ácido.

[0050] El término "alquilo" se refiere a un residuo de hidrocarburo monovalente saturado, no ramificado o de cadena ramificada, que contiene de 1 a 30 átomos de carbono. El término "C_{1-M} alquilo" 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 "C₁₋₄ alquilo" 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 lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono. "C₁₋₂₀ alquilo", como se usa en este documento, se refiere a un alquilo que comprende de 1 a 20 átomos de carbono. "C₁₋₁₀ alquilo", como se usa en este documento, se refiere a un alquilo que comprende de 1 a 10 carbonos. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a grupos 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 está opcionalmente sustituido con un grupo arilo o heteroarilo, respectivamente.

[0051] El término "alqueno" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo no sustituido que tiene de 2 a 10 átomos de carbono que tienen uno o dos dobles enlaces olefínicos, preferentemente un doble enlace olefínico. El término "C_{2-N} alqueno" se refiere a un alqueno 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 "C₂₋₁₀ alqueno" se refiere a un alqueno que comprende de 2 a 10 átomos de carbono. El término "C₂₋₄ alqueno" se refiere a un alqueno que comprende de 2 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a vinilo, 1-propeno, 2-propeno (alilo) o 2-butenilo (crotilo).

[0052] El término "arilo", como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a fenilo sustituido o no sustituido (Ph), bifenilo, o naftilo, preferiblemente el término arilo se refiere a fenilo sustituido o no sustituido. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más restos seleccionados entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato y fosfonato, desprotegido o protegido según sea necesario, como conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a ed., John Wiley & Sons, 1999.

[0053] El término "arilóxido", como se usa en este documento, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a fenóxido (PhO-), *p*-fenilo-fenóxido (*p*-Ph-PhO-) o naftóxido sustituido o no sustituido, preferiblemente el término arilóxido se refiere a fenóxido sustituido o no sustituido. El grupo arilóxido puede estar sustituido con uno o más restos seleccionados 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, desprotegidos o protegidos según sea necesario, como conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3^a ed., John Wiley & Sons, 1999.

[0054] El término "preparación" o "forma de dosificación" pretende incluir tanto las formulaciones sólidas y líquidas del compuesto activo y un experto la técnica apreciará que un ingrediente activo puede existir en diferentes preparaciones dependiendo de la dosis deseada y los parámetros farmacocinéticos.

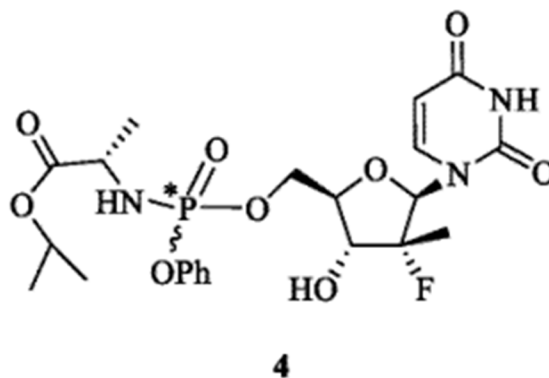
[0055] El término "excipiente" tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que se utiliza para preparar una composición farmacéutica, y es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otro modo indeseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como uso farmacéutico humano.

[0056] El término "cristalino" se refiere a una situación en donde una muestra sólida de cualquiera de S_P -4 o R_P -4 tiene características cristalinas cuando se determina por difracción de polvo de rayos X o una técnica de rayos X de cristal único.

[0057] El término "similar a cristal" se refiere a una situación en donde una muestra sólida de cualquiera de S_P -4 o R_P -4 tiene características cristalinas cuando se determina por uno de los medios, por ejemplo, visualmente o por microscopía óptica o de polarización, pero lo hace no tener características cristalinas cuando se determina por otros medios, por ejemplo, difracción de rayos X en polvo. Los métodos para determinar visualmente la cristalinidad de una muestra sólida por microscopía visual, óptica o de polarización se describen en USP <695> y <776>. Una muestra sólida de cualquiera de S_P -4 o R_P -4 que es "similar al cristal" puede ser cristalino bajo ciertas condiciones, pero puede llegar a ser no cristalina cuando se somete a otras condiciones.

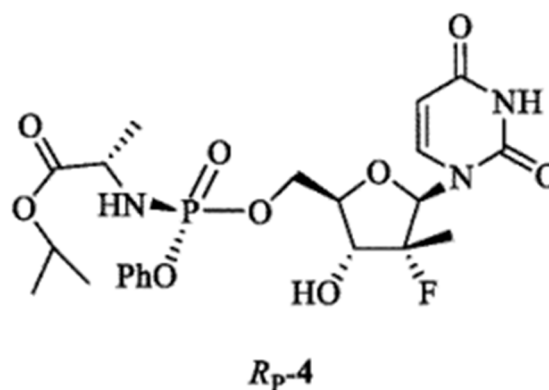
[0058] El término "amorfo" se refiere a una situación en donde una muestra sólida de cualquiera de S_P -4 o R_P -4 no es ni cristalina ni similar al cristal.

[0059] En el presente documento se describe un compuesto representado por la Fórmula 4:



en donde P^* representa un átomo de fósforo quiral. Debido al átomo de fósforo quiral, el compuesto representado por la Fórmula 4 comprende dos diastereómeros designados como R_P -4 y S_P -4. El compuesto representado por la Fórmula 4 puede también ser parte de un solvato, un hidrato o un solvato/hidrato mixto. El solvato se designa como $4 \cdot n S$, mientras que el hidrato se designa como $4 \cdot m H_2O$, donde S es un solvente reticular, n varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 y m varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la Fórmula 4 puede no existir como solvato o hidrato, pero tiene una cierta cantidad ventajosa de disolvente (S) adsorbido o agua. En cuyo caso, la cantidad de S o agua puede variar desde aproximadamente 0% en peso a aproximadamente 10% en peso basado en el peso del compuesto representado por la Fórmula 4. El compuesto representado por la Fórmula 4 y sus solvatos e hidratos de los mismos es cristalino, cristalino o amorfo.

[0060] También se describe aquí es un compuesto representado por la Fórmula R_P -4:



[0061] El compuesto representado por la Fórmula R_P -4 también puede ser parte de un solvato, un hidrato o un solvato/hidrato mixto. El solvato se designa como R_P -4 $\cdot n S$, mientras que el hidrato se designa como S_P -4 $\cdot m H_2O$, donde S es un disolvente reticular, n varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a

aproximadamente 3 ym varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la Fórmula *R_P-4* puede no existir como solvato, hidrato o solvato/hidrato mixto, pero tiene una cierta ventaja cantidad de disolvente (*S*) adsorbido, agua o tanto *S* como agua. En cuyo caso, la cantidad de *S* o agua puede variar desde aproximadamente 0% en peso a aproximadamente 10% en peso basado en el peso del compuesto representado por la Fórmula *R_P-4*. El compuesto representado por la Fórmula *R_P-4* y sus solvatos e hidratos del mismo es cristalino, similar al cristal, o amorfo.

[0062] También se describe aquí *R_P-4* cristalina.

[0063] También se describe en el presente documento es *R_P-4* cristalina que tiene reflejos XRPD 2θ ($^{\circ}$) aproximadamente a: 6,6, 7,1, 9,0, 11,6, 17,9, 20,7, 24,1, 24,4, y 26,2.

[0064] También se describe aquí un *R_P-4* cristalino que tienen reflejos XRPD 2θ ($^{\circ}$) aproximadamente a: 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.

[0065] También se describe aquí es *R_P-4* cristalino que tiene un patrón de difracción de XRPD sustancialmente como la que se muestra en la figura 2.

[0066] También se describe en el presente documento *R_P-4* que tiene los siguientes picos FT-IR (cm^{-1}): 1742, 1713, 1679, 1460, 1377, 1259, 1157, y 1079.

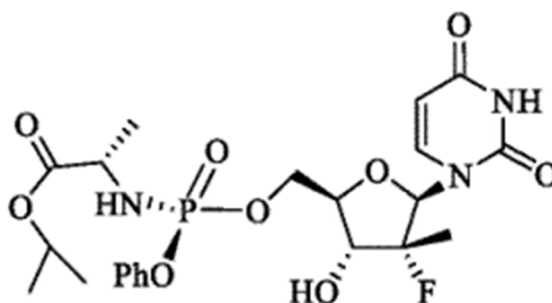
[0067] También se describe aquí *R_P-4*. tiene un espectro de FT-IR sustancialmente como la que se muestra en la figura 15.

[0068] También se describe aquí *R_P-4* sustancialmente puro.

[0069] También se describe aquí *R_P-4* sustancialmente puro cristalino.

[0070] También se describe aquí *R_P-4* sustancialmente puro amorfo.

[0071] También se describe aquí es un compuesto representado por la Fórmula *S_P-4*:



S_P-4

[0072] El compuesto representado por la Fórmula *S_P-4* también puede ser parte de un solvato, un hidrato o un solvato/hidrato mixto. El solvato se designa como *S_P-4*·*n* *S*, mientras que el hidrato se designa como *S_P-4*·*m*H₂O, donde *S* es un disolvente reticular, *n* varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 ym varía en una cantidad entera o no entera de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Finalmente, el compuesto representado por la Fórmula *S_P-4* podría no existir como solvato o hidrato, pero tiene una cierta cantidad ventajosa de disolvente (*S*) adsorbido o agua. En cuyo caso, la cantidad de *S* o agua variar desde alrededor de 0% en peso a aproximadamente 10% en peso basado en el peso del compuesto representado por la Fórmula *S_P-4*. El compuesto representado por la Fórmula *S_P-4* y sus solvatos e hidratos de los mismos es cristalino, cristalino o amorfo.

[0073] También se describe en el presente documento *S_P-4* cristalino.

[0074] También se describe en el presente documento un *S_P-4* cristalino monoclinico, que preferiblemente tiene los siguientes parámetros de la célula unidad de *a* ~ 12,88 Å, *b* ~ 6,17 Å, *c* ~ 17,73 Å, y β ~ 92,05°.

[0075] También se describe aquí un *S_P-4* cristalino monoclinico, que preferiblemente tiene los siguientes parámetros de la célula unidad de *a* ~ 20,09 Å, *B* ~ 6,10 Å, *c* ~ 23,01 Å, y β ~ 112,29°.

[0076] También se describe en el presente documento un Sp-4 cristalino monoclinico, que preferiblemente tiene los siguientes parámetros de la célula unidad $a \sim 12,83 \text{ \AA}$, $b \sim 6,15 \text{ \AA}$, $c \sim 17,63 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 91,75^\circ$.

[0077] También se describe en el presente documento un Sp-4 cristalino monoclinico, que preferiblemente tiene los siguientes parámetros de la célula unidad $a \sim 12,93 \text{ \AA}$, $b \sim 6,18 \text{ \AA}$, $c \sim 18,01 \text{ \AA}$, y $\beta \sim 96,40^\circ$.

[0078] También se describe en el presente documento es un Sp-4 cristalino que tiene reflejos XRPD 2θ ($^\circ$) aproximadamente a: 5,2, 7,5, 9,6, 16,7, 18,3, 22,2.

[0079] También se describe en el presente documento es un Sp-4 cristalino que tiene reflejos XRPD 2θ ($^\circ$) aproximadamente a: 5,0, 7,3, 9,4, y 18,1.

[0080] También se describe en el presente documento es un Sp-4 cristalino que tiene reflejos XRPD 2θ ($^\circ$) aproximadamente a: 4,9, 6,9, 9,8, 19,8, 20,6, 24,7, y 26,1.

[0081] También se describe en el presente documento es un Sp-4 cristalino que tiene reflejos XRPD 2θ ($^\circ$) aproximadamente a: 6,9, 9,8, 19,7, 20,6, y 24,6.

[0082] También se describe en el presente documento es un Sp-4 cristalino que tiene reflejos XRPD 2θ ($^\circ$) aproximadamente a: 5,0, 6,8, 19,9, 20,6, 20,9, y 24,9.

[0083] También se describe en el presente documento es un Sp-4 cristalino que tiene reflejos XRPD 2θ ($^\circ$) aproximadamente a: 5,2, 6,6, 7,1, 15,7, 19,1, y 25,0.

[0084] También se describe en el presente documento es Sp-4 cristalino que tiene reflejos XRPD 2θ ($^\circ$) aproximadamente a: 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.

[0085] También se describe aquí Sp-4 cristalino que tiene un patrón de difracción de XRPD sustancialmente como la que se muestra en una cualquiera de la figura 3, la figura 4, la figura 5, la figura 6, la figura 7, la figura 8, y figura 21.

[0086] También se describe aquí Sp-4 que tiene los siguientes picos FT-IR (cm^{-1}) a aproximadamente: 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208, y 1082.

[0087] También se describe aquí Sp-4 que tiene un espectro de FT-IR sustancialmente como el que se muestra en la figura 7.

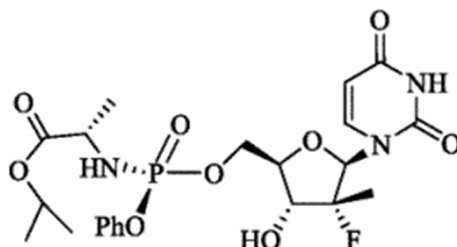
[0088] También se describe aquí Sp-4 sustancialmente puro.

[0089] También se describe en este documento Sp-4 cristalino sustancialmente puro.

[0090] También se describe en este documento Sp-4 sustancialmente puro amorfo.

Formas de realización

[0091] Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un comprimido que comprende (S)-isopropil 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 cristalino representado por la Fórmula Sp-4:



Sp-4

que tiene reflejos XRPD 2θ ($\pm 0,2^\circ$) en 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.

[0092] Según una forma de realización, el comprimido es para uso en el tratamiento de una infección por virus de la hepatitis C.

[0093] Los posibles agentes virales incluyen, pero no se limitan a: 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 de la polio, virus de la diarrea viral bovina, virus de la encefalitis japonesa, o aquellos virus pertenecientes a los grupos de pestivirus, hepacivirus o flavavirus.

[0094] El medio farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar de entre un excipiente, vehículo, diluyente, y medio equivalente.

[0095] Los compuestos **4**, *R_P-4*, o *S_P-4* pueden formularse independientemente en una amplia variedad de formas y portadores dosis de administración oral. La administración oral puede ser en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones, jarabes o suspensiones. Los compuestos **4**, *R_P-4*, o *S_P-4* son eficaces cuando se administran por administración como supositorio, entre otras vías de administración. La forma de administración más conveniente es generalmente la 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.

[0096] Los compuestos **4**, *R_P-4*, o *S_P-4* junto con uno o más excipientes convencionales, vehículos, o diluyentes, pueden ser colocados en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación unitaria pueden estar compuestas de 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 acorde con el intervalo de dosificación diario que se pretende emplear. Según la presente invención, las composiciones farmacéuticas se emplean como sólidos, particularmente como comprimidos. Como se describe en el presente documento, las composiciones farmacéuticas se pueden emplear como 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 administración rectal o vaginal. Una preparación típica contendrá de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 95% de compuesto o compuestos activos (p/p).

[0097] Los compuestos **4**, *R_P-4*, o *S_P-4* se pueden administrarse solos pero generalmente se administrarán en mezcla con uno o más excipientes farmacéuticos adecuados, diluyentes o vehículos seleccionados con respecto a la vía pretendida de administración y la norma práctica farmacéutica.

[0098] Las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes desintegradores de comprimidos o un material encapsulante. En los polvos, el vehículo generalmente es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En las tabletas, el componente activo generalmente se mezcla con el portador que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. Las preparaciones en forma sólida pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromatizantes, estabilizadores, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares. Los ejemplos de formulaciones sólidas se ejemplifican en EP 0524579; US 2002/0142050; US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360; US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; US 6,267,985; US 6,294,192; US 6,383,471; US 6,395,300; US 6,569,463; US 6,635,278; US 6,645,528; US 6,923,988; US 6,932,983; US 7,060,294; y US 7,462,608.

[0099] Como se describe en el presente documento, las formulaciones líquidas que también son adecuadas para administración oral incluyen formulación líquida incluyendo emulsiones, jarabes, elixires y suspensiones acuosas. Estos incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse en preparaciones en forma líquida poco antes de su uso. Los ejemplos de formulación líquida se ejemplifican en las Patentes de Estados Unidos N° 3,994,974; 5,695,784; y 6,977,257. Las emulsiones se pueden preparar en soluciones, por ejemplo, en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes tales como lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga. Las suspensiones acuosas se pueden preparar dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y otros agentes de suspensión bien conocidos.

[0100] Como se describe en el presente documento, los compuestos **4**, *R_P-4*, o *S_P-4* se pueden formular de forma independiente para la administración vaginal. Pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen, además del ingrediente activo, vehículos que se conocen en la técnica como apropiados. Algunas de estas formulaciones también pueden usarse junto con un condón con o sin un agente espermicida.

[0101] Las formulaciones adecuadas junto con vehículos farmacéuticos, diluyentes y excipientes se describen

en *Remington: The Science y Practice de Pharmacy* 1995, editado por EW Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pensilvania. Un científico experto en formulaciones puede modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la especificación para proporcionar numerosas formulaciones para una vía de administración particular sin hacer que las composiciones que contienen los compuestos contemplados en este documento sean inestables o comprometan su actividad terapéutica.

[0102] Como se describe en el presente documento, los compuestos purificados **4**, **Rp-4**, o **Sp-4** puede formularse de manera independiente en relación con liposomas o micelas. En cuanto a los liposomas, se contempla que los compuestos purificados se puedan formular de la manera descrita en las Patentes de Estados Unidos 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. En cuanto a las micelas, como se describe en el presente documento, los compuestos purificados se pueden formular de la manera que se describe en las patentes estadounidenses números 5,145,684 y 5,091,188.

[0103] El término "medicamento" significa una sustancia usada en un método de tratamiento y/o profilaxis de un sujeto en necesidad del mismo, en donde la sustancia incluye, pero no se limita a una composición, una formulación, una forma de dosificación, y similar, que comprende el comprimido según la invención.

[0104] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente memoria significa una cantidad requerida para reducir los síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a las necesidades individuales de cada caso particular. Esa dosis puede variar dentro de amplios límites dependiendo de numerosos factores como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y el estado general de salud del paciente, otros medicamentos con los que se está 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 aproximadamente 0,001 y aproximadamente 10 g, incluidos todos los valores intermedios, como 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,050, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,175, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9 y 9,5 por día debe ser apropiado en monoterapia y/o en terapia combinada. Una dosis diaria en particular está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 g por día, incluidos todos los valores incrementales de 0,01 g (es decir, 10 mg) en el medio, una dosis diaria preferida de aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,8 g por día, más preferiblemente aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,6 g por día, y lo más preferiblemente alrededor de 0,01 y alrededor de 0,25 g por día, cada uno de los cuales incluye todos los valores incrementales de 0,01 g en el medio. Generalmente, el tratamiento se inicia con una gran "dosis de carga" inicial para reducir o eliminar rápidamente el virus seguido de una disminución de la dosis a un nivel suficiente para prevenir el resurgimiento de la infección. Un experto en el tratamiento de las enfermedades descritas en este documento podrá, sin experimentación indebida y basándose en el conocimiento, la experiencia y las divulgaciones de esta solicitud, determinar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto divulgado en este documento para una enfermedad y un paciente determinados.

[0105] La eficacia terapéutica se puede determinar a partir de pruebas de la función hepática, incluyendo, pero no limitado a los niveles de proteína tales como proteínas séricas (p. ej., albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (p. ej., alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, γ -glutamyltranspeptidasa, etc.), síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol y síntesis de ácidos biliares; una función metabólica del hígado, que incluye, pero no se limita a metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y amoníaco. Alternativamente, la eficacia terapéutica se puede controlar midiendo el ARN del HCV. Los resultados de estas pruebas permitirán optimizar la dosis.

[0106] El comprimido de la invención puede administrarse con una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente antiviral; en donde la administración es concurrente o alternativa. Se entiende que el tiempo entre la administración alternativa puede oscilar entre 1 y 24 horas, lo que incluye cualquier subrango intermedio que incluye, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 horas.

[0107] Los ejemplos de "otro agente antivírico" incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de la proteasa NS3 del HCV (ver EP 1881001, US 2003187018, US 2005267018, WO 2003006490, WO 200364456, WO 2004094452, WO 2005028502, WO 2005037214, WO 2005095403, WO 2007014920, WO 2007014921, WO 2007014922, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007015824, WO 2008010921 y WO 2008010921); Inhibidores de HCV NS5B (véase 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 200205728725, 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 20060200335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO 2007039142, WO 2007039145, WO 2007076034, WO 2007088148, WO 2007092000 y WO2007095269); Inhibidores de HCV NS4 (véanse los documentos WO 2005067900 y WO 2007070556); Inhibidores de HCV NS5a (véanse los documentos US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251 y WO 2006120252); Agonistas de receptores de tipo Toll (véase el documento WO 2007093901); y otros inhibidores (ver WO 2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852 y WO 2004035571); y compuestos descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/053,015, presentada el 21 de marzo de 2008 (US 2010/0016251),

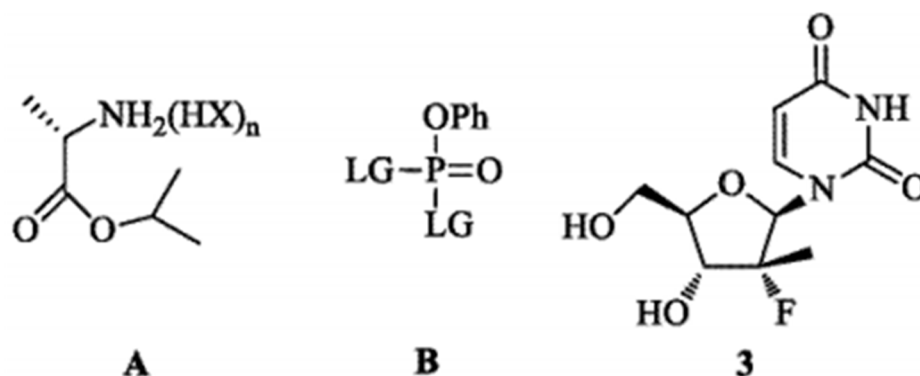
interferón- α , interferón- β , interferón- α pegilado, ribavirina, levovirina, viremida, otro nucleósido inhibidor de la polimerasa del HCV, un inhibidor de la polimerasa no nucleósido del HCV, un inhibidor de la proteasa del HCV, un inhibidor de la helicasa del HCV o un inhibidor de la fusión del HCV.

[0108] Cuando el comprimido de la invención se administra en combinación con otro agente antivírico, la actividad puede incrementarse con respecto al compuesto original. Cuando el tratamiento es una terapia de combinación, dicha administración puede ser simultánea o secuencial con respecto a la de los derivados de nucleósidos. La "administración concurrente", como se usa en el presente documento, incluye la administración de los agentes al mismo tiempo o en momentos diferentes. La administración de dos o más agentes al mismo tiempo se puede lograr mediante una única formulación que contenga dos o más ingredientes activos o mediante la administración sustancialmente simultánea de dos o más formas de dosificación con un solo agente activo.

[0109] Se entenderá que las referencias en este documento al tratamiento se extienden a la profilaxis así como al tratamiento de condiciones existentes. Además, el término "tratamiento" de una infección por HCV, como se usa en este documento, también incluye el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección asociada o mediada por la infección por HCV, o los síntomas clínicos de la misma.

Preparación

[0110] Se describe en el presente documento un proceso para preparar cualquiera de los compuestos **4**, R_P -**4** o S_P -**4**, que comprende: a) hacer reaccionar un 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 S_P -**4** y R_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 uno de S_P -**4** protegido y R_P -**4** protegido; y c) opcionalmente someter la segunda mezcla a cristalización, cromatografía o extracción para obtener **4**, S_P -**4** o R_P -**4**.

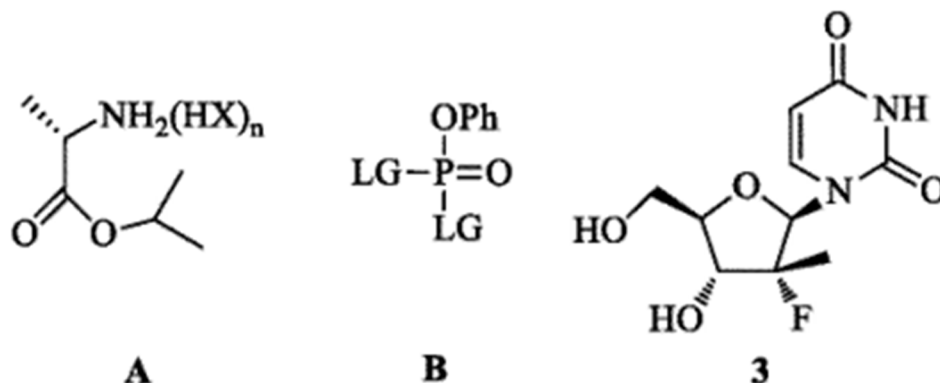
[0111] El alanato de isopropilo puede estar presente como su sal de ácido clorhídrico, que es preferiblemente, sustancialmente anhidra.

[0112] La base puede ser N-metilimidazol.

[0113] La relación molar de **A** a **B** a **3** puede ser de aproximadamente 1,6 a 1,3 a 1.

[0114] El compuesto protector puede ser t-butil-dimetil-sililo-cloruro.

[0115] También se describe aquí un proceso para la preparación de S_P -**4** o R_P -**4**, que comprende: a) hacer reaccionar un 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 S_P -**4** y R_P -**4**,



en donde X es una base conjugada de un ácido, n es 0 o 1, y LG es un grupo saliente; y b) someter opcionalmente la segunda mezcla a la cristalización, cromatografía, o extracción con el fin de obtener purificado S_P-4 o R_P-4 .

[0116] El proceso anterior puede, además, incluir purificar aún más la segunda mezcla o R_P-4 purificado disolviendo o suspendiendo la segunda mezcla o la mezcla purificada de R_P-4 en un disolvente; opcionalmente seguido de la siembra con R_P-4 cristalino; y añadir suficiente antidisolvente para obtener R_P-4 cristalino.

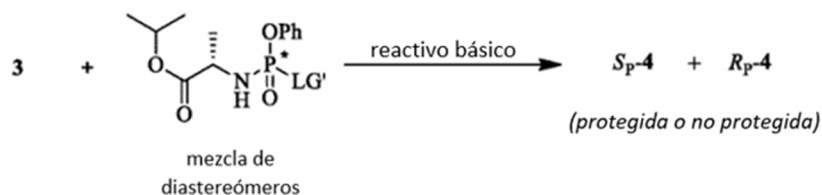
[0117] El proceso anterior puede, además, incluir purificar aún más la segunda mezcla o S_P-4 purificado por d) disolver o suspender la segunda mezcla o S_P-4 purificado en un disolvente seguido de la siembra con S_P-4 cristalino en sobre la temperatura ambiente; recoger un primer sólido cuya mayoría comprende S_P-4 ; disolver el primer sólido en un disolvente a su temperatura de reflujo; y enfriar o añadir un antidisolvente para obtener un segundo sólido.

[0118] El proceso anterior puede incluir adicionalmente además purificar S_P-4 por d) disolver o suspender la segunda mezcla o mezcla purificada de S_P-4 en un primer disolvente seguido por la adición de un modo anti-disolvente para obtener una primera composición en donde el disolvente/antidisolvente residual se elimina por decantación para obtener un residuo; tratar el residuo con una solución que contiene el primer disolvente y antidisolvente para producir una segunda composición mediante la cual, al reducir la presión, se obtiene un primer sólido; disolver o suspender el primer sólido usando un segundo disolvente para obtener una tercera composición; añadir cristales semilla de S_P-4 a la tercera composición; recoger un segundo sólido; disolver o suspender el segundo sólido en un tercer solvente, calentar opcionalmente a la temperatura de reflujo del tercer solvente para obtener una cuarta composición y, si es necesario, enfriar la cuarta composición para obtener un tercer sólido que comprende S_P-4 que es recolectado por filtración.

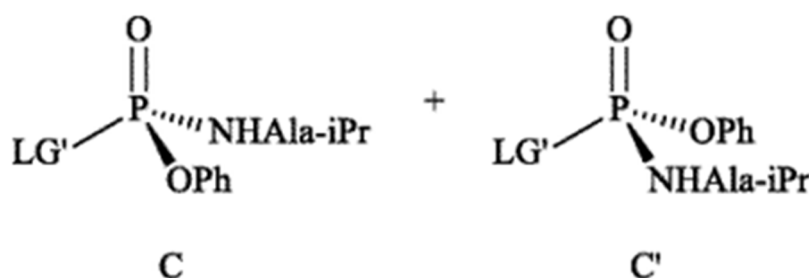
[0119] En el método anterior S_P-4 se puede purificar aún más por la segunda mezcla o S_P-4 purificado por d) añadir gel de sílice a la segunda mezcla o S_P-4 purificado seguido por evaporación del disolvente para proporcionar una lechada seca; agitar la lechada seca en una primera combinación de disolvente/antidisolvente para obtener una primera lechada húmeda; decantar la primera combinación disolvente/antidisolvente de la primera suspensión húmeda para obtener una segunda suspensión húmeda y una primera composición; añadir a la segunda suspensión húmeda una segunda combinación de disolvente/antidisolvente seguido de agitación; decantar la segunda combinación de disolvente/antidisolvente de la segunda suspensión húmeda para obtener una tercera suspensión húmeda y una segunda composición; opcionalmente repetir las etapas g) – h) en la tercera suspensión húmeda o suspensiones húmedas adicionales; evaporar el disolvente de la segunda composición y, opcionalmente, cualquier composición adicional obtenida del Paso opcional i) para obtener un primer sólido; disolver o suspender el primer sólido en una solución que contiene un tercer disolvente y opcionalmente un cuarto disolvente para obtener una tercera composición; añadir opcionalmente cristales semilla de S_P-4 a la tercera composición; obtener de la tercera composición un segundo sólido que comprende S_P-4 ; y opcionalmente recrystallizar el segundo sólido usando un tercer disolvente para obtener un tercer sólido que comprende S_P-4 .

[0120] Un experto apreciará que los compuestos se pueden separar por extracción tradicional, cristalización tradicional o técnicas cromatográficas tradicionales. Las técnicas cromatográficas tradicionales incluyen, pero no se limitan a cromatografía en gel de sílice (usando, por ejemplo, 3-5% de metanol en DCM o 4-6% de isopropanol en DCM) para producir niveles mejorados de un isómero (50-100%) y luego cristalizarlo. Alternativamente, se podría usar cromatografía de fase inversa (usando, por ejemplo, una fase móvil acuosa de acetonitrilo al 1-30%). Además, los compuestos pueden aislarse mediante cromatografía de fluidos supercríticos SFC con dióxido de carbono como disolvente principal y alcoholes tales como metanol como modificador, preferiblemente usando los medios quirales apropiados, tales como Daicel Chiralpack IA. Alternativamente, se puede emplear la cromatografía SMB utilizando los medios quirales apropiados, como Daicel ChiralPack IA, utilizando una mezcla de disolventes como hexanos/isopropanol o disolventes simples como acetato de etilo.

[0121] También se describe aquí un proceso para la preparación de S_P-4 , que comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con un extremo 3' O protegida o sin protección 3, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende protegida o no protegido S_P-4



en donde el isopropil-alanil-fosforamidato se compone de una mezcla de diastereoisómeros representada por las siguientes estructuras:



en donde la relación de C: C' es de aproximadamente 1:1.

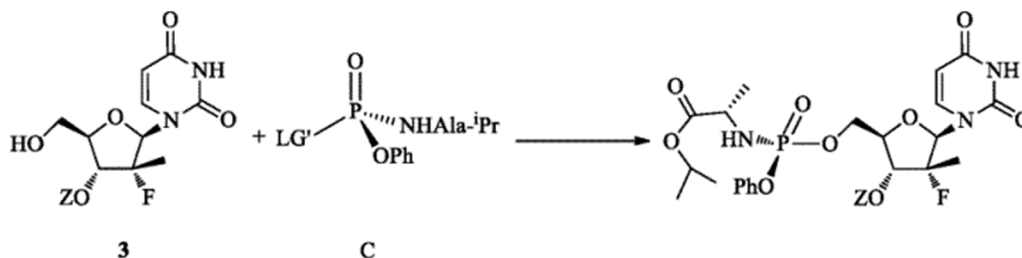
[0122] El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'** es mayor que o igual a aproximadamente 1:1.

[0123] El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'**; es mayor que aproximadamente 1:1.

[0124] El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la relación de **C:C'** es al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1 o aproximadamente 99: 1.

[0125] El LG' se puede seleccionar de entre, 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido, y pentafluorofenóxido, el reactivo básico es t-butilmagnesio cloruro, y la relación de **C:C'** puede ser de al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1, o aproximadamente 99: 1.

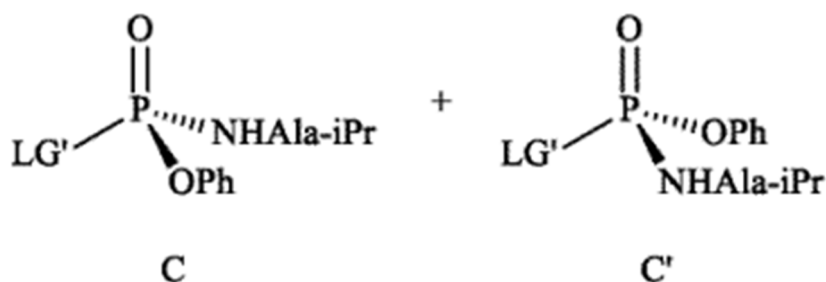
[0126] El proceso anterior puede comprender: a) hacer reaccionar un isopropilo-alanil-fosforamidato (C) con un 3'-O-protegido o no protegido 3, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende protegido o no protegido S_P-4 ,



en donde Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo saliente; y b) opcionalmente someter el S_P-4 obtenido protegido o no protegido a cromatografía, extracción o cristalización con el fin de obtener S_P-4 purificado protegido o no protegido. LG' puede ser tosilato, canforsulfonato, o un arilóxido sustituido con al menos un grupo aceptor de electrones; más preferiblemente, LG' puede seleccionarse entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido o pentafluorofenóxido. Cuando S_P-4 está protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso puede ser dirigido además a desproteger S_P-4 protegido. La reacción puede realizarse en un

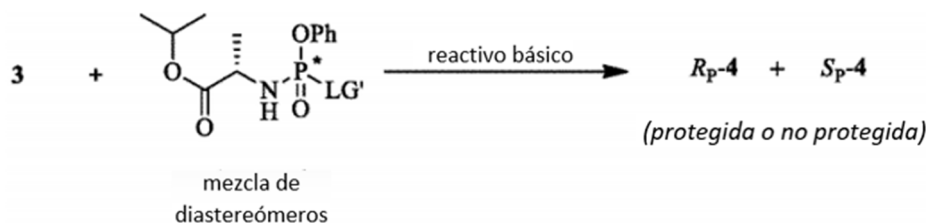
disolvente aprótico polar, como tetrahidrofurano u otro disolvente etéreo, ya sea solo o en combinación entre sí o con un nitrilo C₂ a C₇, como acetonitrilo.

[0127] El método puede comprender además 1) hacer reaccionar (LG')P(O)(LG)₂, en donde LG, independiente de LG', es un grupo saliente, con (i) isopropil-alanato y una primera base, para obtener (LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr) seguido de la reacción de (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 de la reacción de (LG')P(O)(LG)(OPh) con isopropil-alanato y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C', o (iii) combinar alanato de isopropilo, fenol y al menos una base para obtener una mezcla que comprende C y C'; o 2) hacer reaccionar (PhO)P(O)(LG)₂, en donde LG 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 del grupo saliente (LG'H) y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C',

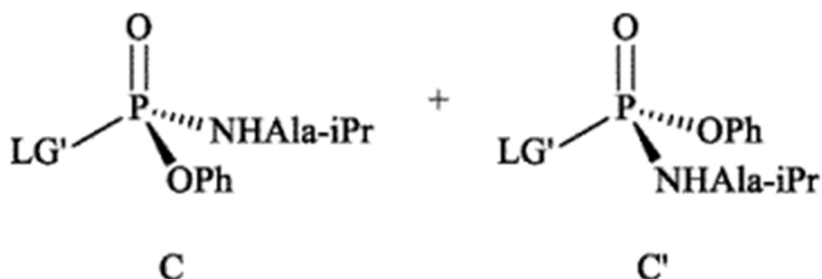


y someter la mezcla a cromatografía o cristalización de la mezcla para obtener C. El alanato de isopropilo puede estar presente como su sal de ácido clorhídrico, que preferiblemente es sustancialmente anhidro.

[0128] También se describe aquí un proceso para preparar Rp-4, que comprende: a) hacer reaccionar un isopropil-alanil-fosforamidato con un extremo 3'-O protegida o no protegida 3, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende Rp-4 protegida o desprotegida



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



en donde la relación de C':C es aproximadamente 1:1.

[0129] El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de C':C puede ser mayor que o igual a aproximadamente 1:1.

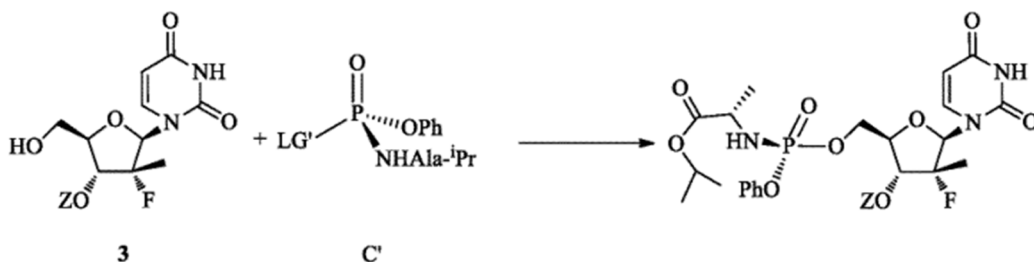
[0130] El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de C':C; puede ser mayor de aproximadamente 1:1.

[0131] El reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio y la proporción de C':C puede ser al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente

9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1 o aproximadamente 99:1.

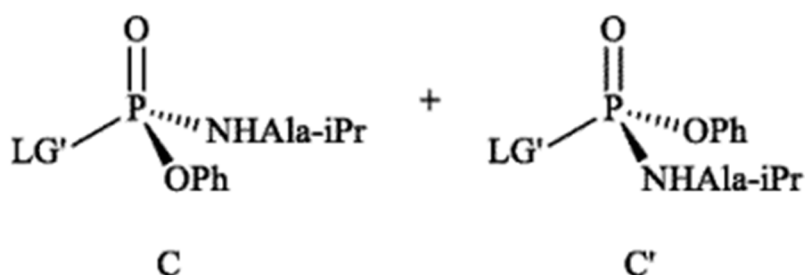
[0132] El LG' puede ser p-nitrofenóxido, el reactivo básico puede ser cloruro de t-butilmagnesio, y la proporción de C':C quizás al menos aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 2,3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5,7:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 32,3:1, aproximadamente 49:1, o aproximadamente 99:1.

[0133] El proceso anterior puede comprender: a) hacer reaccionar un isopropilo-alanil-fosforamidato (C') con un 3'-O-
protegido o no protegido 3, y un reactivo básico para obtener una composición que comprende protegido o no protegido
Rp-4



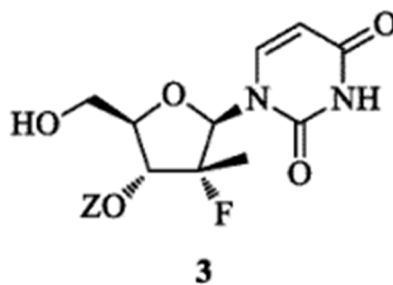
en donde Z es un grupo protector o hidrógeno; LG' es un grupo saliente; y b) opcionalmente someter el Rp-4 protegido o no protegido obtenido a cromatografía, extracción o cristalización para obtener Rp-4 purificado protegido o desprotegido. LG' puede ser tosilato, canforsulfonato o un arilóxido sustituido con al menos un grupo de extracción de electrones; más preferiblemente, LG' puede seleccionarse entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido y pentafluorofenóxido. Cuando Rp-4 está protegido, es decir, Z no es hidrógeno, el proceso puede dirigirse además a desproteger Rp-4 protegido. La reacción puede realizarse en un disolvente aprótico polar, como tetrahidrofurano u otro disolvente etéreo, ya sea solo o en combinación entre sí o con un nitrilo C₂ a C₇, como acetonitrilo.

[0134] El método puede comprender además 1) hacer reaccionar (LG')P(O)(LG)₂, en donde LG, independiente de LG', es un grupo saliente, con (i) isopropil-alanato y una primera base, para obtener (LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr) seguido de la reacción de (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 de la reacción de (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', independiente de LG, es un grupo saliente, con (i) isopropil-alanato y una primera base para obtener (PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr) seguido de la reacción de (PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr) con un precursor del grupo saliente y una segunda base para obtener una mezcla que comprende C y C',



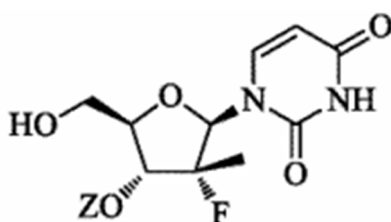
y sometiendo la mezcla a cromatografía o cristalización de la mezcla para obtener C'. El alanato de isopropilo puede estar presente como su sal de ácido clorhídrico, que preferiblemente es sustancialmente anhidro.

[0135] También se describe aquí un compuesto 3



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

[0136] El compuesto **3** puede ser seleccionado de entre un compuesto que tiene la siguiente estructura



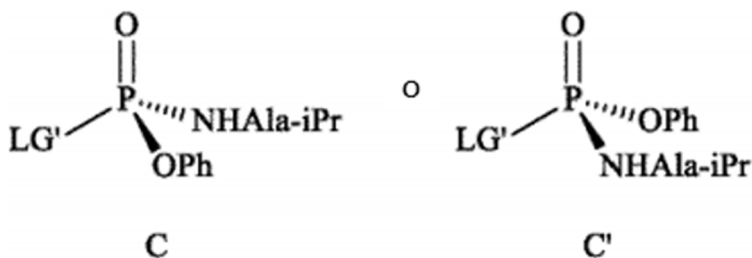
3a: Z = -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃

3b: Z = -C(O)OCH₂Ph

3c: Z = -Si(Me)₂ⁱBu

3d: Z = -Si(ⁱPr)₂OSi(ⁱPr)₂OH

[0137] También se describe aquí un compuesto, su sal, hidrato, solvato, o una combinación de los mismos, representada por las siguientes estructuras



donde LG' es un grupo saliente, que es útil para la preparación de *R_P*-4 o *S_P*-4.

[0138] LG' puede ser tosilato, canforsulfonato, un arilóxido, o un arilóxido sustituido con grupo de extracción de al menos un electrón.

[0139] LG' puede ser seleccionado de entre 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido, o pentafluorofenóxido.

[0140] LG' puede ser pentafluorofenóxido o 4-nitro-fenóxido.

[0141] Los siguientes compuestos se describen: compuesto C, en donde LG' es 2,4-dinitrofenóxido, 4-nitrofenóxido, 2-nitrofenóxido, 2-cloro-4-nitrofenóxido, 2,4-diclorofenóxido, o pentafluorofenóxido;

compuesto C, en donde LG' es 4-nitrofenóxido o pentafluorofenóxido;

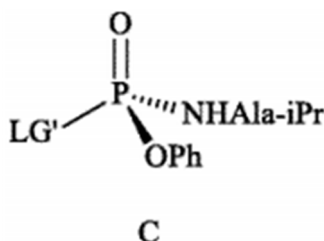
compuesto C, en donde LG' es 4-nitrofenóxido;

compuesto C, en donde LG' es 4-nitrofenóxido;

compuesto C, en donde LG' es pentafluorofenóxido; y

compuesto C, en donde LG' es pentafluorofenóxido.

[0142] También se describe aquí un proceso para preparar un compuesto representado por la Fórmula estructural



cristalización del compuesto a partir de una composición, que comprende

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

en donde la primera composición comprende el compuesto y su correspondiente diastereómero basado en P.

[0143] La cantidad en moles del compuesto y la cantidad molar de su diastereómero basado en P pueden ser iguales o diferentes.

[0144] La cantidad en moles del compuesto puede ser mayor que la cantidad molar de su diastereómero basado en P correspondiente o viceversa.

[0145] El segundo precursor del grupo saliente puede ser 2,4-dinitrofenol, 4-nitrofenol, 2-nitrofenol, 2-cloro-4-nitrofenol, 2,4-dicloro-4-nitrofenol, o pentafluorofenol,

[0146] LG' puede ser pentafluorofenóxido. El segundo precursor del grupo saliente puede ser pentafluorofenol. La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,01 equivalentes molares a aproximadamente 10 equivalentes molares con respecto a la cantidad molar del compuesto y su diastereómero basado en P y todos los equivalentes molares intermedios. La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,1 equivalentes molares a aproximadamente 1 equivalent molar con respecto a la cantidad molar del compuesto y su diastereómero basado en P y todos los equivalentes molares intermedios.

[0147] La cristalización se puede producir a una temperatura que varía de aproximadamente -10°C a aproximadamente +40°C y todos los valores de temperatura intermedios. La cristalización puede ocurrir aproximadamente a temperatura ambiente.

[0148] La base no nucleofílica puede seleccionarse entre 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-dimetilamino-piridina, piridina, un 2,6-di-alquilo C₁₋₆-piridina, un 2,4,6-tri-alquilo C₁₋₆-piridina y mezclas de los mismos. La base no nucleofílica puede ser trietilamina o 1,8-diazabicycloundec-7-eno. La base no nucleofílica puede ser trietilamina.

[0149] La base no nucleofílica puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 equivalentes molares a aproximadamente 10 equivalentes molares, y todos los equivalentes molares en el medio, con relación a la cantidad molar total del compuesto y su diastereómero basado en P. La base no nucleofílica puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 equivalentes molares a aproximadamente 1 equivalente molar, y todos los equivalentes molares intermedios, en relación con la cantidad molar total del compuesto y su diastereómero basado en P.

[0150] La solubilidad del compuesto puede ser inferior a la solubilidad de su correspondiente diastereómero basado en P en la composición líquida o viceversa.

[0151] La composición líquida puede comprender al menos uno de un disolvente y un anti-disolvente. La composición líquida puede comprender al menos uno de un C₁ a C₈ alcohol, un C₂ a C₈ éter, un C₃ a C₇ cetona, un C₃ a C₇ éster, un C₁ a C₂ clorocarbono, un C₂ a C₇ nitrilo, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂ y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de un C₂ a C₈ éter, un C₃ a C₇ éster, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂ y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de un C₂ a C₈ éter, un C₃ a C₇ éster y un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de acetato de etilo, t-butil-metiléter y hexano. La composición líquida puede comprender acetato de etilo y hexano. La composición líquida puede comprender t-butilmetiléter y hexano.

[0152] La cantidad de composición líquida varía de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml por cada gramo de la primera composición y todos los valores ml/g en el medio.

5 **[0153]** El compuesto cristalino se puede añadir a la composición. El proceso puede comprender la adición de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1% en peso, y todo en peso valores de % en el medio, de compuesto cristalino a la primera composición.

10 **[0154]** El proceso comprenden además

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

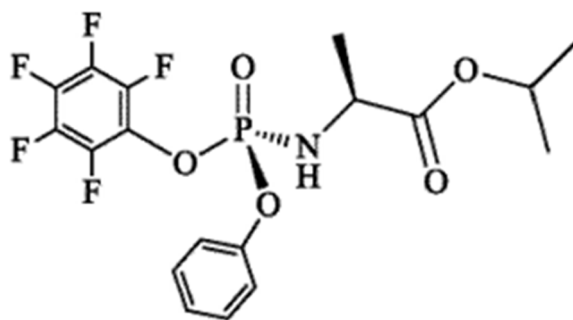
b) hacer reaccionar $(\text{PhO})\text{P(O)(LG)(NHAla-}^i\text{Pr)}$ con un primer precursor del grupo saliente ($\text{LG}'\text{H}$) en presencia de una segunda base para obtener la composición que comprende el compuesto y su diastereómero basado en P;

en donde LG y LG', independientes entre sí, son grupos salientes;

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

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

[0155] También se describe aquí un proceso para preparar (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato cristalino que tiene la siguiente estructura,



que comprende:

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

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

en donde la segunda composición comprende (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato y (S)-isopropilo 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato.

[0156] La cantidad en moles del (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato y la cantidad en moles del (S)-isopropil 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato pueden ser iguales o diferentes.

[0157] La cantidad en moles del (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato puede ser mayor que la cantidad en moles del (S)-isopropil 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato.

[0158] La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,01 equivalentes molares a aproximadamente 10 equivalentes molares (y todos los valores equivalentes molares en el medio) en relación a la cantidad en moles de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato y (S)-isopropil 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato. La cantidad de pentafluorofenol puede variar de aproximadamente 0,1 equivalentes molares a aproximadamente 1 equivalente molar (y todos los valores equivalentes molares intermedios) en relación con la cantidad molar de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato y (S)-isopropil 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato.

[0159] La cristalización se puede producir a una temperatura que varía de aproximadamente -10°C a aproximadamente +40°C y todos los valores de temperatura intermedios. La cristalización puede ocurrir aproximadamente a temperatura ambiente.

[0160] La base no nucleófila puede ser seleccionada de entre 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, 2,6-di-alquilo C₁₋₆-piridina, un 2,4,6-tri-C₁₋₆ alquilo-piridina y mezclas de los mismos. La base no nucleófila puede ser trietilamina o 1,8-diazabicycloundec-7-eno. La base no nucleófila puede ser trietilamina.

[0161] La base no nucleófila puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 equivalente molar (y todos los valores equivalentes molares en el medio) en relación a la cantidad molar total de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato y (S)-isopropil 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato.

[0162] La solubilidad de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato puede ser menor que la solubilidad de (S)-isopropil 2-(((R)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato en la composición líquida.

[0163] La composición líquida puede comprender al menos uno de un disolvente y un anti-disolvente. La composición líquida puede comprender al menos uno de C₁ a C₈ alcohol, C₂ a C₈ éter, C₃ a C₇ cetona, C₃ a C₇ éster, C₁ a C₂ clorocarbon, C₂ a C₇ nitrilo, un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂ y un hidrocarburo aromático C₆ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de C₂ a C₈ éter, C₃ a C₇ éster, C₅ a C₁₂ hidrocarburo saturado, y C₅ a C₁₂ hidrocarburo aromático. La composición líquida puede comprender al menos uno de C₂ a C₈ éter, C₃ a C₇ éster y un hidrocarburo saturado C₅ a C₁₂. La composición líquida puede comprender al menos uno de acetato de etilo, t-butil-metiléter y hexano. La composición líquida puede comprender acetato de etilo y hexano. La composición líquida puede comprender t-butilmetiléter y hexano.

[0164] La cantidad de composición líquida puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 ml por cada gramo (y todos los valores ml/g en el medio) de la primera composición.

[0165] El proceso puede comprender además la adición de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato cristalino a la segunda composición.

[0166] El proceso puede comprender además la adición de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1% en peso (y todos los valores intermedios de % en peso) de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato cristalino basado en el peso total de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato en la primera composición.

[0167] Como se describe en el presente documento puede ser obtenido (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato cristalino por el método anterior.

[0168] También se describe aquí un método para preparar (S)-isopropil 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, que comprende:

cristalización de (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de una segunda composición que comprende

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

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

[0169] El proceso anterior para la preparación de (S)-isopropil 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, puede comprender:

poner en contacto (S)-isopropil 2-(((S)-(perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato con un producto obtenido por reacción de un haluro de t-butilmagnesio con 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidin-2,4 (1H, 3H)-diona con un haluro de t-butilmagnesio.

[0170] La puesta en contacto puede producirse en un medio que tiene una temperatura que varía de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C todos los valores de temperatura intermedios.

[0171] La puesta en contacto puede producirse en un medio que tiene una temperatura que varía de aproximadamente

0°C a aproximadamente 30° todos los valores de temperatura intermedios.

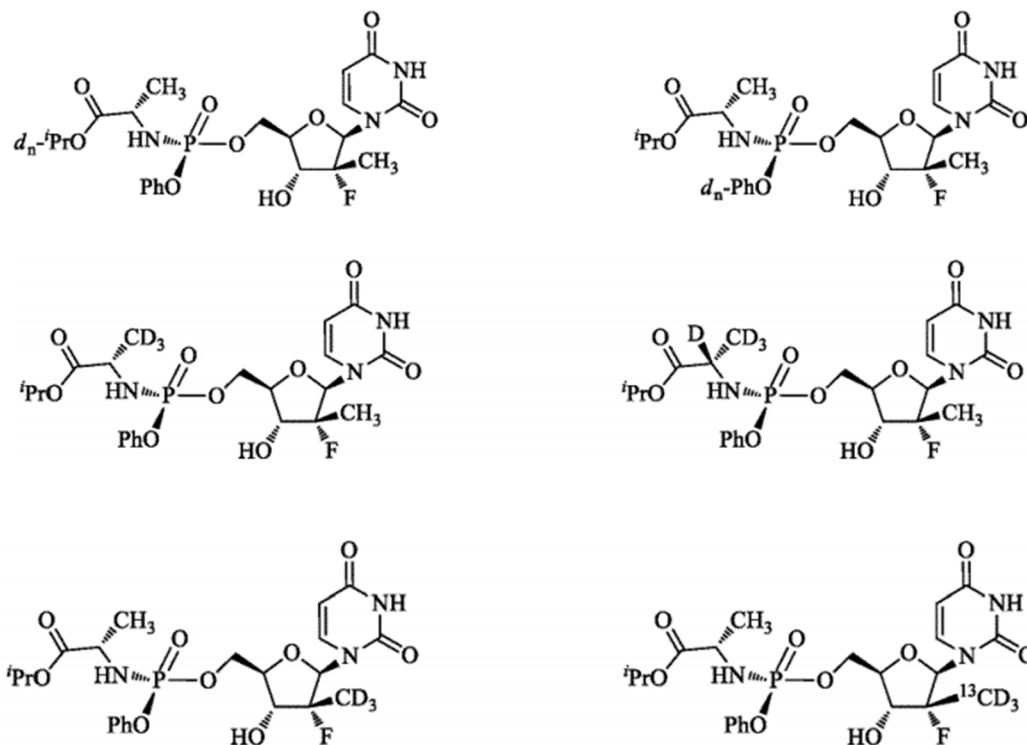
[0172] La relación molar de haluro de t-butilmagnesio a 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2, 4 (1H, 3H)-diona puede oscilar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 2,2. La relación molar de haluro de t-butilmagnesio a 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona puede ser de aproximadamente 2,1.

[0173] El haluro de t-butilmagnesio puede ser cloruro de t-butilmagnesio.

[0174] También se describe aquí un proceso para preparar (S)-isopropil 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 sustancialmente puro, que comprende:

obtener (S)-isopropil 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 acuerdo con cualquiera de las formas de realización relevantes descritas en este documento, y
cristalización de (S)-isopropil 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.

[0175] También se describe aquí un análogo marcado isotópicamente de *R_P*-**4** o *S_P*-**4**. El término análogo "marcado isotópicamente" se refiere a un análogo de *R_P*-**4** o *S_P*-**4** que es un "análogo deuterado", un "análogo marcado con ¹³C" o un análogo "deuterado/marcado con ¹³C". El término "análogo deuterado" significa un compuesto descrito en el presente documento, en donde un isótopo ¹H, es decir, hidrógeno (H), está sustituido por un isótopo ²H, es decir, deuterio (D). La sustitución de deuterio puede ser parcial o completa. La sustitución parcial de 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 en la materia puede contemplar al menos los siguientes análogos deuterados parciales (donde "d_n" representa un número n de átomos de deuterio, por ejemplo, para un grupo isopropilo n = 1-7, así como para un grupo fenilo, n = 1-5), así como los que se muestran a continuación.



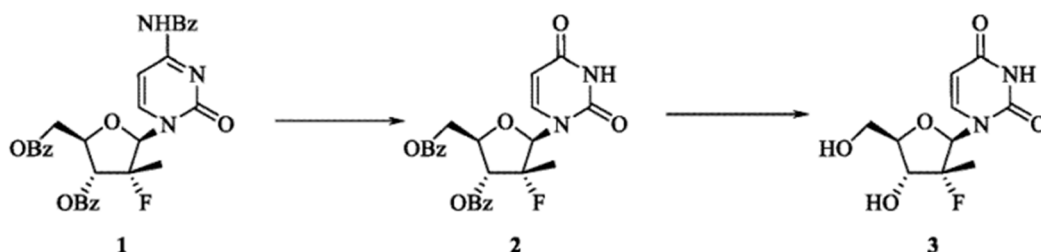
Aunque los grupos metilo representados anteriormente se muestran como completamente deuterados, se reconocerá que también son posibles variaciones parciales deuteradas, tales como, -CDH₂ y -CD₂H. También se contemplan las etiquetas isotópicas en la furanosa y la base. Asimismo, los términos "análogo marcado con ¹³C" y "análogo deuterado/marcado con ¹³C" se refieren a un compuesto descrito en el presente documento, en donde el átomo de carbono está enriquecido con un isótopo ¹³C, lo que significa que el grado de enriquecimiento supera la abundancia natural habitual de alrededor del 1,1%.

Ejemplos

[0176] Sin limitarse a modo de ejemplo, los siguientes ejemplos sirven para facilitar una mejor comprensión de la divulgación.

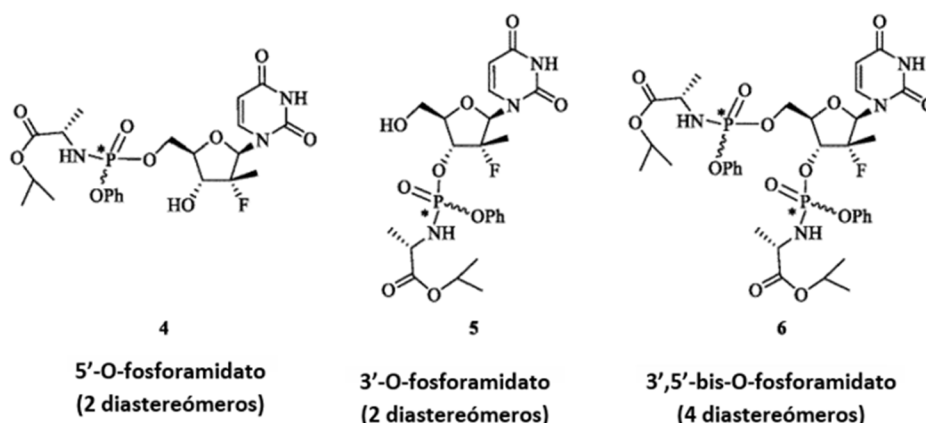
5 Aspectos sintéticos

[0177] Con el fin de preparar el nucleósido de uridina, se podría aprovechar un intermedio de citidina tribenzoilada avanzado en la síntesis de ciertos análogos 3',5'-diacilados de **3** (ver abajo) ya producidos de manera eficiente a escala de planta piloto (ver WO 2006/031725 o US 2006/0122146). Se encontró que el siguiente método es escalable y rentable.



[0178] 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxy-2'-fluoro-2'-C-metil-N 4-benzoilcitidina (**1**) se obtiene mediante un método descrito en los documentos WO 2006/031725 y WO 2008/045419. **1** se trata con ácido acético acuoso al 70% para formar 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxy-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (**2**). Los ésteres de benzoílo también pueden hidrolizarse mediante varios métodos, por ejemplo, alcóxidos en disolvente alcohólico, como metóxido de sodio en metanol, carbonato de potasio en metanol, o análogos de etanol, alquilaminas como metilamina en metanol, butilamina, etc. Se utilizó amoníaco metanólico elegido para el trabajo a mayor escala. El producto de uridina (**3**) se puede purificar por cristalización para proporcionar un rendimiento del 70% de la citidina tribenzoilada (**1**).

[0179] Numerosos métodos de la literatura describen diferentes rutas y condiciones para hacer fosforamidatos utilizando varios equivalentes de plegado de reactivos. Véase, por ejemplo, McGuigan et al. J. Med. Chem. 2005, 48, 3504-3515 y McGuigan et al. J. Med. Chem. 2006, 49, 7215. Para el trabajo a escala de proceso, solo hay un ejemplo conocido actualmente, que se describe en Lehsten et al., Org. Proceso Res. Dev. 2002, 6, 819 - 822 ("Lehsten"). En esta referencia, los autores introducen el concepto de un "método en un solo recipiente" en donde una sal de hidrocloreuro de aminoácido y diclorofosfato de fenilo se hacen reaccionar junto con N-metilimidazol en diclorometano. Posteriormente, se añade el nucleósido para formar el producto 5'-O-fosforamidato deseado, que en el presente caso produciría un compuesto representado por la Fórmula 4. Desafortunadamente, el método de Lehsten adolecía de inconvenientes. Por ejemplo, el método de Lehsten utilizó un exceso de reactivos mucho mayor de lo necesario, lo que aumentó el costo y la dificultad de la purificación cromatográfica. Además, Lehsten sugirió que se podría controlar la selectividad de la reacción en el 5'-hidroxilo sobre el 3'-hidroxilo en comparación con una referencia de la literatura mediante el uso de temperaturas más bajas y la adición lenta del nucleósido.



[0180] El uso del método de Lehsten para los compuestos descritos en el presente documento proporcionó aproximadamente 1-5% de diastereómeros 3'-O-fosforamidato monosustituídos (**5**) y aproximadamente un 10-30% del producto bis-sustituído (**6**). Al ser la polaridad de los diastereoisómeros 3' era muy similar a la de los diastereoisómeros 5' deseados (**4**), la separación cromatográfica fue muy desafiante. Escalar el proceso fue casi imposible sin descartar una porción sustancial de los diastereómeros 5' menos polares (**4**) o aceptar un nivel más alto de contaminación de los diastereoisómeros 3' (**5**). En una escala inicial de 50 g, el producto resultante contenía una contaminación del diastereoisómero 3' (**5**) de aproximadamente el 3%, que coeluyó con el diastereómero 5' menos polar (**4**).

[0181] En el presente documento se describen las condiciones de reacción que usan cantidades menores de reactivos y un método para eliminar selectivamente los diastereómeros de 3'-O-fosforamido de impureza (5) con una separación cromatográfica más fácil, proporcionando así los diastereoisómeros de 5'-O-fosforamido deseados en mucho mayor pureza (4).

[0182] Para la estequiometría del reactivo, se hizo un estudio en donde la estequiometría de los reactivos fue cambiado sistemáticamente y los resultados fueron controlados por el fósforo de RMN de la reacción en bruto como había informado Lehsten. En las ejecuciones más exitosas, se compararon el rendimiento aislado y la pureza 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 competitiva entre el progreso de la reacción de consumir todo el nucleósido de partida y convertir los productos 5' y 3' monosustituídos (4 y 5) en los productos 5',3'-bis sustituidos (6). El producto monosustituído en 3' se convierte en el producto bis a una velocidad más rápida que el producto monosustituído en 5', por lo que es posible reducir el nivel de contaminación del diastereoisómero 3' empujando la reacción más hacia los productos sustituidos en bis. Sin embargo, con una forma eficaz de eliminar los diastereoisómeros 3', la reacción se puede optimizar para producir más del diastereoisómero 5' deseado sin tener que sacrificar la mayor parte del diastereoisómero 5' que se convierte en bis-sustituído (6). También se observó que el clorhidrato de aminoácido es muy higroscópico. Ya que cualquier 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 encontró que la relación óptima de aminoácido a diclorofosfato de fenilo a nucleósido de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1 es óptima en condiciones en las que el diastereómero 3' puede eliminarse eficazmente y cuando el hidrocloreto de aminoácido es sustancialmente anhidro. Utilizando una cantidad menor de reactivos, se consigue un ahorro de costes junto con una simplificación de la separación cromatográfica del producto deseado de los subproductos de los reactivos y del nivel reducido de bis diastereoisómeros.

[0183] En un método alternativo, un derivado de 3'-hidroxilo-bloqueado de 3 se preparó usando un grupo de bloqueo en dos etapas de t-butildimetilsililo. A continuación, se convirtió en su derivado 5'-fosforamido. El deseo es que el grupo sililo pueda ser eliminado y no habrá isómeros 3' (5) o 3',5'-bis fosforamidos (6). Borch y Fries (Patente de Estados Unidos 5,233,031) demostraron un enfoque similar con un bajo rendimiento global en un alquilfosforamido.

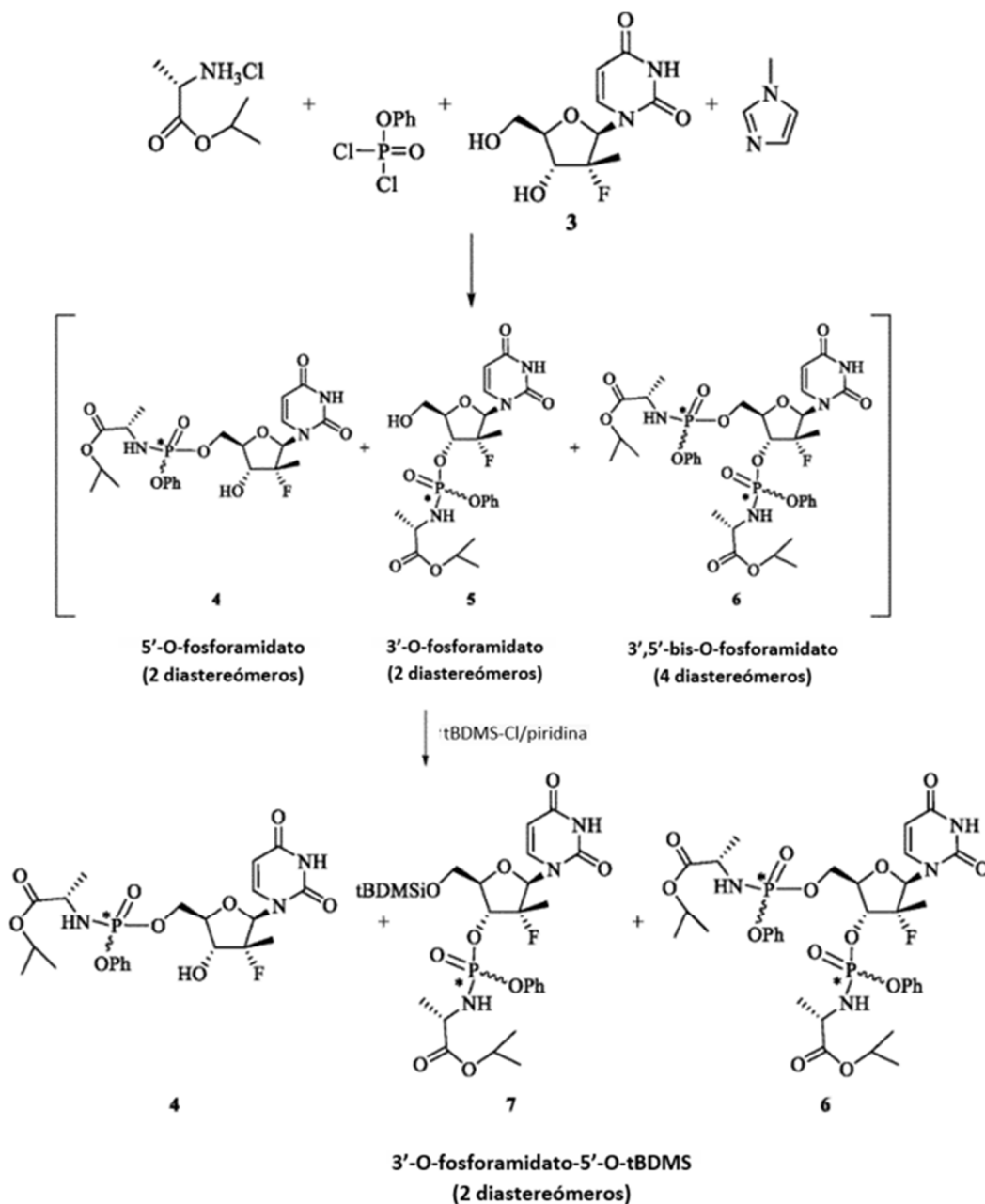
[0184] Otro enfoque alternativo fue usar la síntesis directa y luego usar la química para ayudar a diferenciar las impurezas de 3'-diastereómero 5 de los 5'-diastereómeros deseados 4 para ayudar a la separación. Se deseaba un grupo que reaccionara selectivamente con el hidroxilo primario libre de la impureza 5 de 3'-O-fosforamido sobre el hidroxilo secundario libre del 5'-O-fosforamido 4 deseado. También se deseaba que el grupo de bloqueo cambiara significativamente la polaridad del producto de 3'-O-fosforamido 5'-O-bloqueado resultante del 5'-O-fosforamido deseado 4. No se necesitaría un paso adicional para eliminar el grupo de bloqueo, ya que los diastereoisómeros 5'deseados 4 no cambiarían. Los diastereoisómeros 3' químicamente alterados permitirían entonces una separación cromatográfica más fácil o una separación mediante soportes de barrido especiales o mediante extracciones.

[0185] Específicamente, el grupo bloqueante terc-butildimetilsililo (tBDMS) cumplió con estos criterios y fue el primero en ser demostrado y posteriormente utilizado en un escala. Bajo ciertas condiciones tales como en piridina como solvente y base, el grupo tBDMS reacciona con alta selectividad en la posición del hidroxilo primario sobre la posición del hidroxilo secundario 3'. La reacción de fosforamido utiliza N-metilimidazol (NMI) como base. En presencia de NMI, la sililación es menos selectiva. Preferiblemente, debería reducirse la cantidad de NMI. Esto se puede lograr fácilmente después de la reacción de fosforamido lavando la solución de reacción con ácido clorhídrico 1 N. Se eliminan el NMI y el nucleósido de partida restante, dejando una mezcla bruta de productos mono y bis sustituidos y subproductos de reactivos. A continuación, se disuelve en piridina y se trata con cloruro de terc-butildimetilsililo. El producto 5 monosustituído en 3' se convierte en unas pocas horas o menos en el 5'-O-tBDMS-3'-O-fosforamido 7. El progreso de la reacción puede controlarse mediante HPLC. La polaridad de este producto sililado 7 es menor que la del bis-fosforamido 6 y se elimina fácilmente por cromatografía. Usando este método, fue posible reducir el nivel de 3'-monofosforamido 5 a menos del 0,1% del producto 5' 4 en comparación con el 1-3% sin el tratamiento con sililo. De manera similar, el tratamiento con cloruro de dimetoxitriphenilmetilo (DMT-Cl) en las mismas condiciones funcionó igual de bien. También fue más fácil identificar el producto de reacción DMT por TLC ya que las moléculas que contienen DMT se tiñen de color naranja brillante al calentarlas o exponerlas a un ácido. También se pueden imaginar muchos otros grupos de bloqueo, como se señaló anteriormente.

[0186] Tanto las condiciones de reacción como el barrido de la impureza 3' son métodos generales y se podrían aplicar a la mayoría de fosforamidos de nucleósidos con un hidroxilo libre 3'. El resto de fosforamido podría ser cualquier combinación de éster de aminoácido y alcohol aromático. El resto nucleósido podría ser cualquier nucleósido en donde un fosforamido 5' conduciría a un monofosfato 5' y podría metabolizarse adicionalmente a la forma de trifosfato 5'.

[0187] El siguiente esquema es el esquema de reacción principal se ilustra para la fabricación de isopropil L-alanato fenilo fosforamido de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina con el producto principal como 5'-O-fosforamido deseado (4, dos diastereómeros) y el producto menor como el 3'-O-fosforamido (5, dos diastereómeros) y el 3',5'-bis-O-fosforamido (6, cuatro diastereoisómeros). Los reactivos se añaden en las proporciones estequiométricas

como se describe en la sección de método de preparación. Se deja que la reacción prosiga hasta que quede aproximadamente un 5% del material de partida según se juzga por visualización UV en cromatografía en capa fina (TLC). También la UPLC/MS mostró que aproximadamente el 10% del bisfosforamidato **6** en 3',5' se había formado en comparación con el producto 5' deseado. Después de inactivar y un tratamiento acuoso ácido, se preparó el residuo bruto de la capa orgánica para la sililación. En las condiciones de reacción descritas, el grupo sililo reaccionó preferentemente con el 5'-hidroxilo libre del 3'-O-fosforamidato para formar **7**. La reacción continuó hasta que el 3'-O-fosforamidato ya no fue detectable por UPLC/MS.



[0188] Después de la elaboración de la reacción de sililación, el producto deseado se somete a cromatografía sobre gel de sílice y se eluye con un gradiente de metanol en diclorometano (1-4%). El 5'-monofosforamidato **4** deseado eluye en último lugar.

Método de preparación

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

[0189] En un matraz de 10 L, se añadió 3',5'-O-dibenzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N4-benzoilcitidina (500 g, 0,874 mol) y ácido acético acuoso al 70% (7,5L). La solución se calentó a reflujo (110°C) durante 20 h. La TLC indicó una reacción completa (Rf 0,6 en metanol al 5% en diclorometano (DCM)). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y

se diluyó con agua (2L). Después de agitar durante 2 h, el precipitado resultante se recogió por filtración y el sólido se enjuagó con agua (5 L) y se secó en la atmósfera a temperatura ambiente durante 12 h para proporcionar 360 g (88%). Este intermedio de dibenzoiluridina se utilizó directamente en el siguiente paso añadiéndolo todo a amoniaco metanólico recién preparado (5,4 L, ca 25%) a 0°C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 h y luego se dejó calentar a 15°C durante 24 h. La TLC indicó una reacción completa (Rf 0,4 en metanol al 10% en DCM). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y se concentró a presión reducida para dar 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 recogió mediante 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 con una pureza de HPLC del 98,7%. ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ 11,44 (s ancho, 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, C_{5'}-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'CH₃). es -MS M-1 259.

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

[0190] Sinónimo: Mezcla diastereomérica de 5'-O-(isopropil-L-alanato, fenilfosforamidil)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina.

[0191] Un matraz de 5 L de 3 bocas se equipó con un agitador mecánico, baño de hielo salmuera, termómetro interno, y una atmósfera de nitrógeno. El matraz se cargó con hidrócloruro de éster isopropílico de L-alanina (82,0 g, 0,490 moles) y diclorometano anhidro (0,80L). Mientras se agitaba, se añadió diclorofosfato de fenilo (85,0 g, 0,40 moles) en un lote y se agitó. Mientras se mantenía la temperatura interna entre -5 y 5°C, se añadió una solución de N-metilimidazol (NMI, 250 g, 3,07 moles) en diclorometano (250 mL) durante un período de media hora. Se dejó agitar la solución durante 1 h en este intervalo de temperatura. Se añadió 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (**3**, 80,0 g, 0,307 moles) a 0°C en una porción y luego se dejó que el matraz de reacción se calentara lentamente en la salmuera. baño. A 1 h, la temperatura interna fue de hasta -2°C. La TLC (metanol al 5% en DCM) a 1 h mostró que se consumió más del 50% de nucleósido. Se retiró el baño y el matraz de reacción alcanzó la temperatura ambiente durante 1 hora más. La TLC después de 3 h y a las 5 h en total mostró que se consumió el 95% del nucleósido de partida. La mezcla de reacción se inactivó añadiendo metanol (100 mL) y agitando la reacción durante 5 minutos.

[0192] La mezcla de reacción se lavó con IN HCl (2 X 500 mL) seguido de una solución de bicarbonato de sodio saturado (2 X 500 ml). 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 dar el producto crudo como un aceite viscoso (170 g). Se tomaron las RMN del producto crudo (³¹P y ¹H). El ³¹P-RMN indicó aproximadamente 1% de la integración total de fósforo era debido a la presencia del isómero **3' 5**.

[0193] Al producto bruto se le añadió piridina anhidra (1700 ml). El disolvente se evaporó a presión reducida y luego a alto vacío con el fin de reducir el contenido de agua de la mezcla bruta mediante co-evaporación. El aceite resultante se volvió a disolver en piridina anhidra (500 mL) y luego se añadió cloruro de t-butildimetilsililo en exceso (9,0 g, 60 mM). La reacción se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante UPLC/MS. Después de 3 horas, la impureza **3' 5** ya no pudo detectarse y la reacción se inactivó mediante la adición de metanol (50 ml).

[0194] La reacción se evaporó bajo presión reducida hasta un aceite. El residuo se disolvió en acetato de etilo (1,5 L) y se lavó con IN HCL (2 x 500 ml), seguido de una solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 500 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro (50 g), se filtró y se evaporó a presión reducida para dar el producto crudo como un aceite amarillo pálido.

[0195] El aceite bruto se diluyó con el mismo volumen de diclorometano y se cargó en un 2,5 Kg de gel de sílice en un cartucho en un módulo radial de compresión a 100 psi de presión de aire. Usando una bomba de gradiente a 60 psi y un caudal de 400 ml/min, el cartucho se lavó con cloruro de metileno (4 L) seguido de un gradiente de metanol al 1-4% en cloruro de metileno (48L). La mayoría de las impurezas principales (di-(isopropilalanil)fenilfosfato, 3',5'-bisfosforamidato (**6**), aducto 3'-fosforamidato-5'-TBDMS (**7**)) eluyeron con un gradiente de ~ 3%. El producto deseado eluyó entre un 3 y un 4% de metanol. El producto que contenía las fracciones se clasificó en dos lotes. El primero contenía pequeñas cantidades de impurezas superiores y el último era un producto puro. El primer conjunto de fracciones contenía pequeñas cantidades de impurezas menos polares (impurezas superiores) tales como el 3',5'-bis fosforamidato y el di-alanilfenilfosfato y principalmente el diastereoisómero *R_P* y requirió una segunda purificación en columna. (La terminología relativa, superior frente a inferior se refiere a la elución en cromatografía de gel de sílice en fase normal, donde el "isómero superior" significa el primer isómero que eluye). El segundo conjunto de fracciones no tenía una cantidad significativa de impurezas, solo el resto de *R_P* y principalmente los diastereoisómeros *S_P*. Posteriormente se recombinó con las fracciones de dos columnas. El disolvente se evaporó a presión reducida y la espuma blanca resultante se secó adicionalmente (0,20 mmHg) durante 1 h para dar 42 g del lote impuro (isómero superior frente a inferior 4:1 basado en ³¹P-RMN) y 38 g del lote impuro puro (isómero superior vs inferior 1:3). El lote impuro se recuperó de manera similar para dar 3,8 g de isómero superior puro al 97% (fracción apartada) y 36 g de producto puro en una proporción de 4:1. Los dos lotes 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 **4** puro con una relación diastereoisomérica de 48:51, como una espuma blanca, pf aproximadamente 75-85°C.

[0196] Con el fin de producir un sólido amorfo de la mezcla diastereomérica, 74 g de la espuma blanca se agitó en con éter t-butil metílico (750 mL) dando como resultado una solución parcial y un residuo sólido gomoso. Mientras se agitaba, se añadieron lentamente heptanos (750 mL) y la suspensión se agitó mecánicamente durante 1 hora hasta que la mayor parte de la goma se convirtió en un sólido blanco. El sólido se raspó con una espátula y la suspensión resultante se filtró. El sólido se lavó con heptanos (4 x 50 mL) y se secó al vacío (50°C, 0,2 mmHg, 24 h) para dar un polvo blanco amorfo (64 g) con un amplio intervalo de fusión de aproximadamente 70-80°C. ¹H y ³¹P RMN se conformaron a la estructura y HPLC mostró una pureza del 99,8% con una relación diastereomérica de 46:54 (también confirmada por ³¹P RMN).

[0197] Método alternativo para hacer mezcla sólida de **4**. Después de la cromatografía, el residuo se co-evaporó con diclorometano dos veces (5 ml/g) y se secó durante 24 h a 35-40°C a 35-45 mTorr. El residuo de espuma se tamizó a través de un tamiz de 250 micrómetros y se secó adicionalmente en las mismas condiciones hasta que el diclorometano residual cayó por debajo de 400 ppm medido por GC del espacio de cabeza. El polvo amorfo fino de color blanquecino a blanco resultante tiene un intervalo de temperatura de transición vítrea de 53,7 a 63,5°C.

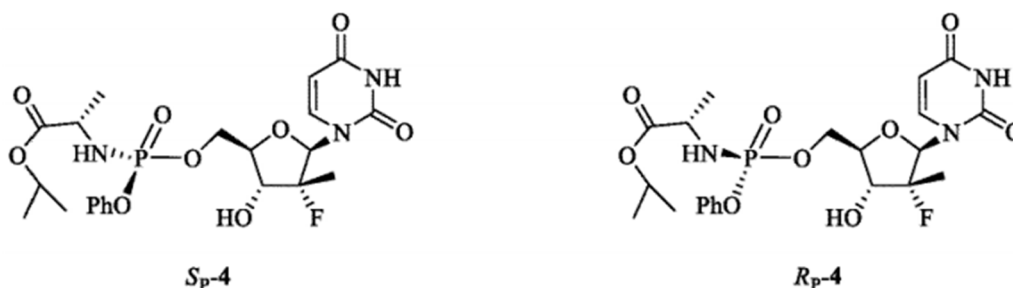
[0198] Caracterización de la mezcla de isómeros (**4**): ¹H-RMN (CDCl₃) δ 10,05 (s ancho, 1H, NH, S_P), 10,00 (s ancho, 1H, NH, R_P), 7,49 (d, 1H, C₆-H, S_P), 7,36 (m, 5H, C₆-H, R_P, aromático), 7,23-7,14 (m, 6H, R_P/S_P, aromático), 6,18 (br d, 2H, C1'-H, R_P/S_P), 5,63 (d, 1H, C5'-H, S_P), 5,58 (d, 1H, C5'-H, R_P), 5,01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂, R_P/S_P), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, R_P/S_P), 4,12 (m, 2H, 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, todos CH₃, R_P/S_P).

[0199] ³¹P-RMN (CDCl₃) δ 3,60 (R_P), 3,20 S_P en relación con trifenilfosfato en - 17,80 ppm. ES -MS M+1 530,2. Análisis elemental: % calculado (que incluye 0,29% de agua según lo encontrado por el 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 sobre la separación de isómeros

[0200] El compuesto **4** debido a la quiralidad en el fósforo está compuesto por dos diastereómeros, que se designan como S_P-**4** y R_P-**4**. La asignación estereoquímica se realizó sobre la base de análisis de rayos X de cristal único de S_P-**4**. Tanto R_P-**4** como S_P-**4** dieron un producto cristalino.

[0201] Los métodos para la cristalización se describen a continuación.



[0202] **Ejemplo de Referencia 3.** Cristalización del isómero R_P-**4**. La fracción cromatografiada de que contiene la primera elución, isómero menos polar R_P-**4** (3,8 g, 97% de pureza) se disolvió en isopropanol (36 g) y se diluyó con heptanos hasta turbio (72 g). La solución se sembró y se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El sólido resultante se recogió mediante filtración al vacío, se lavó con heptanos (2 x 20 mL) y se secó (50°C, 0,2 mm, 24 h) hasta 2,3 g de agujas blancas muy pequeñas, pf 136,2-137,8°C. Se encontró que la pureza por HPLC del material resultante era del 99,02%.

[0203] R_P-**4**: ¹H-RMN (CDCl₃) δ 9,10 (s ancho, 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, todos CH₃).

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

[0204] Método 1: precipitación directa de **4** crudo: A una solución agitada de L-alanina isopropil éster clorhidrato (10,5 g, 61,5mmol, azeotrópicamente secado, dos veces, con 50 ml de tolueno cada vez) en diclorometano (100 mL) se añadió fenidiclorofosfato (7,5 ml, 50 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -10°C y luego se añadió una solución de NMI (30,5 ml, 384,3 mmol) en 30 ml de diclorometano durante un período de 30 min. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó entre -10 y -15°C durante 1 hora. A la mezcla anterior se le añadió 2'-desoxi-

2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**) (10 g, 38,4 mmol) en un lote y la mezcla se agitó por debajo de -10°C durante 3 horas y luego se dejó lentamente calentar a 20°C (6h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante la noche (15 h) y luego se inactivó con 10 ml de metanol. El disolvente se evaporó y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (200 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua (100 ml), en HCl (3x75 ml), 2% de solución acuosa de NaHCO₃ (50 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 dar una espuma blanca (22 g).

[0205] La espuma anterior se disolvió en 33 ml de DCM y después se añadió 65 ml de IPE (éter isopropílico) para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de una pequeña almohadilla de Celite y el filtrado se agitó con semillas de **S_P-4** durante 72 h a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C –tenga en cuenta que enfriar la suspensión a 0°C condujo a engrasar el producto crudo). El sólido blanco se filtró, se lavó con IPE (20 mL) y se secó para dar 4,58 g (λ sim 85:15 mezcla de **S_P-4**: **R_P-4** respectivamente según se determina por ³¹P RMN) de un polvo blanco. El sólido anterior se suspendió en 23 ml de DCM y luego se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió a 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 dar **S_P-4** puro, pf 93,9-104,7°C, pureza por HPLC 99,74% (3,11 g, 15,2% de la uridina nucleósido).

[0206] **S_P-4** ¹H-RMN (CDCl₃) δ 8,63 (s ancho, 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'-H 2), 4,11 (d, 1H, C₃'-H), 3,97 (m, 3H, C₃'-OH, C₄'-H, ala-CH-CH₃), 3,77 (s ancho, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C₂'-CH₃), 1,37 (d, 3H, ala-CH₃), 1,24 (d, 6H, CH-(CH₃)₂).

[0207] Método 2: Aceitación hacia fuera de **4** crudo: A una solución agitada de L-alanina isopropil éster clorhidrato (20,6 g, 123mmol, azeotrópicamente secado, dos veces, con 75 ml de tolueno cada vez) en diclorometano (200 mL) se añadió fenidiclorofosfato (14,9 ml, 100 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -10°C y luego se añadió una solución de NMI (61,3 ml, 769 mmol) en 60 ml de diclorometano durante un periodo de 30 min. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó entre -10°C y -15°C durante 1 h. A la mezcla anterior se le añadió 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**) (20 g, 76,9 mmol) en un lote y la mezcla se agitó por debajo de -10°C durante 3 horas y luego se dejó lentamente calentar a 20°C (6h). La mezcla se agitó a esta temperatura durante la noche (15 h) y luego se inactivó con 10 ml de metanol. El disolvente se evaporó y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (400 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua (200 ml), en HCl (3x100 ml), 2% de solución acuosa de NaHCO₃ (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 dar una espuma blanca (43 g). La espuma anterior se disolvió en 86 ml de EtOAc en un matraz de fondo redondo de dos bocas equipado con un agitador mecánico. Mientras se agitaba, se añadieron lentamente 100 ml de heptano y la suspensión se agitó durante 1 hora. La capa superior se decantó y el residuo se agitó de nuevo con 50 ml de soluciones 2: 3 de EtOAc/heptano durante 10 min y luego se decantó. El residuo se secó a alto vacío para dar una espuma blanca (31 g).

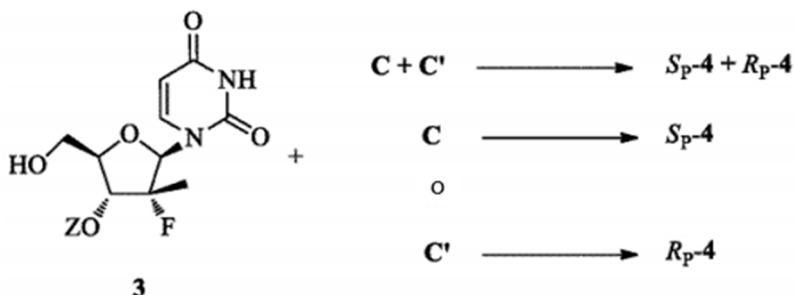
[0208] La espuma anterior se disolvió en 46 ml de DCM y después se añadió 95 ml de IPE para dar una solución saturada. La solución se filtró a través de un lecho pequeño de Celite y el filtrado se agitó con semillas de **S_P-4** durante 72 h a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró, se lavó con IPE (30 mL) y se secó para dar 7,33 g (~85:15 mezcla de **S_P-4**: **R_P-4** respectivamente según se determina por ³¹P RMN) de polvo blanco. El sólido anterior se suspendió en 36 ml de DCM y luego se calentó a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfrió a 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 dar >99% de pureza **S_P-4**, (4,78 g, 11,6% del nucleósido de uridina).

[0209] Método 3: La carga de gel de sílice de **4** crudo: 5,0 g de **4** fue producido en la misma manera que la mezcla de diastereómeros justo antes del Paso de cromatografía de columna a partir de aproximadamente 2,5 g de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (**3**). El crudo se disolvió en 10 ml de DCM y se añadieron a la solución 10 g de gel de sílice. El disolvente se evaporó para dar una suspensión seca. La suspensión se agitó con 40 ml de EtOAc al 50%/hexanos durante 15 min y luego se filtró. El gel de sílice se lavó con 10 ml adicionales de EtOAc al 50%/hexanos. Después, el gel de sílice se lavó con MeOH al 15%/DCM (100 mL) y se recogió por separado. El disolvente se evaporó y se secó a alto vacío para dar 4,0 g de residuo (espuma). El residuo se disolvió en DCM (6 mL) y luego se añadió ~ 9 ml de IPE para preparar una solución saturada. Después, la mezcla se agitó suavemente durante la noche con semillas de **S_P-4** a temperatura ambiente. El sólido blanco se filtró y se lavó con IPE (5 mL) para dar 1,28 g de producto. ³¹P RMN reveló que el producto anterior contiene una mezcla 77:23 de **S_P-4**: **R_P-4** respectivamente. Este se recrystalizó en 20 ml de DCM para obtener 0,75 g de **S_P-4** puro >99% (aproximadamente el 12% del nucleósido de uridina). Esta preparación de **S_P-4** no requiere el paso de siliación como se hizo para la mezcla, por lo que el método de reacción completo se muestra arriba. Los aspectos de las formas monocristalinas y polimórficas de **S_P-4** se presentan a continuación.

[0210] Método 4: 40,0 g de mezcla 1:1 de **4** se disolvió en 90 ml de diclorometano. Se añadió diisopropiléter (70 mL) a la solución anterior para dar una solución saturada. (La cantidad de éter diisopropílico puede variar según 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 (la formación de sólido se observó después de 2 h). El sólido se filtró, se lavó con 40 ml de la mezcla de diisopropiléter/diclorometano (1:1) y se secó para dar un sólido blanco (16,6 g,

89,35% de **S_P-4** puro por RMN). Este sólido se suspendió en 83 ml de diclorometano y se calentó a reflujo durante 3 h. La suspensión se enfrió a 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 dar **S_P-4** (13,1 g, 99,48% de pureza por HPLC). Se redisolvió 11 g de este sólido en 330 ml de DCM en condiciones de calor. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se dejó a esta temperatura durante la noche. El producto cristalino se filtró y se secó para dar 10,5 g de **S_P-4** (99,74% por HPLC).

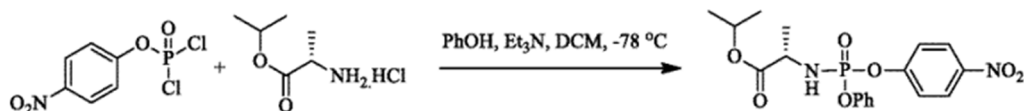
[0211] Los compuestos **S_P-4** y **R_P-4** pueden prepararse alternativamente haciendo reaccionar el nucleósido (protegido o desprotegido) **3** con un isopropil-alanilfosforamidato (mezcla de **C** y **C'**, **C** o **C'**), como se muestra en la siguiente ecuación.



[0212] P.D. Howes et al. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2003, vol. 22, N^{os} 5-8, págs. 687-689 ("Howes") describe 2'-y 5'-fosforamidatos obtenidos por reacción con cloruro de t-butilmagnesio. Allí, 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, se produjo la fosforilación selectiva en la posición 2', pero con un equivalente adicional de cloruro de t-butilmagnesio se produjo la fosforilación selectiva en la posición 5'. Esta divulgación debe contrastarse con la divulgada en el Esquema 1 de Howes.

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

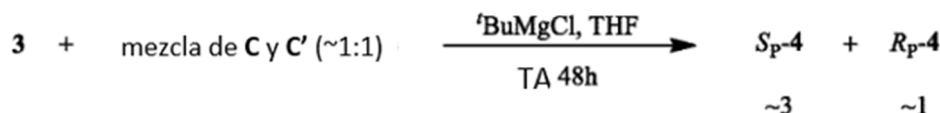
[0213]



[0214] A una solución agitada de 12,8 g de fosforodichloridato de 4-nitrofenilo, 50 mmol) en diclorometano (100 mL) se añadió una solución de fenol y trietilamina (7,7 mL, 55 mmol) en diclorometano (100 mL) a $-78^\circ C$ 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 hidrócloruro de éster isopropílico de L-alanina (8,38 g, 50 mmol) en diclorometano (100 mL) a $0^\circ C$. A la mezcla se le añadió una segunda porción de trietilamina (14,6 ml, 105 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a $0^\circ C$ durante 1 hora y luego se evaporó el disolvente. El residuo se trituró con acetato de etilo (150 mL) y el sólido blanco se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido. El compuesto bruto se cromatografió usando un gradiente de acetato de etilo/hexanos del 0 al 20% para dar el producto (17 g, rendimiento del 83%) como una mezcla de diastereómeros en una proporción de aproximadamente 1:1. ^{31}P RMN (162 MHz, $DMSO-d_6$): δ -0,31, -0,47; 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8,31-8,27 (m, 2H), 7,51-7,37 (m, 4H), 7,27 a 7,19 (m, 3H), 6,70-6,63 (m, 1H), 4,85-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,21-1,19 (m, 3H), 1,11-1,09 (m, 6H); EM (IEN) m/z 407 ($M-1$)⁺. ^{31}P RMN (162 MHz, $CDCl_3$): δ -2,05, -2,10; 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,22 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26 a 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, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,22 (dd, $J = 6,2$ y $3,0$ Hz, 6H); EM (IEN) m/z 407 ($M-1$)⁺.

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

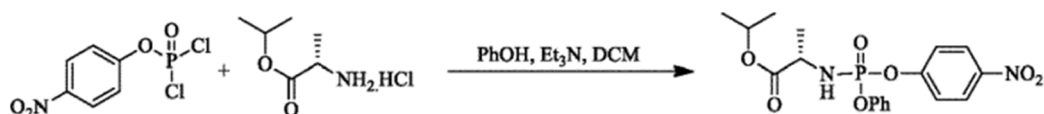
[0215]



[0216] A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (130 mg, 0,5 mmol) en THF seco (1,5 mL) se añadió a 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. Después de 30 min, una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (1:1 se añadió gota a gota una mezcla de isómeros, 408 mg, 1 mmol) en THF (1,5 mL) durante un período de 5 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 48 horas y luego se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (20 ml). La mezcla se repartió 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 dar un residuo de color amarillo pálido. La cromatografía en columna del residuo usando un gradiente de MeOH al 0-2%/diclorometano dio un sólido espumoso blanco (125 mg, rendimiento del 47%, mezcla de **Sp-4/Rp-4** en una relación de aproximadamente 3,05:1,0).

Ejemplo de Referencia 6. Preparación y aislamiento no cromatográfico de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico

[0217]



[0218] Clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (330 g, 1,97 mol) se secó previamente mediante coevaporación con tolueno (2 X 400 mL) a presión reducida y luego se secó en un horno de vacío (50°C, 0,2 mmHg, 17h). A una solución agitada de fosforodichloridato de 4-nitrofenilo (500,0 g, 1,953 mol) en diclorometano anhidro (3,0 L) se le añadió 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 min más y luego se dejó calentar hasta -5°C durante 2,5 horas. El éster de aminoácido presecado se añadió a -5~0°C en una atmósfera de nitrógeno durante 10 minutos. El residuo de la sal de aminoéster en el matraz de adición se transfirió a la mezcla de reacción mediante enjuague con diclorometano (2 x 100 ml). La mezcla se agitó a 0°C durante 40 minutos y se añadió una segunda porción de trietilamina (571 ml, 4,10 mol) durante un período de 40 minutos a 0°C. La mezcla se agitó a 0 ~ 10°C durante 3 h y después el sólido de color blanco (trietilamina clorhidrato) se separó por filtración y se aclaró con diclorometano (3 X 300 ml). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se trituró con metil t-butil éter (MTBE, 4L). La sal sólida adicional así formada se separó por filtración y se enjuagó con MTBE (3 X 150 ml). El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color marrón claro transparente. El residuo se co-evaporó con hexanos (2 X 140 mL) para eliminar cualquier 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 añadió a la solución una pequeña cantidad de semillas de cristal del isómero **Sp**-deseado del producto y la mezcla se agitó a 5°C durante más de 22 h para formar una suspensión espesa media. Se dejó reposar en un congelador (-10°C) durante 44 h. El producto precipitado se recogió mediante filtración y se enjuagó con disolventes mixtos preenfriados de IPE y hexanos (1:1, 3 X 190 ml). El sólido se secó al vacío (0,5 mm Hg) a temperatura ambiente hasta que se obtuvo un peso constante para dar 227,23 g (rendimiento: 28,5%) como un polvo sólido de color blanco. La relación de dos diastereómeros **Sp:Rp** fue 9,65/1 basado en ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-d₆, δ -0,31 (S P), -0,47). El producto se recrystalizó disolviéndolo en IPE (840 mL) mientras se calentaba en un baño a 60°C. La solución anterior se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadió una pequeña cantidad de semillas de isómero **Sp** cristalino. Se formó un polvo blanco sólido en 2 horas y el matraz se almacenó en un congelador (-10°C) durante 16 horas. Se filtró un sólido cristalino blanco y fino obtenido, se lavó con IPE preenfriado (3 x 50 mL) y se secó al vacío (ambiente, 0,5 mm Hg) hasta un peso constante para dar un sólido blanco esponjoso (177,7 g, 22% de rendimiento total o 44% rendimiento global basado en el rendimiento teórico del isómero **Sp**) con una relación diastereomérica de 48/1 basada en P-RMN. Mp 62-66°C.

[0218] ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0,31; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,41-7,37 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, J = 13,6, 10,0 Hz, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,10 (d, J = 6,4 Hz, 6 H);

[0219] ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -2,05; (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0,31; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,22 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26 hasta 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 Hz, 3H), 1,22 (dd, J = 6,2 y 3,0 Hz, 6H); ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,41-7,37 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, J = 13,6, 10,0 Hz, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,10 (d, J = 6,4 Hz, 6 H)

[0220] EM (IEN) m/z 407 (M-1)⁺.

[0221] La estereoquímica de **8** (isómero **Sp**) ha sido confirmado por cristalografía de rayos X de cristal único, ver los detalles proporcionados a continuación.

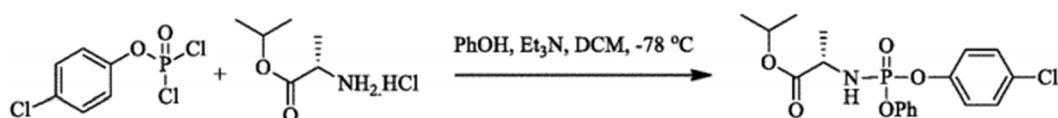
Ejemplo de Referencia 7. Separación de la mezcla diastereomérica de éster isopropílico de ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico por SFC

[0222] Una muestra de la mezcla de diastereómeros (4,8 g) enriquecida 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 utilizó 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-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico] eluyó primero. Las fracciones apropiadas de las múltiples pruebas se combinaron y concentraron a presión reducida para dar 2,9 g del isómero *R_P* éster isopropílico del ácido [(S)-2-[(R)-(4-nitrofenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico] como un aceite viscoso de color amarillo claro y 1,9 g del isómero *S_P* de 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 a los del producto aislado por el método de cristalización anterior.

[0223] Los datos analíticos para éster isopropílico del ácido (S)-2-[(R)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (8, isómero *R_P*): ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,47; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,46-7,38 (m, 4H), 7,27-7,20 (m, 3H), 6,68 (dd, *J* = 13,8, 10,2 Hz, 1H), 4,86-4,77 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,20 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,10 (dd, *J* = 6,2, 2,2 Hz, 6H); **EM (IEN)** *m/z* 407 (M-1)⁺.

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

[0224]



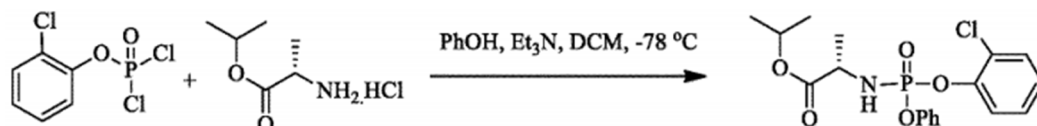
[0225] A una solución agitada de 4-cloro-fenilfosforodichloridato (2,45 g, 10,0 mmol) en diclorometano (20 mL) se añadió una solución de fenol (0,94 g, 10 mmol) y trietilamina (1,56 mL, 11 mmol) en diclorometano (20 mL) a -78°C durante un período de 20 min. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min y luego se transfirió a otro matraz de fondo redondo que contenía hidrocloreuro de éster isopropílico de L-alanina (1,67 g, 10 mmol) en diclorometano (50 mL) a 0°C. A la mezcla se le añadió un segundo lote de trietilamina (2,92 mL, 21 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1 hora y luego se evaporó el disolvente. El residuo se trituró con acetato de etilo (30 mL) y el sólido blanco se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido. El compuesto bruto se cromatografió usando un gradiente de acetato de etilo al 10-20%/hexanos para dar el producto (2,0 g, rendimiento del 50%) como una mezcla de diastereómeros en una proporción de aproximadamente 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -1,58, -1,62; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,06-7,51 (m, 8H), 7,15-7,28 (m, 2H), 7,29-7,47 (m, 2H), 4,0-4,10 (m, 1H), 3,82-3,88 (m, 3H), 1,35-1,36 (dd, 6H); 1,19-1,22 (m, 3H). **EM (IEN)** *m/z* 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purifica mediante extracción, cristalización o cromatografía, como se indicó anteriormente.

Ejemplo de Referencia 8-2. Preparación de (S)-isopropil 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 (4).

[0226] 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 añadió 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 minutos. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (2-[(4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico (4,08 g, 10 mmol) en THF (15 mL) durante un período de 10 min. Se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 72. La co-mancha de TLC con producto auténtico mostró que se había formado alrededor del 5% del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

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

[0227]



[0228] A una solución agitada de 2-cloro-fenilfosforodichloridato (9,8 g, 40 mmol) en diclorometano (80 mL) se añadió

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 hidrocloreto de éster isopropílico de L-alanina (6,7 g, 40 mmol) en diclorometano (150 mL) a 0°C. A la mezcla se le añadió 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 hora y luego se evaporó el disolvente. El residuo se trituró con acetato de etilo (100 mL) y el sólido blanco se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido. El compuesto bruto se cromatografió usando un gradiente de acetato de etilo/hexanos del 10-20% para dar el producto (11,3 g, rendimiento del 72%) como una mezcla de diastereómeros en una proporción de aproximadamente 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -1,58, -1,61; ¹H

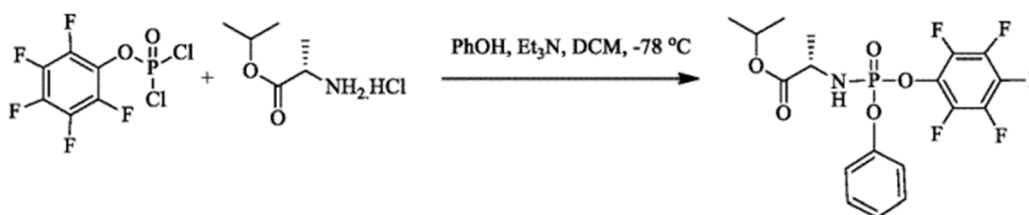
[0229] RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,06-7,51 (m, 8H), 5,02-5,94 (m, 1H), 4,10-4,16 (m, 1H), 3,31-3,94 (m, 1H), 1,18-1,35 (m, 3H), 1,38-1,40 (dd, 6H); EM (IEN) *m/z* 398 (M-1)⁺. El producto resultante se purifica mediante extracción, cristalización o cromatografía, como se indicó anteriormente.

Ejemplo de Referencia 9-2. Preparación de (S)-isopropil 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.

[0230] 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 añadió 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 minutos. Después de 30 min, se añadió gota a gota una solución de éster isopropílico del ácido (2-[(2-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (4,08 g racémico, 10 mmol) en THF (15 mL) durante un período de 10 min. Se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 72 h. La mancha conjunta de TLC con producto auténtico mostró que se había formado alrededor del 5-10% del producto deseado en comparación con el nucleósido de partida.

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

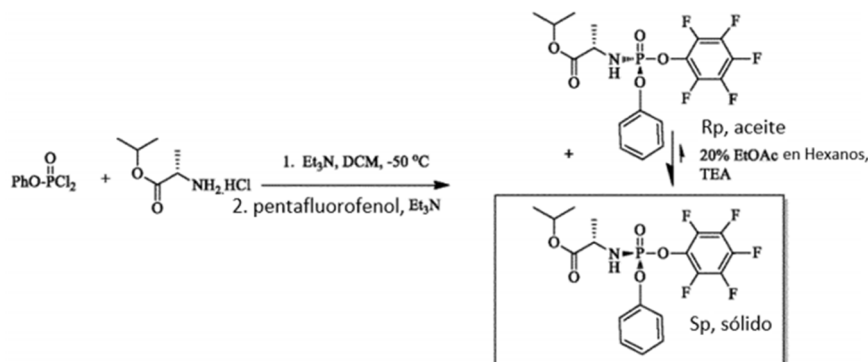
[0231]



[0232] A una solución agitada de fosforodichloridato de pentafluorofenilo (6,0 g, 20 mmol) en diclorometano (40 mL) se añadió 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 contiene hidrocloreto de éster isopropílico de L-alanina (3,35 g, 20 mmol) en diclorometano (100 mL) a 0°C. Se añadió un segundo lote de trietilamina (5,84 ml, 42 mmol) durante un período de 15 min. La mezcla se agitó a 0°C durante 1 hora y luego se evaporó el disolvente. El residuo se trituró con acetato de etilo (60 mL) y el sólido blanco se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido como una mezcla de diastereoisómeros en una proporción de aproximadamente 1:1. ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃): δ -0,49, - 0,58. El producto resultante se purifica mediante extracción, cristalización o cromatografía, como se indicó anteriormente.

Ejemplo de Referencia 10-2. Preparación de la mezcla diastereomérica de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico y aislamiento de un solo diastereoisómero de 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 cultivos.

[0233]



[0234] Para un matraz de fondo redondo de 2 L de tres bocas equipado con un agitador mecánico y termómetro de baja temperatura se añadieron 60 g (284 mmol) de diclorofosfato de fenilo y 300 ml de diclorometano anhidro. La solución se enfrió a 0°C en atmósfera de nitrógeno y sal de hidrocloreuro de isopropilalanato (secada en horno a vacío, 47,7 g, 284 mmol) se añadió rápidamente como un sólido. La mezcla se agitó y se enfrió a -55°C en un baño de hielo seco y acetona. Se añadió 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 turbia blanca se agitó a -55°C durante media hora y luego la temperatura se elevó a -5°C lentamente durante 1,5 h. Se añadió a la mezcla una mezcla preenfriada (temperatura ambiente) de pentafluorofenol (52,42 g, 284 mmol) y trietilamina (32,11 g, 317 mmol) en 180 ml de diclorometano mediante un embudo de adición durante 1 h a 0°C y el la mezcla resultante se agitó a 0°C durante 4 horas. El precipitado blanco ($\text{TEA} \cdot \text{HCl}$) se filtró y se aclaró con diclorometano (3 x 50 ml). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo sólido blanco se trituró en 880 ml de éter *t*-butil metílico (TBME) a temperatura ambiente durante una hora. Se filtró la suspensión blanca y se enjuagó el sólido con TBME (3 x 150 ml). 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 (3 x 100 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró para proporcionar 29,92 g (66 mmol) de producto (isómero Sp , según lo confirmado por cristalografía de rayos X, *infra*) como un sólido de pluma blanca.

[0235] El filtrado desde trituración TBME se concentró a presión reducida hasta un residuo sólido de color 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. El sólido (sólido 1) se recogió por filtración y se enjuagó con acetato de etilo al 20% en hexanos (75 ml, 2 x 30 ml). Las aguas madres se concentraron para producir un sólido blanquecino 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) mediante filtración y se enjuagó con acetato de etilo al 20% en hexanos (2 x 10 ml). 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 (3 x 150 ml), 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 102,72 g (226 mmol, 80%). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : h 7,38-7,33 (m, 2H), 7,27-7,24 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 1H), 5,04 (hept, 1H), 4,18-4,09 (m, 1H), 4,01-3,96 (m, 1H), 1,45 (d, 3H), 1,25 (dd, 6H). ^{31}P RMN (CDCl_3 , 162 MHz) δ : $\square$ -0,50.

Ejemplo de Referencia 10-3: Preparación de mezcla diastereoisomérica de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxifosforilamino]propiónico y aislamiento de un único diastereoisómero de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico mediante resolución dinámica inducida por cristalización en un solo cultivo.

[0236] Para un matraz de tres bocas de 1 L seco equipado con un termómetro de baja temperatura y un agitador mecánico se fosforodichloridato fenil cargado (25 g, 118,5 mmol). Se añadió diclorometano anhidro (125 mL) y la solución se enfrió a 0°C . La sal de éster de alanina (secada en horno) (19,86 g, 1 eq.) se añadió rápidamente bajo N_2 mientras se agitaba. La solución se enfrió a ca -50°C (temperatura interna (en un baño de acetona/hielo seco bajo N_2)). Una solución de trietilamina (25,2 g, 2,1 eq) en DCM (125 mL) se añadió gota a gota a través de un embudo de adición durante 0,5 h a -50°C y la suspensión blanca resultante se agitó a aproximadamente -50°C durante 0,5 h. La mezcla se dejó calentar hasta 0°C durante 1,5 h y luego se añadió una solución premezclada enfriada de pentafluorofenol (21,82 g, 1 eq) y TEA (13,2 g, 1,1 eq) (precaución: se libera calor al mezclar pentafluorofenol y TEA) en 75 ml de DCM durante 0,5 h a 0°C a través de un embudo de adición. La mezcla se agitó a 0°C durante 4 h más.

[0237] La mezcla se filtró a través de un embudo Buchner y el clorhidrato de trietilamina sólido recogido se enjuagó con DCM (3 X 40 mL). El filtrado se comprobó mediante ^{31}P -RMN (relación ca 1,14:1 a favor del diastereómero Sp – pico campo abajo) y se dividió en dos partes de igual peso. Uno de ellos era concentrado bajo 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 Sp menos soluble. La suspensión blanca se filtró y el sólido se enjuagó con EtOAc al 20% en hexanos (2 x 25 ml). El sólido (22,58 g) se comprobó mediante ^1H -RMN y ^{31}P -RMN y contenía producto como un isómero contaminado con sal de clorhidrato de trietilamina. El sólido se disolvió y se repartió en 310 ml de EtOAc y 100 ml de agua. Después de la separación de la capa orgánica, la capa acuosa se

volvió a extraer con EtOAc (50 ml). La capa orgánica combinada se lavó con agua (3 x 80 ml), salmuera (50 mL) y se secó sobre MgSO₄. 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 es del 64%. El licor madre anterior se concentró hasta un residuo gomoso (7,89 g) que contenía los reactivos con una relación de 1:1,2 (deseada/no deseada) basada en ³¹P-RMN.

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

[0238] Se cargó DCM (11,5 L) en el reactor de vidrio limpio y seco. Se cargó fenildiclorofosfato (2,3 kg, 10,9 mol) en el reactor bajo nitrógeno. Después, la solución se enfrió a 0°C. A continuación, se añadió hidrocloreto 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 a una temperatura interna de -50°C usando un baño de hielo seco/acetona. Se añadió lentamente una mezcla de TEA (2,1 eq, 3,17 L) en DCM (11,5 L) a la solución de reacción anterior durante un período de 8 h para mantener la temperatura interna entre -40 y -50°C. Una vez completada la adición, la reacción se mantuvo al mismo intervalo de temperatura durante aproximadamente 1 hora. Se dejó que la mezcla se calentara a 0°C durante aproximadamente 4 h.

[0239] Mientras tanto, en otro reactor, DCM (6,9 L) se cargó, y después se añadió pentafluorofenol (2,0 Kg, 10,9 moles) en atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a 0°C, luego se añadió TEA (1,1 eq, 1,65 L) a la solución de pentafluorofenol (exotérmica) durante un período de aproximadamente 2 h. La solución resultante, a su vez, se añadió 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 aproximadamente 7 h. Una vez completada la adición, se continuó agitando a ese intervalo de temperatura durante aproximadamente 4 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC. Cuando quedaba menos del 5% de pentafluorofenol, se detuvo la reacción. Tenga en cuenta que la HPLC quiral indicó una mezcla uniforme de diastereoisómeros del producto en este punto.

[0240] La suspensión de reacción se filtró a través de un filtro Nutsche para eliminar la mayoría de la sal de hidrocloreto de trietilamina en suspensión. La torta de sal se lavó con una cantidad en exceso de DCM (9 L) y este lavado se añadió al filtrado principal. El filtrado se concentró a presión reducida a 35°C para dar un residuo sólido. El residuo sólido se coevaporó con hexano (4 L) para reducir aún más los niveles de DCM residual. A este sólido residual se le añadió MTBE/Hexano de 6 L al 20% y la suspensión se agitó durante aproximadamente 17 horas a temperatura ambiente y se controló mediante HPLC. El pH de la solución permaneció básico debido al TEA residual. Durante este tiempo, tuvo lugar una resolución dinámica en donde el sólido precipitado fue el isómero S_P-4 deseado y el sobrenadante permaneció en equilibrio entre S_P-4 y R_P-4.

[0241] La suspensión se pasó a través de un filtro Nutsche y el producto sólido deseado, todavía contaminado con clorhidrato de TEA, se lavó con 5% de MTBE/hexano (1L). El sólido se disolvió en acetato de etilo (35 L) y la solución se lavó con agua (3 X 35 L) y salmuera (10 L) y luego la solución se secó sobre sulfato de sodio sólido, se filtró y se concentró a presión reducida manteniendo la temperatura del reactor por debajo de 44°C. El residuo sólido se coevaporó con hexano (4L). El reactor se llevó a temperatura ambiente y se añadió MTBE al 5%/hexano (5L). La suspensión espesa se agitó durante 15 min y luego el sólido se recogió por 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 dar el producto final (S_P-4) como un sólido blanco, 2,6 kg (53%); 99,5% puro por HPLC, 0,4% de otros R_P-4.

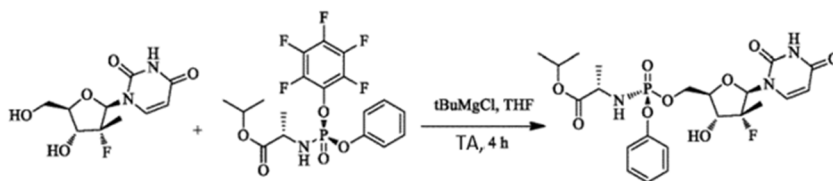
Ejemplo de Referencia 10-5. Preparación de (S)-isopropil 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2 il)metoxi)(fenoxi)-fosforilamino]propanoato.

[0242] 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 añadió 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. Después de 30 min, una solución de éster isopropílico de ácido (2-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico racémico crudo se añadió gota a gota (4,08 g, 10 mmol) en THF (15 mL) durante un período de 10 min. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 72 h. La mancha conjunta de TLC con producto auténtico mostró alrededor del 40-50% del producto deseado se había formado en comparación con el nucleósido de partida.

Ejemplo de Referencia 10-6. Preparación de (S)-isopropil 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 (S_P-4) usando éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico y la purificación por cristalización únicamente

[0243]

5



10

15

20

25

30

35

[0244] A una solución agitada de **3** (10 g, 38,46 mmol, secados al vacío a 50°C durante 20 h) en THF seco (165 ml), se añadió una solución 1,7 M de cloruro de *terc*-butilmagnesio en THF (47,5 mL, 80,77 mmol) durante un período de 20 min mientras se mantiene el matraz en un baño de agua fría (5°C) bajo una atmósfera de nitrógeno. Una vez completada la adición, se retiró el baño frío y la suspensión blanca se agitó a temperatura ambiente (20°C) durante 30 min. A continuación, se preparó 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) añadido 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 la agitación durante 1,5 h más, en cuyo estadio la TLC indicó una conversión >95% y ninguna diferencia significativa en la intensidad de la impureza de 3',5'-*bis*-fosforamido a partir de las 2 h. La mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada. NH₄Cl (10 mL) y luego se evaporó el disolvente a 25°C. El residuo se repartió entre acetato de etilo (400 mL) y una mezcla saturada de cloruro de amonio (60 ml)/agua (20 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con cloruro de amonio saturado (80 mL) y agua (3 x 60 mL). La capa acuosa hasta este punto se mantuvo por separado. La capa orgánica se lavó con solución acuosa carbonato de sodio al 5% (3 X 50 mL) y agua (2 X 60 mL). La primera capa acuosa se extrajo con acetato de etilo adicional (100 mL), se lavó con agua (2 x 20 mL) 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 (2 x 20 mL) y se combinó con el lote principal. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron para dar un sólido espumoso (19,32 g). El residuo se disolvió en 60 ml de diclorometano (precipitó un sólido blanco y se formó una torta en aproximadamente 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 una mezcla 1:1 de IPE frío (0°C)/diclorometano (20 mL) y se secó para dar 11,77 g (rendimiento del 58%) 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 del baño a 45°C) hasta un volumen de ~ 120 ml. Se dejó reposar la solución a temperatura ambiente (21°C) durante 20 h. El sólido cristalino blanco (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 dar un producto puro no solvatado (10,62 g, 52%, rendimiento) como agujas blancas. Pureza por HPLC 99,8%. Las propiedades espectrales coinciden con los valores aquí indicados.

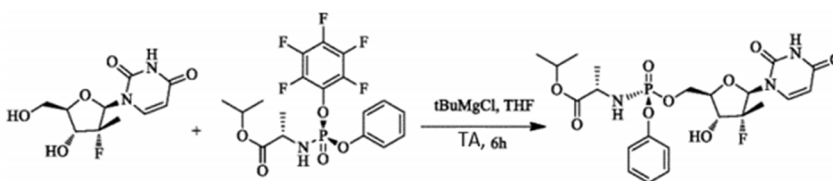
35

Ejemplo de Referencia 10-7. Preparación de (S)-isopropil 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 (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 tratamiento y purificación solo por cristalización.

40

[0245]

45



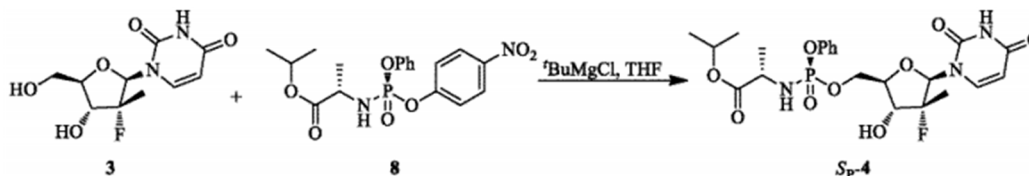
50

[0246] 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 g, 19,1 mmol, secado al vacío a 50°C durante 20 h) en THF seco (75 mL) se añadió 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 a temperatura ambiente (20°C) a cuya temperatura se agitó durante 30 min más. La mezcla de reacción se enfrió a 5°C y luego se añadió 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 a -5°C y luego se inactivó con HCl₂ N (25 ml). Se añadió tolueno (100 mL) a la mezcla y se calentó a temperatura ambiente. Después de 20 min, se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con IN HCL (2 x 10 ml), agua (10 mL), Na₂CO₃ acuoso al 5% (4 x 10 ml), agua (2 x 10 mL) y salmuera (10 ml). Todas las capas acuosas se volvieron a extraer con tolueno (20 ml), se lavaron con Na₂CO₃ acuoso al 5% (2 X 5 ml), agua (10 mL) y salmuera (5 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta un volumen aproximado de 20 ml. Se añadió diclorometano (20 mL) a la solución y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El sólido se filtró, se lavó con una mezcla de MTBE/DCM 1:1 (2 x 10 mL) y se secó a alto vacío para dar un sólido blanco (7,7 g). HPLC del sólido en este indicó 98,21% S_P-4, 0,18% de sin

65

reaccionar 3 y 0,67% de impureza 3',5'-bis-fosforamidato. El sólido anterior de *S_P*-4 se volvió a disolver en diclorometano (77 ml, se calentó 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 dar un producto puro como un sólido blanco (6,9 g, 68% de rendimiento, 99,79% puro por HPLC).

[0247] La preparación y purificación de **C** o **C'** permite el acceso directo a cualquiera de *S_P*-4 o *R_P*-4, como se ilustra en los siguientes ejemplos.



[0248] **Ejemplo de Referencia 11. Preparación de *S_P*-4** (32 mg escala): A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona **3** (32 mg, 0,12 mmol) en THF seco (1 ml) se añadió a una solución 1 M de cloruro de t-butilmagnesio (0,26 ml, 0,26 mmol, 2,1 equiv) a temperatura ambiente durante un período de 3 min. Después de 30 min, se añadió una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico (**8**, isómero *S_P*) en THF (0,5 mL) gota a gota durante un período de 3 minutos. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 42 h y luego se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (10 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo y agua. El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se cromatografió usando gradiente de 0-4% de metanol/diclorometano para dar *S_P*-4 como un sólido espumoso (29 mg, 44,5% de rendimiento). ¹H y ³¹P RMN están de acuerdo a lo que se describe en este documento.

[0249] **Ejemplo de Referencia 12. Preparación de *S_P*-4** (escala de 2,6 g, sin cromatografía): a una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (2,6 g, 10 mmol) en THF seco (50 mL) se añadió 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. Después de 30 min, una solución de (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino]propiónico éster isopropílico del ácido (**8**, isómero *S_P*, 4,08 g, 10 mmol) en THF (15 mL) se añadió gota a gota durante un período de 10 min. Se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 60 h y luego se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (20 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (150 mL) y, secuencialmente, Na₂CO₃ acuoso al 10% (3 x 20 mL) y agua (20 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de color 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 dar un producto puro como un sólido blanco (1,85 g, 35% de rendimiento).

[0250] **Ejemplo de Referencia 13. Preparación de *S_P*-4 usando NaHMDS**: A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (71 mg, 0,27 mmol) en THF seco (2,0 mL) se añadió una solución 2,0 M de bis(trimetilsilil)amida de sodio (NaHMDS) en THF (270 ml, 0,54 mmol) a -78°C durante un período de 2 min. Después de 30 min, 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) se añadió a la mezcla. La mezcla de reacción se dejó agitar a esta temperatura durante 2 h y luego se calentó a -20°C, temperatura a la que se agitó durante 20 h más. La TLC indicó -30% de material de partida de nucleósidos sin reaccionar. Por tanto, se añadieron 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 una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y luego se repartió entre acetato de etilo y agua. El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar un residuo de color marrón claro. La cromatografía en columna del producto crudo usando un gradiente de 0-5% de metanol/diclorometano dio *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).

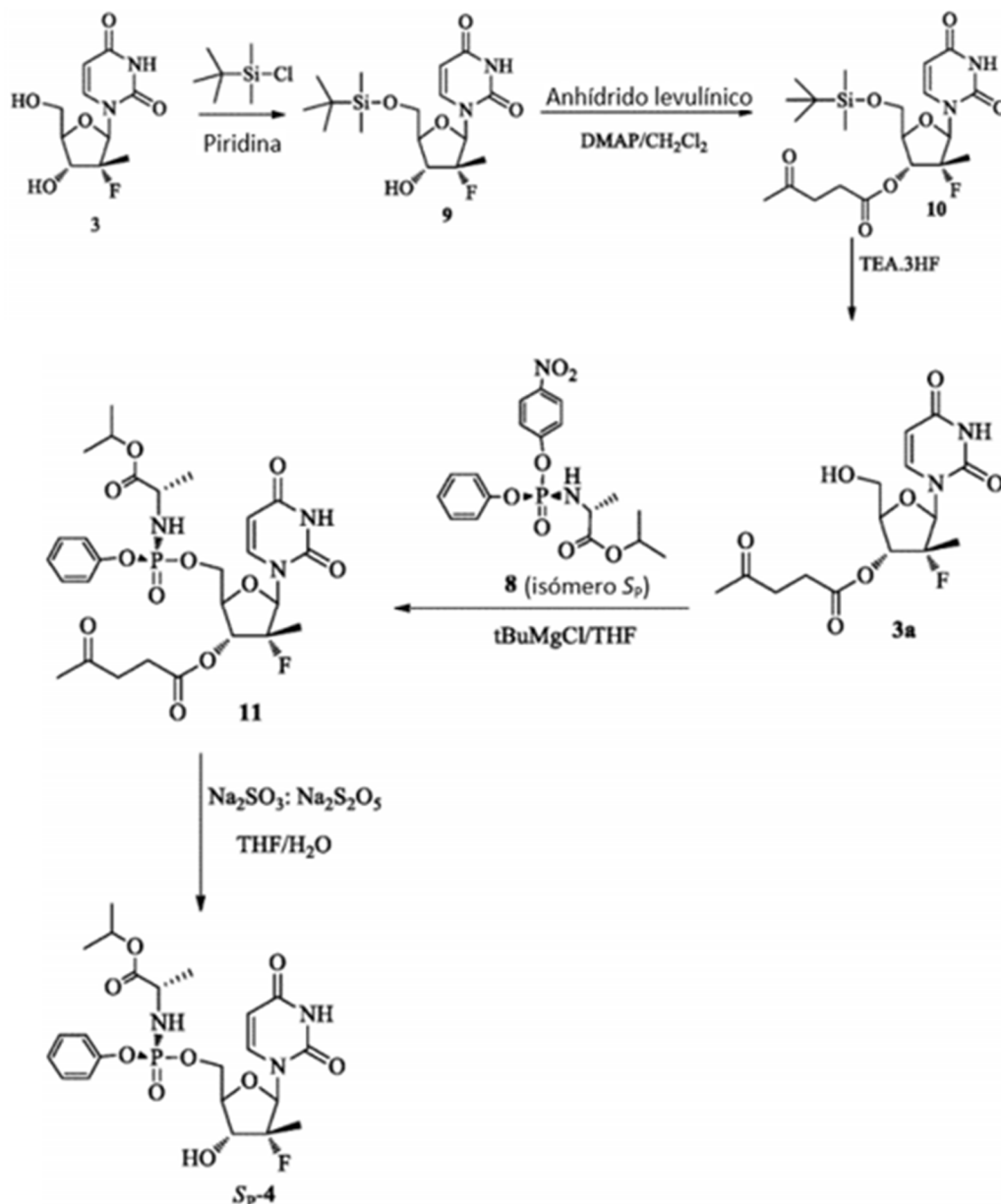
[0251] **Ejemplo de Referencia 14. Preparación de *R_P*-4 (escala de 260 mg)**: A una solución agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona (260 mg, 1 mmol) en THF seco (6 mL) se añadió a una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,23 ml, 2,1 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 5 min. Después de 30 min, se añadió 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 NH₄Cl acuoso saturado (10 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (50 mL) y agua (2 x 20 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de color amarillo pálido (490 mg). El residuo se cromatografió usando un gradiente de 0-5% de metanol/diclorometano para dar el producto como un sólido blanco (160 mg, 30% de rendimiento).

[0252] La preparación de *S_P*-4 o *R_P*-4 también puede conseguirse por reacción de 3 protegido por 3' con el reactivo

apropiado **C** o **C'** o una mezcla que contiene **C** y **C'**, como se ilustra en los siguientes ejemplos.

Ejemplo de Referencia 15. Preparación de **S_P-4** con **3a** como un intermedio sintético

[0253]



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

[0254] A una solución agitada de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-*C*-metiluridina (**3**, 81,1 g, 312 mmol) en piridina seca (750 mL) se añadió gota a gota una solución de TBDMSCl (103,19 g, 685,6 mmol) en piridina seca (500 mL) durante un período de 45 min. a temperatura ambiente. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió metanol (85 mL) a la mezcla de reacción y se dejó agitar durante 10 min y luego los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida. Se añadió agua caliente (45°C) (1 L) a la masa de reacción y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 X 500 mL) y se lavó con agua (1 3 500 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se destiló el acetato de etilo y el residuo obtenido se co-evaporó con tolueno (2 X 500 mL) para dar **9** bruto como una espuma blanca. Rendimiento = 116,9 g (cuantitativo). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 0,1 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 1,22 (d, 3H, J = 21 Hz), 2,50 (s, 2H), 3,75-4,05 (m, 4H), 5,54 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,73 (s, 1H), 6,0 (d, 1H, J = 18 Hz), 7,81 (d, 1H, J = 9 Hz), 8,57 (br, s, 1H), 11,1 (s, 1H),

Ejemplo de Referencia 15-2. Síntesis de 5'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-3'-*O*-levulinil-2'-desoxi-2'-fluoro 2'-*C*-

metiluridina (10):

[0255] A una solución agitada de nucleósido **9** (116,9 g, 312,1 mmol) en DCM (1 L) se añadió DMAP (30,5 g, 249,7 mmol) y se dejó agitar a TA durante 20 min. Una solución de anhídrido levulinico (133,6 g, 642,3 mmol) en DCM (200 mL) se añadió a la mezcla y se dejó en agitación durante 24 h. La TLC de la mezcla indicó la finalización de la reacción. Se añadió agua fría (500 mL) y la mezcla se agitó durante 20 min. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con una solución sat. de bicarbonato de sodio (2 X 250 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se destiló el disolvente a presión reducida para dar un aceite amarillo. Rendimiento bruto: 197,6 g (135%). El material se utilizó tal cual para el siguiente paso. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 0,11 (s, 6H), 0,94 (s, 9H), 1,34 (d, 3H, J = 21 Hz), 2,22 (s, 3H), 2,6-2,89 (m, 4H), 3,72 (m, 1H), 4,01 (d, 1H, J = 12 Hz), 4,23 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,33 (dd, 1H, J = 15 Hz), 5,73 (d, ¹H, J = 6 Hz), 6,26 (d, 1H, J = 15 Hz), 8,12 (d, 1H, J = 12 Hz), 8,72 (ancho, s, 1H).

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

[0256] Se disolvió **10** crudo (197,6 g, -312,1 mmol) en DCM (1 L) al que se añadió TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) y se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. La TLC de la mezcla indicó aproximadamente un 50% de finalización de la reacción. Se añadió otro equivalente de TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) y se dejó agitar la mezcla de reacción durante 6 h. La TLC en este punto indicó aproximadamente un 10% de material de partida sin reaccionar. Se añadieron otros 0,25 eq de TEA.3HF (12,5 g, 78,0 mmol) y se dejó agitar la mezcla de reacción durante la noche. La mezcla de reacción se concentró a sequedad para dar un aceite amarillo. El crudo de todos los lotes se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-2% de MeOH en DCM) para dar 124,1 g de 3'-levulinato como una espuma sólida blanca (90% de rendimiento purificado en tres pasos de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina). ¹H RMN: (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,55 (d, 3H, CH₃, J = 20 Hz), 2,36 (s, 3H, CH₃), 2,8 a 3,3 (m, 5H, CH₂CH₃), 3,91-3,96 (dd, 1H, CH''), 4,2-4,25 (m, 1H, CH'), 4,34 (dd, 1H, CH, J = 8 Hz), 5,25 (dd, 1H, J = 16 Hz), 5,93 (d, 1H, J = 8 Hz), 8,20 (d, 1H, J = 8 Hz), 9,18 (s, 1H).

Ejemplo de Referencia 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):

[0257] A una solución del nucleósido (**3a**, 1,00 mmol, 358 mg) en 5 mL de THF anhidro que se enfrió a 0°C se añadió 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 añadió el reactivo (aproximadamente 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 un lote y se dejó agitar a ta. Después de 16 h, quedaba ~30% de material de partida. La mezcla de reacción se inactivó con 10 mL de solución saturada de NH₄Cl y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad para dar una espuma de color amarillo pálido (500 mg). Este se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando metanol al 2-5% en cloruro de metileno para dar el producto en forma de una espuma blanca (275 mg) de aproximadamente 97% de pureza quiral P y material de partida sin reaccionar (162 mg). Basado en el material de partida consumido, el rendimiento fue del 76%. ³¹P RMN (CDCl₃, 162 MHz): 3,7 ppm; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,22 (dd, 6H, J = 6,4 Hz), 1,37 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,63-2,9 (m, 4H), 4,0 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,2-4,33 (m, 1H), 4,57 (d, 1H, J = 8Hz), 4,96-5,00 (sept, 1H), 5,2 (dd, 1H), J = 9 Hz), 5,42 (d, 1H, J = 8Hz), 6,19 (d, 1H, J = 18Hz), 7,15-7,35 (m, 5H), 7,5 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 8,2 (ancho, s, 1H).

Ejemplo de Referencia 15-5. Síntesis 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-hidroxi-4-metil-tetrahidrofuran-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (S_P-4)

[0258] Se preparó una solución de sulfito de sodio añadiendo Na₂S₂O₃ (1,51 g) y Na₂S₂O₅ (0,57 g) en agua (25 mL). A una solución del levulinato (11, 250 mg, 0,40 mmol) en THF anhidro (2,5 mL) se le añadió 1,0 mL de la solución de sulfito de sodio. Se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (15 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL), se secó y se evaporó para dar cuantitativamente un producto sólido blanco con una pureza quiral P de aproximadamente el 97% que coincidía con las propiedades físicas y espectrales de S_P-**4** producido directamente a partir del nucleósido desprotegido.

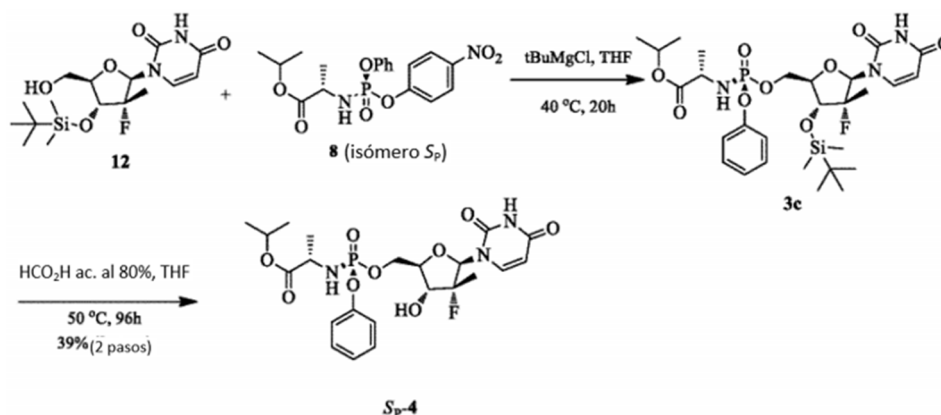
Ejemplo de Referencia 16. Método alternativo para preparar S_P-4 a partir de 3a.

[0259] A una solución agitada de ácido 4-oxo-pentanoico de éster (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-fluoro-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidrofuran-3-ilo (**3a**, 210 mg, 0,59 mmol) en THF seco (1,5 mL) se añadió éster a 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 después de 10 min la mezcla de reacción se volvió una solución de color amarillo oscuro. Después de 30 min, 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) se añadió gota a gota durante un período de 3 min. La mezcla se calentó a 40°C durante 5 h, entonces la CCF y ¹H RMN indicó menos de 2% de material de partida sin reaccionar. La reacción se inactivó con cloruro de amonio acuoso saturado y luego se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se lavó con una solución acuosa de

Na₂CO₃ al 10% (3 x 10 ml), seguido de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar un residuo de color marrón (410 mg). El producto bruto se disolvió en tetrahidrofurano (1,0 mL) y luego se añadió una solución acuosa de la mezcla de sulfito de sodio (37 mg, 0,295 mmol) y metabisulfito de sodio (224 mg, 1,18 mmol) en 1 ml de agua. La mezcla se calentó a 45°C durante 20 h, en cuya etapa solo se observó una conversión de aproximadamente el 10% por TLC, por lo tanto, se agregó sulfito de sodio adicional (74 mg) y metabisulfito de sodio (448 mg) y se continuó el calentamiento durante 52 mg adicionales. h. En este momento, aproximadamente el 40% de conversión se observó por TLC. La mezcla de reacción se repartió entre agua y acetato de etilo. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro **40** y se concentró para dar un residuo marrón (210 mg). La cromatografía en columna del residuo usando un gradiente de MeOH/DCM al 0-5% dio material de partida sin reaccionar (89 mg) y S_P-4 (57 mg, 18% de rendimiento, 24% basado en el material de partida recuperado).

Ejemplo de Referencia 17. Preparación de S_P-4 con 3c como intermedio sintético

[0260]



Ejemplo de Referencia 17-1. Preparación de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydrofuran-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona, 12.

[0261] A una solución de 3 (10,0 g, 38,43 mmol) en piridina (50 mL) se le añadió diclorometano (50 ml). La solución se enfrió a 0°C. A la solución se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (14,32 g, 42,27 mmol) y la solución se agitó a 0°C durante 5 h. Se añadió metanol (5 mL) para detener la reacción. La solución se concentró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se repartió 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 disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (100 ml). A la solución se le añadieron 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 añadió metanol para apagar la reacción (5 mL) y el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se repartió 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 dar el producto intermedio 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS. Este a su vez se trató con ácido trifluoroacético al 1% en diclorometano (200 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (20 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora más. Se añadió lentamente metanol (5 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora más. Se añadió 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 hasta sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (metanol al 1-5% en diclorometano) para dar 12 en forma de un sólido blanco, 7,5 g con un rendimiento del 50% durante las tres etapas. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm) 11,48 (s ancho, 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 (ancho d, 1H, H-5'b), 1,27 (d, 3H, 2-CH₃), 0,89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0,12 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

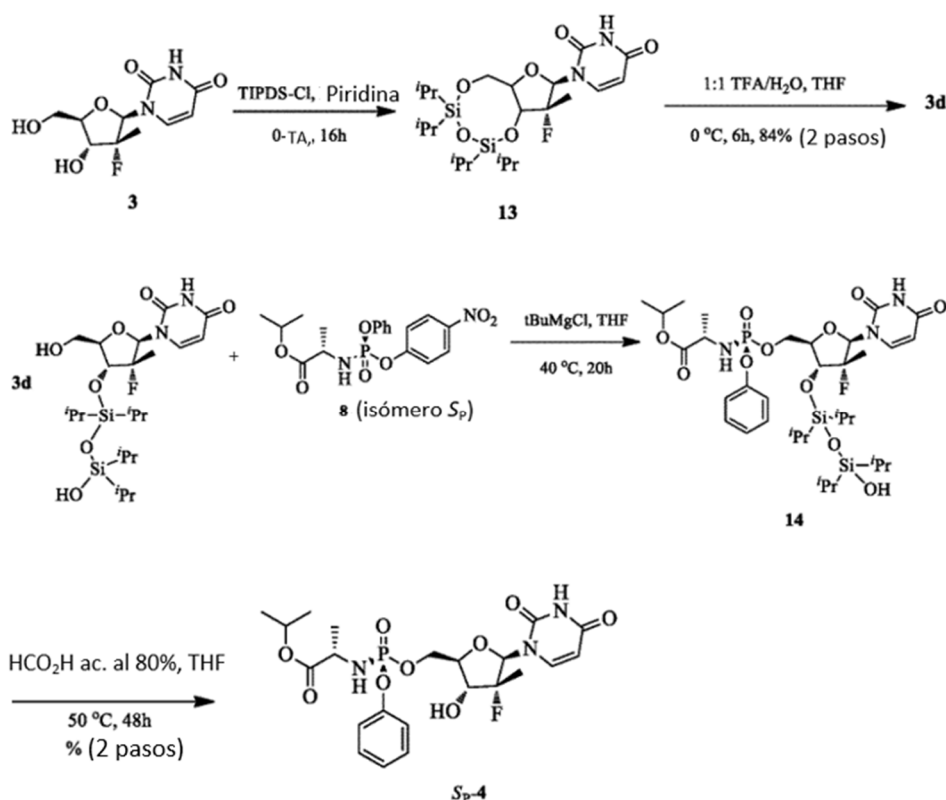
Ejemplo de Referencia 17-2. Preparación de S_P-4 usando 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona (3c).

[0262] A una solución agitada de 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilanilo)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metiltetrahydro-furan-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona (12, 374 mg, 1 mmol) en THF seco (3 mL) se añadió a 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 después de 10 minutos la mezcla de reacción se volvió una solución transparente de color amarillo oscuro. Después de 30 min, 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) se añadió gota a gota durante un período de 3 min. La mezcla se calentó a 40°C durante 20 h, momento en donde la TLC **41** y ¹H RMN indicó menos del 5% de material de partida sin reaccionar. La mezcla de reacción se inactivó con cloruro de amonio acuoso saturado y luego se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa

de Na_2CO_3 al 10% (3 x 10 ml), seguido de agua (20 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar un residuo marrón que contenía **3c** (850 mg). El producto bruto se disolvió en tetrahidrofurano (2 mL) y se le añadieron 0,8 ml de ácido fórmico acuoso al 80% a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 96 h. Aproximadamente el 70% de conversión se observó mediante TLC. La mezcla de reacción se vertió en bicarbonato de sodio acuoso saturado frío y luego se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar un residuo marrón (220 mg). La cromatografía en columna del residuo usando 0-5% de MeOH/DCM gradiente dio el material de partida no reaccionado (21 mg) y **S_P-4** (77 mg, rendimiento del 35%, rendimiento 39% basado en el material de partida recuperado).

Ejemplo de Referencia 18. Preparación de **S_P-4** con **3d** como intermedio sintético

[0263]



Ejemplo de Referencia 18-1. Preparación de **3d**

[0264] A una solución agitada de **3** en piridina (20 mL) a 0°C se le añadió gota a gota TIPDS-Cl durante un período de 15 min. La mezcla se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente, temperatura a la que se agitó durante 16 h. La piridina se evaporó y el residuo se co-evaporó con tolueno (50 ml). Después, el residuo se trituró con hexanos y el precipitado blanco se separó por filtración usando una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un sólido espumoso (12,97 g). El producto bruto (**13**) se redisolvió en tetrahidrofurano (75 mL) y se añadió una solución acuosa de TFA (75 ml, TFA 1:1/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 solución acuosa saturada de NaHCO_3 hasta pH 8 y después se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó con agua, se secó y se concentró para dar un sólido cristalino blanco. La trituración adicional del sólido con hexanos (30 mL) dio un sólido blanco que se filtró y se secó a alto vacío para dar **3d** (10,1 g, rendimiento del 84% en 2 pasos). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8,83 (s ancho, 1H), 7,94 (bd, $J = 6,0$ Hz, 1H), 6,10 (bd, $J = 18,4$ Hz, 1H), 5,71 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 4,43 (bs, 1H), 4,36 (dd, $J = 22,6, 9,0$ Hz, 1H), 4,27 (bs, 1H), 4,10 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 4,03 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,92 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 1,39 (d, $J = 22,0$ Hz, 3H), 1,11-0,92 (m, 28H).

Ejemplo de Referencia 18-2. Preparación de **S_P-4**

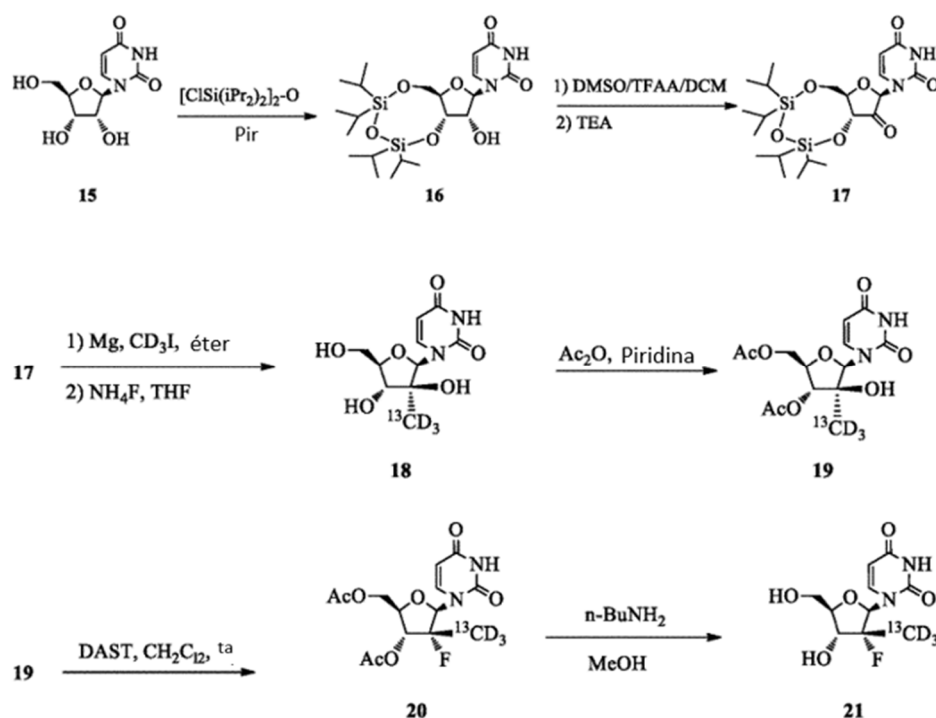
[0265] A una solución agitada de **3d** (520 mg, 1 mmol) en THF seco (5 mL) se le añadió una solución 1,7 M de cloruro de terc-butilmagnesio (1,8 ml, 3,1 mmol, 3,1 equiv.) a temperatura ambiente durante un período de 15 min. Después de 30 min, una solución de éster isopropílico del ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenocefalosporilamino]propiónico (**8**, isómero **S_P**, 653 mg, 1,6 mmol) en THF (1 ml) gota a gota durante un período de 3 min. Se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 60 h. ^1H y ^{31}P RMN de la muestra bruta indicó mezcla de diastereómeros en

aproximadamente 1:0,76. La mezcla de reacción se inactivó con NH_4Cl acuoso saturado (20 ml). La mezcla se repartió entre acetato de etilo (150 mL) y, secuencialmente, Na_2CO_3 acuoso al 10% (3 x 20 mL) y agua (20 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de color amarillo pálido (14, 878 mg).

[0266] El compuesto anterior, **14**, se volvió a disolver en tetrahidrofurano (3 mL) y después se añadió 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 acuoso saturado (pH 7,0). Después, la mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para dar 560 mg del residuo. El residuo se cromatografió usando gradiente de 0-5% de metanol/diclorometano para dar material de partida sin reaccionar (**14**, 242 mg) y **S_P-4** (80 mg, 15% de rendimiento) como un sólido blanco.

Ejemplo de Referencia 19. Preparación de **S_P-4** marcado isotópicamente

[0267]



Ejemplo de Referencia 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]trioxadisilicina-8-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, **16**

[0268] Se co-evaporó uridina (**15**, 100,0 g, 409,5 mmol) a sequedad con piridina anhidra (600 mL) y se resuspendió en piridina anhidra (700 mL). A esta suspensión fina agitada se le añadió 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (135,7 g, 482,5 mmol) durante 60 min a temperatura ambiente. Después de agitar la suspensión fina durante 17 h a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo metanol (20 mL) y luego se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre acetato de etilo (1,5 L) y agua (2L). La capa orgánica se lavó adicionalmente con ácido clorhídrico al 5% (2 x 1 L), salmuera (500 ml), se secó sobre sulfato de sodio sólido (50 g), se filtró y se concentró a presión reducida para dar el producto bruto, aproximadamente 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 juzga por una TLC homogénea (R_f 0,55 en hexanos-acetato de etilo 1:1) se combinaron y concentraron a presión reducida y se secaron (40°C , 0,2 mm Hg, 24 h) para producir 145,5 g (76%) de **16** como un sólido de espuma blanca. También se recogió una fracción adicional (35 g) de **16** ligeramente impuro. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) 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, $2'\text{-OH}$), 5,50-5,49 (m, 2H, $1'\text{-H}$ y $H-5$), 4,14-4,18 (m, 3H, $2'$, $3'$, $4'\text{-H}$), 3,97-3,87 (m, 2H, $5'\text{-Ha}$ y Hb), 1,02-0,95 (m, 28H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

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

[0269] A un matraz redondo seco de tres bocas se le añadieron DCM anhidro (600 mL) y DMSO (30,82 g, 394,5 mmol). La solución se enfrió a -78°C en un baño de hielo seco/acetona bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió anhídrido trifluoroacético (puro, 77,7 g, 369,8 mmol) mediante una jeringa durante 40 minutos y proporcionó una

mezcla turbia. A la mezcla se le añadió gota a gota una solución del derivado de uridina 16 en DCM (600 mL) durante 75 minutos a -78°C mediante un embudo de adición. La mezcla heterogénea se agitó durante 2 h a -78 ~ -65°C y luego se añadió trietilamina anhidra (92 mL) mediante una jeringa rápidamente para formar una solución transparente de color amarillo claro. Después de 1 h a baja temperatura, la reacción se completó como se muestra por TLC (EtOAc al 30% en hexanos). Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se detuvo mediante la adición de una solución sat. NH₄Cl (180 mL). Se añadió agua (200 mL) y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo nuevamente con DCM (300 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (3 x 400 mL), salmuera (150 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente proporcionó un residuo marrón pegajoso.

[0270] El residuo crudo (traza contenida de DCM) se almacenó durante la noche en el congelador. Después de una noche, se observó algo de sólido cristalino 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% frío en hexanos (1 L) para eliminar la mayor parte del color naranja. El sólido (17) se secó al vacío durante 2 h y luego se secó al aire durante 24 h. El sólido pesó 21 g después de secarlo 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 en forma de un sólido naranja claro.

Ejemplo de Referencia 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

[0271] Se colocó magnesio (3,53 g, 147 mmol), se lavó con ácido clorhídrico acuoso al 5% y se secó (50°C, 0,2 mm Hg, 24 h) en un matraz de fondo redondo de dos bocas equipado con un agitador magnético y un condensador. El matraz se llenó con gas argón y luego se añadió éter anhidro (80 mL). Para el magnesio en éter se añadió lentamente perdeuterio-¹³C yoduro de metilo (15,06 g, 110,3 mmol), que genera una reacción exotérmica. Después de que la mezcla de reacción se enfrió, el sobrenadante se transfirió a una solución del compuesto seco 17 (50°C, 0,2 mm Hg, 15 h) (10,0 g, 20,63 mmol) en THF anhidro (1 L) a -50°C. más de 20 min. Se dejó que la temperatura subiera a -40°C y la mezcla se agitó entre -40 y -25°C durante 4 h. Una vez completada la reacción, la mezcla se diluyó con EtOAc (1 L) a -50°C y luego se añadió lentamente salmuera (300 mL). La capa orgánica se separó y luego se lavó con una solución saturada de cloruro de amonio (300 mL x 2) y se secó con sulfato de sodio. Después de filtrar y concentrar a presión reducida, el residuo se disolvió en MeOH (250 mL). Se añadieron 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. Después de secado al vacío a fondo, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice flash (MeOH: CH₂Cl₂ = 1:20 a 1:10) dar el compuesto 18 (5 g, 46%) como un sólido blanco. ¹H RMN (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 de Referencia 19-4. Preparación de ((2R,3R,4S,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-hidroxi-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahidrofuran-2-il)acetato de metilo, 19

[0272] A una solución de compuesto 18 (5,00 g, 19,1 mmol) en piridina anhidra (100 mL) se añadió 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 x 3) y se secó con sulfato de sodio. Después de la filtración y concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna flash (MeOH del 0 al 5% en CH₂Cl₂) para dar el compuesto 19 (4,0 g, 68%) como un sólido gris.

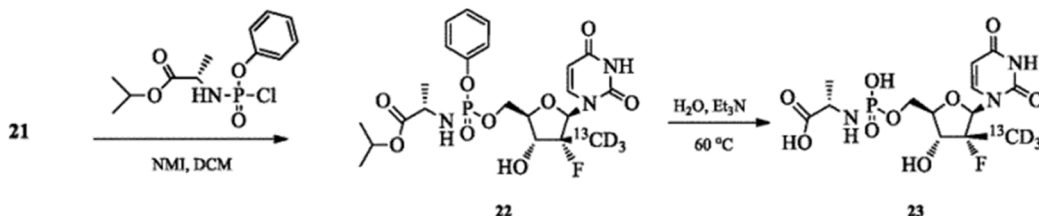
Ejemplo de Referencia 19-5. Preparación de ((2R,3R,4R,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahidrofuran-2-il)acetato de metilo, 20

[0273] A una solución del compuesto 19 (2,33 g, 6,73 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (60 mL) se le añadió DAST (1,33 mL, 10,1 mmol) a -78°C lentamente. La mezcla resultante se agitó durante 30 min después de exponerla a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo dos reacciones adicionales a escala de 2,33 g y una reacción a escala de 1,00 g exactamente de la misma manera. Las cuatro mezclas de reacción se combinaron, se diluyeron con CH₂Cl₂ (300 mL) y se lavaron con agua helada (100 mL x 2) y luego con una solución acuosa fría de NaHCO₃ (100 mL x 2). Después de secar, filtrar y concentrar, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash de gel de sílice (EtOAc del 0% al 50% en hexanos, el compuesto salió aproximadamente al 48%) para dar el compuesto 20 (2,0 g, 24% de un total de 7,99 g) del compuesto 19) como un sólido blanco. ¹H RMN (CDCl₃) 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, CH₃), 2,15 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo de Referencia 19-6. Preparación de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-¹³C-perdeuteriometil-tetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H, 3H)-diona, 21

[0274] A una solución de compuesto 20 (2 g, 5,74 mmol) en metanol (20 mL) se añadió 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 flash de gel de sílice. (MeOH 0 a 10% en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **21** (1,3 g, 85%) como un sólido blanco. ¹H RMN (CD₃OD) 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 de Referencia 19-7. Preparación de (S)-isopropil 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-¹³C-perdeuteriometil-tetrahydrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato, 22

[0275] A una solución del nucleósido no protegido 21 (207 mg, 0,783 mmol) y N-metilimidazol (0,4 ml, 5 mmol) en THF (4 mL) se añadió el fosforocloridato prefabricado en THF (1,0 M, 2,35 ml, 2,35 mmol) a 0°C gota a gota. La reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadieron agua (1 ml) y EtOAc (5 ml). La solución orgánica se lavó con una solución sat. ac. de citrato de sodio monobásico (2 X 2 ml), solución sat. ac. de NaHCO₃ (13 X 2 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de sílice usando 0 a 5% de iPrOH en CH₂Cl₂ como eluyentes para dar el fosforamidato, 22 (216 mg, 52%, mezcla 1:1 de diastereoisómeros P) como un sólido blanco: ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,54 (s, 1H), 7,56 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,40-7,35 (m, 2H), 7,23-7,18 (m, 3H), 6,14-5,96 (m, 2H), 5,89 (dd, *J* = 5,6, 25,6 Hz, 1H), 5,55 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,85 (dq, *J* = 1,6, 6,0 Hz, 1H), 4,44-4,32 (m, 1H), 4,25 (m, 1H), 4,06-3,98 (m, 1H), 3,86-3,70 (m, 2H), 1,30-1,08 (m, 9H); ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4,90, 4,77; EMBR (ESI)[M+H]⁺ calculado para C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534,5, encontrado 534,4.

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

[0276] Fosforamidato 22 (147 mg, 0,276 mmol) se suspendió en trietilamina (2 mL) y agua (0,5 mL) y se calentó a 60°C durante 30 h. A continuación, los componentes volátiles se evaporaron a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con 50-70% de iPrOH en CH₂Cl₂ y luego, 0 a 20% de NH₄OH en iPrOH para dar 23 como un sólido blanco (95 mg, 83%): ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,98 (d, *J* = 19,2 Hz, 1H), 5,52 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,02-3,81 (m, 4H), 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); ³¹P RMN (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,12; EMBR (ESI)[M+H]⁺ calculado para C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₉P 416,3, encontrado 416,4.

Propiedades de las muestras de Rp-4, 4, y Sp-4

[0277] Las muestras de Rp-4, 4, y Sp-4 se analizaron por difracción de polvo de rayos X (XRPD), espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis gravimétrico térmico (TGA), sorción gravimétrica de vapor (GVS), solubilidad acuosa termodinámica y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Ejemplo de Referencia 20. Difracción de polvo de rayos X

[0278] Las muestras de Rp-4,4, y Sp-4 se analizaron por difracción de polvo de rayos X (XRPD) bajo el siguiente régimen.

a. Bruker AXS/Siemens D5000

[0279] Se recogieron patrones de difracción de polvo de rayos X en un difractómetro Siemens D5000 utilizando radiación Cu Kα (40 kV, 40 mA), goniómetro θ-θ, divergencia de V20 y rendijas receptoras, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. El rendimiento del instrumento se verifica utilizando un estándar certificado de Corindón (NIST 1976). El software utilizado para la recopilación de datos fue Diffrac Plus XRPD Commander v2,3,1 y los datos se analizaron y presentaron utilizando Diffrac Plus EVA v 11.0.0,2 o v 13.0.0,2.

Condiciones ambientales

[0280] Las muestras procesadas en condiciones ambientales se prepararon como muestras de placa plana usando polvo tal como se recibieron. Aproximadamente 35 mg de la muestra se empaquetaron suavemente en una cavidad

cortada en una oblea de silicio pulida de fondo cero (510). La muestra se rotó en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recolección de datos son: rango angular: 2 a 42 °2 θ ; tamaño de paso: 0,05 °2 θ ; y tiempo de recogida: 4 s.paso⁻¹.

5 b. Bruker AXS C2 GADDS

[0281] Se recogieron patrones de difracción de polvo de rayos X en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), platina XYZ automatizada, microscopio de video láser para posicionamiento automático de muestras y un detector de área bidimensional HiStar. La óptica de rayos X consta de un único espejo multicapa de Göbel acoplado a un colimador estenopeico de 0,3 mm.

[0282] La divergencia del haz, es decir, el tamaño efectivo del haz de rayos X sobre la muestra, fue de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de escaneo continuo θ - θ con una distancia de muestra - detector de 20 cm que da un rango efectivo de 2 θ de 3,2°–29,7°. Normalmente, la muestra se expondría al haz de rayos X durante 120 segundos. El software utilizado para la recopilación de datos fue GADDS para WNT 4,1,16 y los datos se analizaron y presentaron utilizando Difrac Plus EVA v 9,0,0,2 o v 13,0,0,2.

Condiciones ambientales

[0283] Las muestras ejecutadas bajo condiciones ambientales se prepararon como muestras de placa plana utilizando polvo tal como se recibieron sin moler. Aproximadamente 1-2 mg de la muestra se presionaron ligeramente sobre un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana.

Difracción de rayos X en polvo (XRPD)

[0284] Se encontró por XRPD que **4** era amorfo (ver **FIG. 1**). El análisis XRPD de alta resolución de *R_P-4* preparado según el Ejemplo 3 confirmó un sólido cristalino que presentaba un patrón de polvo diferente al de *S_P-4* (preparado según el Ejemplo 4, Método 4), que también se confirmó que era un sólido cristalino. La tabla de resultados de XRPD para *R_P-4* y *S_P-4* se muestra en la Tabla 1 con todos los picos que exhiben una intensidad de $\leq 5\%$ (*R_P-4*) y $\leq 3\%$ (*S_P-4*) excluidos.

Tabla 1. Datos de XRPD para *R_P-4* y *S_P-4*.

	Datos de XRPD para <i>R_P-4</i>		Datos de XRPD para <i>S_P-4</i> (Forma 1)	
	Ángulo 2-Theta °	Intensidad %	Ángulo 2-Theta °	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
	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

(Continuación)

	Datos de XRPD para <i>S_P-4</i>		Datos de XRPD para <i>S_P-4</i> (Forma 1)	
	Ángulo 2-Theta °	Intensidad %	Ángulo 2-Theta °	Intensidad %
5	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
10	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
15	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
20	38,313	5,8	40,416	3,1
	38,943	8,4		
	40,093	6,6		
	40,511	7,8		
25	41,429	6,5		

[0285] Una muestra de *S_P-4* se molió con un mortero y luego se pasó sucesivamente a través de tamices de 500 y 250 µm para producir la muestra como un polvo fino. Esta muestra se volvió a analizar mediante XRPD de alta resolución, confirmando que no se había producido ningún cambio de forma.

Ejemplo 21. Estudios de cristalización para *S_P-4*.

[0286] *S_P-4* cristalino exhibe polimorfismo. Por tanto, un aspecto se dirige a *S_P-4* cristalino y sus formas polimórficas individuales. *S_P-4* puede existir en al menos cinco formas polimórficas, designadas como Formas 1-5. Además, también se puede preparar *S_P-4* amorfo. Una cristalización típica prevé la disolución de aproximadamente 100 mg de *S_P-4* en un volumen apropiado de disolvente de cristalización (acetonitrilo (5 vol), cloroformo (5 vol), acetato de n-butilo (7 vol), diclorometano (50 vol), anisol (7 vol) y MTBF/heptano 1:1 (50 vol)) y luego se deja evaporar la solución a 5°C. Se obtuvieron varias formas cristalinas, pero cada forma, después de la filtración y/o secado, proporcionó la Forma 1.

[0287] Las formas 1, 2 y 3 son una forma no solvatada, solvato de DCM 1:1 y solvato de cloroformo 1:1, respectivamente., como se confirmó mediante análisis de rayos X de cristal único 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 se pudieron recopilar datos suficientes para determinar si las Formas 4 y 5 están sin solvatar, hidratadas o solvatadas, ya que no se obtuvieron cristales únicos de calidad suficiente. Las formas 4 y 5 se transforman en la forma 1 en la filtración. Se obtienen dos formas cristalinas adicionales tras la cristalización de *S_P-4* en acetato de n-butilo (*n*BuAc) y una solución que contiene metil-*t* butil éter (MTBE) y heptano; tras la filtración, ambas formas cristalinas se convierten en la Forma 1. Las Formas 2 y 3 también se transforman en la Forma 1 en el aislamiento. La Forma 1 es una forma no solvatada que exhibe una amplia endotermia de fusión con una temperatura de inicio de 94,3°C y ΔH_{fus} de 24,0 kJ mol⁻¹. En la **Figura 4** se muestra un patrón XRPD adicional de *S_P-4* Forma 1.

Conversión de *S_P-4*, Forma 1 a *S_P-4*, Forma 6

[0288] La Forma 1 se puede convertir a la Forma 6 de al menos dos formas.

[0289] En primer lugar, al permitir 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. Después de triturar el sólido monohidrato hasta obtener un polvo fino, el patrón de XRPD permanece consistente con la Forma 1. Tras 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 durante al menos 2 años en un recipiente sellado.

[0290] Alternativamente, la Forma 1 se puede suspender en agua de 5-50 mg/ml a temperatura ambiente y durante unas pocas horas puede transformarse en Forma 6. La eficiencia del proceso de transformación de agua se puede mejorar calentando el agua a un punto de disolver más Forma 1 y para aumentar la fluidez de la porción inmiscible de *S_P-4* a partir de una goma rígida para un aceite suspendido a aproximadamente o por encima. Con el tiempo, la Forma 6 puede comenzar a cristalizar a 50°C. El enfriamiento adicional de la suspensión a 0-10°C conduce a una mayor

recuperación de sólido. La cristalización del agua también elimina más trazas de impurezas polares, lo que mejora la pureza general.

[0291] La redisolución de la Forma 6 como disolvente orgánico tal como diclorometano o acetonitrilo seguido de cristalización proporciona la Forma 1, incluso cuando se siembra con la Forma cristalina 6.

[0292] A un matraz de fondo redondo seco de 100 ml de una boca equipado con un septo de caucho y barra de agitación magnética se cargó 1,04 gramos de **Sp-4**, la Forma 1. Pureza HPLC 99,7%. Se cargó 40 mL de agua desionizada. Comenzó a agitar la suspensión vigorosamente mientras se calentaba a 50°C. Una vez que la temperatura alcanzó los 50°C, la solución mayoritariamente homogénea se mantuvo durante 60 minutos, tiempo durante el cual los sólidos comenzaron a precipitar de la solución, formando una suspensión espesa. La suspensión se enfrió a 20°C durante 90 minutos y se mantuvo durante 16 horas a 20°C, seguido de enfriamiento adicional a 0-5°C durante 30 minutos y se mantuvo a 0-5°C durante 2,5 horas. La suspensión se filtró en un embudo fritado de vidrio de porosidad media y se lavó con 10 ml de agua helada. La torta húmeda se secó por succión durante 2 horas antes de secar en un horno de vacío durante la noche durante 23 horas a 50°C. 0,88 g aislado (recuperación 84,6%) de **Sp-4**, Forma 6.

[0293] La Forma 6 tiene un punto de fusión observado de aproximadamente 124,5 a 126°C.

Ejemplo de Referencia 21-1. **Sp-4** 21-1. **Sp-4** Forma 1

[0294] Una lista de pico de **Sp-4** Forma 1 se presenta en la **Tabla 2**.

Ángulo	Intensidad%
2-Theta ^a	%
5,0	74,8
7,3	100,0
7,8	2,2
8,2	6,8
8,8	9,3
9,4	23,5
10,0	8,4
11,4	4,2
13,3	3,0
14,2	6,1
14,9	3,5
16,1	7,9
16,6	13,2
17,3	15,4
17,7	10,1
18,1	42,6
18,4	7,6
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

(Continuación)

Ángulo	Intensidad%
2-Theta°	%
27,2	3,2
27,5	2,2
28,1	2,9
30,0	3,2

Ejemplo de Referencia 21-2. Sp-4 Forma 2

[0295] En la **Figura 5** se representa un patrón XRPD de **Sp-4** Forma 2.

[0296] En la **Tabla 3** se presenta una lista de picos de **Sp-4** Forma 2.

Ángulo	Intensidad%
2-Theta°	%
4,9	44,1
5,1	19,1
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 de Referencia 21-3. Sp-4 Forma 3

[0297] En la **Figura 6** se representa un patrón XRPD de **Sp-4** Forma 3.

[0298] En la **Tabla 4** se presenta una lista de picos de **Sp-4** Forma 3

Ángulo	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 de Referencia 21-4. Sp-5 Forma 4

[0299] En la **Figura 7** se representa un patrón XRPD de **Sp-4** Forma 4.

[0300] Un pico lista de **S_P-4** Forma 4 se presenta en la **Tabla 5**.

Ángulo 2-Theta°	Intensidad%
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 de Referencia **21-5. S_P-4 Forma 5**

[0301] En la **Figura 8** se representa un patrón XRPD de **S_P-4** Forma 5.

[0302] En la **Tabla 6** se presenta una lista de picos de **S_P-4** Forma 5.

Ángulo 2-Theta°	Intensidad%
5,2	52,9
6,6	100,0
7,1	25,9
9,7	12,1
10,4	16,4
13,4	11,4
15,7	25,8
19,1	31,1
19,9	12,9
20,0	9,0
21,3	3,5
25,0	22,3
25,6	2,3
26,3	5,9
26,9	2,0
31,7	2,1

Ejemplo 21-5. **S_P-4** Forma 6

[0303] En la **Figura 21** se representa un patrón XRPD de **S_P-4** Forma 6.

[0304] En la siguiente tabla se presenta una lista de picos de **S_P-4** Forma 6.

Ángulo 2-Theta°	Espaciado d Å	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

(Continuación)

Ángulo 2-Theta°	Espaciado d Å	Intensidad%
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
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 de Referencia 21-7. Sp-4 (Amorfo)

[0305] En la **Figura 9** se representa un patrón de XRPD para Sp-4 amorfo.

Ejemplo de Referencia 22. Cristalografía de rayos X monocristalino de Sp-4 y sus solvatos**Ejemplo de Referencia 22-1. Cristalografía de rayos X de cristal único de Sp-4 (Forma 1)**

[0306] La Figura 10 muestra una estructura cristalina de rayos X para Sp-4 Forma 1. Allí, la figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 1 de las cristalinas estructura que muestra el esquema de numeración empleado. Los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópicos para los átomos que no son de hidrógeno se muestran con un nivel de probabilidad del 50%. Los átomos de hidrógeno se muestran con un radio arbitrariamente pequeño.

[0307] La solución de la estructura se obtuvo por métodos directos, de matriz completa de mínimos cuadrados de refinamiento en F^2 con ponderación $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0592P)^2 + (0,6950P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica mediante armónicos esféricos, implementado en el algoritmo de escalado 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 F de 7090 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,016$ para todos los datos y 870 parámetros. Δ/σ final (máx.) 0,001, Δ/σ (media), 0,000. Mapa de diferencia final entre +0,534 y -0,36 e Å⁻³.

Tabla 7. Parámetros monocristalinos de la Forma 1

Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Peso molecular	529,45				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo 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	1,347g.cm ⁻¹				
μ	1,475mm ⁻¹				
Fuente, λ	Cu K α , 1,54178 Å				
$F(000)$	1112				
T	100(1)K				
Cristal	Placa incolora, 0,12 x 0,09 x 0,03 mm				
Datos truncados a	0,80 Å				

(Continuación)

		<i>b</i>	6,10290 (10) Å,	β	112,290 (3) ^º ,
		<i>c</i>	23,0138 (6) Å,	γ	90 ^º
$\theta_{\text{max.}}$	74,48 ^º				
Compleción	99,4%				
Reflexiones	14854				
Reflexiones únicas	7513				
R_{int}	0,0217				

Ejemplo de Referencia 22-2. Cristalografía de rayos X de cristal único de Sp-4 (Forma 2)

[0308] La Figura 11 muestra una estructura cristalina de rayos X para Sp-4 Forma 2, esta cifra muestra que hay una vista de las moléculas de la Forma 2 del cristal estructura que muestra el esquema de numeración empleado. Los heteroátomos se resolvieron isotrópicamente debido a datos muy débiles. Los átomos de hidrógeno no se muestran.

[0309] La solución de la estructura se obtuvo por métodos directos, de matriz completa de mínimos cuadrados de refinamiento en F_2 con ponderación $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0975P)^2 + (10,6969P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica mediante armónicos esféricos, implementado en el algoritmo de escalado SCALE3 ABSPACK. wR^2 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 convencional = 0,0741 en valores F de 2525 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,05$ para todos los datos y 158 parámetros. Δ/σ final (máx.) 0,000, Δ/σ (media), 0,000. Mapa de diferencia final entre +1,388 y -0,967 e Å⁻³.

Tabla 8. Parámetros monocristalinos 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	$P2_1$	α	12,8315 (3) Å,	α	90 ^º ,
		b	6,14530 (10) Å,	β	91,752 (2) ^º ,
		c	17,6250 (4) Å,	γ	90 ^º
V	1389,14(5) Å ³				
Z	2				
D_c	1,469 g/cm ⁻³				
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				
θ máx.	62,23 ^º				
Compleción	91,1%				
Reflexiones	3528				
Reflexiones únicas	2562				
R_{int}	0,0227				

Ejemplo de Referencia 22-3. Cristalografía de rayos X de cristal único de Sp-4 (Forma 2)

[0310] 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), C₂₃H₃₁N₃PO₉FCl₂, produce un grupo espacial monoclínico $P2_1$ (ausencias sistemáticas $0k0$: $k = \text{impar}$) con $a = 12,8822$ (14) Å, $b = 6,1690$ (7) Å, $c = 17,733$ (2) Å, $\beta = 92,045$ (3)^º, $V = 1408,4$ (3) Å³, $Z = 2$ 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 emplea radiación Mo-K α monocromatizada con grafito ($\lambda = 0,71073$ Å) a una temperatura de 143 K. Se realizó una indexación preliminar a partir de una serie de doce imágenes de rotación de 0,5^º con exposiciones de 30 segundos. Se recogieron un total de 648 imágenes de rotación con una distancia entre el cristal y el detector de 35 mm, un ángulo de oscilación de 2θ □ de □-12^º, anchos de rotación de 0,5^º y exposiciones de 30 segundos: escaneado n^º 1 era un escaneo ϕ de 315^º a 525^º a $\omega = 10^\circ$ y $\chi = 20^\circ$; escaneo n^º 2 era un escaneo ω de -20^º a 5^º en $\chi = -90^\circ$ y $\phi = 315^\circ$; escaneo n^º 3 era un escaneo ω de -20^º a 4^º a $\chi = -90^\circ$ y $\phi = 135^\circ$; escaneo n^º 4 era un escaneo ω de -20^º a 5^º a $\chi = -90^\circ$ y $\phi = 225^\circ$; escaneo n^º 5 era un escaneo ω de -20^º a 20^º en $\chi = -90^\circ$ y $\phi = 45^\circ$. Las imágenes de rotación se procesaron usando CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), produciendo una lista de valores F^2 y $\sigma(F^2)$ no promediados que luego se pasaron a CrystalStructure (CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigaku/MSO (2002)) paquete de programas para

un procesamiento posterior y una solución de estructura en una computadora Dell Pentium III. Se midieron un total de 7707 reflejos en los rangos $5,48 \leq 2\theta \leq 50,04^\circ$, $-14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$ produciendo 4253 reflejos únicos ($R_{\text{int}} = 0,0180$). Los datos de intensidad fueron corregidos por Lorentz y efectos de polarización y por absorción usando REQAB (transmisión mínima y máxima 0,824, 1.000).

[0311] 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 y R. Spagna (1999). J. Appl. Cryst., 32, 115-119). El refinamiento se realizó mediante mínimos cuadrados de matriz completa basados en F_2 usando SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, GM (2008) Acta Cryst., A64, 112-122). Todas las reflexiones se utilizaron durante el refinamiento. El esquema de ponderación utilizado era $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + 0.0472P^2 + 0.4960P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los átomos que no son de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron utilizando un modelo de "conducción". El refinamiento convergió a $R_1 = 0,0328$ y $wR_2 = 0,0817$ para 4046 reflexiones para el que $F > 4\sigma(F)$ y $R_1 = 0,0348$, $wR_2 = 0,0838$ y $GOF = 1,056$ para todas las reflexiones 4253 únicas no nulas, y 358 variables de ($R^1 = \sum |F_o|$; $wR_2 = \{ \sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2 \}^{1/2}$; $GOF = \{ \sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n-p) \}^{1/2}$; donde n = el número de reflexiones y p = el número de parámetros refinados). El Δ/σ máximo en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0,000 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0,312 y -0,389 e/Å³. El parámetro de estructura absoluta de Flack se refinó a -0,06 (6), corroborando así la estereoquímica del compuesto del título.

[0312] La Tabla 1 enumera la información de la célula, los parámetros de recopilación de datos y los datos de refinamiento. Los parámetros térmicos isotrópicos posicionales y equivalentes finales se dan 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.) de la molécula con un 30% de probabilidad de que se muestren elipsoides térmicos.

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

Fórmula:	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ PO ₉ FCl ₂
Peso de fórmula:	614,38
Clase de cristal:	monoclínico
Grupo de espacio:	P2 ₁ (Nº 4)
Z	2
Constantes de célula:	
	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	0,42 X 0,12 X 0,10
D _{calc}	1,449 g/cm ³
F(000)	640
Radiación:	Mo-K α ($\lambda = 0,71073$ Å)
2 θ rango	5,48 – 50,04°
hkl recolectado:	-14 ≤ h ≤ 15; -7 ≤ k ≤ 6; -19 ≤ l ≤ 21
Nº de reflexiones medidas:	7707
Nº de reflexiones únicas:	4253 ($R_{\text{int}} = 0,0180$)
Nº de reflexiones observadas	4,046 ($F > 4\sigma$)
Nº de reflexiones utilizadas en el refinamiento	4253
Nº de parámetros	358
Índices R ($F > 4\sigma$)	$R_1 = 0,0328$ $wR_2 = 0,0817$
Índices R (todos los datos)	$R_1 = 0,0348$ $wR_2 = 0,0838$
GOF:	1,056
Picos de diferencia final, e/Å ³	+0,312, -0,389

Ejemplo de Referencia 22-4. Cristalografía monocristalina de rayos X de Sp-4 (Forma 3)

[0313] La Figura 13 muestra una estructura cristalina de rayos X para Sp-4 Forma 3. Allí, esta figura muestra una vista de las moléculas de la Forma 3 de la estructura cristalina mostrando el esquema de numeración empleado. Los elipsoides de desplazamiento atómico anisotrópicos para los átomos que no son de hidrógeno se muestran con un nivel de probabilidad del 50%. Los átomos de hidrógeno se muestran con un radio arbitrariamente pequeño.

[0314] La solución de la estructura se obtuvo por métodos directos, de matriz completa de mínimos cuadrados de

refinamiento en F_2 con ponderación $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0512 P)_2 + (0,6810 P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, corrección de absorción empírica mediante armónicos esféricos, implementado en el algoritmo de escalado 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 F de 2486 reflexiones con $F_o > 4 \sigma(F_o)$, $S = 1,068$ para todos los datos y 377 parámetros. Δ/σ final (máx.) 0,001, Δ/σ (media), 0,000. Mapa de diferencia final entre +0,211 y -0,334 e $\text{\AA}^3$.

Tabla 10. Parámetros monocristalinos de la Forma 3

Fórmula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{Cl}_3\text{F}_1\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_1$				
Peso molecular	648,82				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo espacial	$P21$	a	12,9257(4) $\text{\AA}$,	α	90° ,
		b	6,18080(10) $\text{\AA}$,	β	96,399(2) $^\circ$,
		c	18,0134(4) $\text{\AA}$,	γ	90°
V	1430,15(6) $\text{\AA}^3$				
Z	2				
D_c	1,507 g, cm^{-3}				
μ	3,977 mm^{-1}				
Fuente, λ	Cu-K α , 1,54178 $\text{\AA}$				
$F(000)$	672				
T	100(1)K				
Cristal	Aguja incolora, 0,22 X 0,03 X 0,02 mm				
Datos truncados a	0,80 $\text{\AA}$				
θ_{max}	74,41 $^\circ$				
Compleción	69,1%				
Reflexiones	3062				
Fórmula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{Cl}_3\text{F}_1\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_1$				
Peso molecular	648,82				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo de espacio	$P21$	a	12,9257(4) $\text{\AA}$,	α	90° ,
		b	6,18080(10) $\text{\AA}$,	β	96,399(2) $^\circ$,
		c	18,0134(4) $\text{\AA}$,	γ	90°
Reflexiones únicas	2607				
R_{int}	0,0198				

Ejemplo de Referencia 23. Estabilidad a temperaturas elevadas y humedad relativa

[0315] Se almacenó una muestra de **Rp-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 **Rp-4** no mostró ningún cambio sustancial durante el curso del experimento, lo que significa que no se observó ningún cambio en la forma sólida. Esto debe contrastarse con una muestra de **4**, que se licuó en aproximadamente 16 horas después del almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa. De hecho, lo siguiente ilustra una ilustración de la naturaleza deliquescente de **4**. Se pasó una muestra de **4** a través de un tamiz de 250 μm , luego se almacenaron las muestras a 40°C / 75% de HR y 25°C / 53% de humedad relativa y se tomaron observaciones visuales a intervalos regulares. Los resultados se dan 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	Deliquesencia				-
25°C/53% HR	Sin deliquesencia	Sólido pegajoso	Deliquesencia parcial	Deliquesencia casi completa	Deliquesencia

[0316] Tras el almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa de una muestra de **Sp-4** con deliquesencia dentro de 16 horas. Por ejemplo, una muestra de **Sp-4** se molió con un mortero y luego se pasó sucesivamente por tamices de 500 y 250 μm para producir la muestra como un polvo fino. Se almacenaron muestras de este material a 40°C y 75% de humedad relativa y 25°C y 53% de HR y se tomaron observaciones visuales a intervalos regulares. Los resultados se dan en la **Tabla 5**.

Tabla 12. Estabilidad de *Sp-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	Delicuescencia parcial

[0317] El análisis XRPD de la muestra después del almacenamiento a 25°C y 53% de HR durante 104 horas no mostró cambios significativos en los difractogramas producidos, lo que indica que no se había producido ningún cambio de forma.

Ejemplo de Referencia 24. Espectrometría transformada de Fourier – infrarrojos (FT-IR)

[0318] Los datos se recogieron en un Perkin-Elmer Spectrum One equipado con un accesorio de muestreo de reflectancia total atenuada universal (ATR). Los datos se recopilaron y analizaron utilizando el software Spectrum v5.0.1.

[0319] El espectro IR obtenido para **4**, *Rp-4*, y *Sp-4* se muestra en las Figs. 5-7, respectivamente. Los picos seleccionados, en números de onda (cm⁻¹) se enumeran a continuación:

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

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

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

Ejemplo 25. Análisis termogravimétrico (TGA) de calorimetría de barrido diferencial (DSC)

[0320] Se recogieron datos de DSC en un TA Instruments Q2000 equipado con un muestreador automático de 50 posiciones. La calibración de capacidad térmica se realizó con zafiro y la calibración de energía y temperatura se realizó con indio certificado.

[0321] La DSC de temperatura modulada se llevó a cabo en típicamente 0,8-1,2 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio perforada, usando una velocidad de calentamiento subyacente de 2°C min⁻¹ y parámetros de modulación de temperatura de ± 0,2°C. min⁻¹ y 40 segundos. Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 50 ml.min⁻¹ sobre la muestra.

[0322] El software de control de instrumentos era Advantage para Q Series v2.8.0.392 y Thermal Advantage v4.8.3 y los datos se analizaron usando Universal Analysis v4.3A.

[0323] Los datos de DSC se recogieron en un Mettler DSC 823e equipado con un muestreador automático de 34 posiciones. El instrumento fue calibrado para energía y temperatura usando indio certificado. Típicamente, se calentó 0,8-1,2 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio con orificios de alfiler, a 10°C min⁻¹ desde 25°C a 250°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.

[0324] Los datos de DSC para *Sp-4* (**Forma 6**) se recogieron usando un instrumento DSC (TA Q2000), usando una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo un flujo continuo de gas nitrógeno seco (100 ml/min). Aproximadamente 2,2 mg de muestra se pesaron con precisión y se calentaron en una bandeja 'Tzero' no sellada herméticamente con una tapa suelta. El instrumento se calibró (entalpía y temperatura) con un patrón de indio y (capacidad calorífica) con un patrón de zafiro. Las incertidumbres se estiman en ± 0,1°C para las temperaturas y ± 5% para las entalpías medidas. Se empleó el software TA Universal Analysis para medir las temperaturas de inicio.

[0325] Los datos de TGA se recogieron en un Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un muestreador automático de 34 posiciones. La temperatura del instrumento se calibró con indio certificado. Típicamente, se cargaron 8-12 mg de cada muestra en un crisol de aluminio pesado previamente y se calentó a 10°C min⁻¹ desde la 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.

[0326] El análisis DSC de **4** mostró una única endotermia amplia con un inicio de 58,7°C (ΔH 14 J.g⁻¹) que se confirmó que se debía a la relajación molecular durante la transición vítrea mediante análisis DSC modulado adicional (Fig. 17). El análisis TGA de **4** no mostró pérdida de peso antes de la descomposición por encima de 240°C, lo que confirma que el material no está solvatado. Como el análisis XRPD de **4** confirmó que el material era amorfo, se llevó a cabo un análisis DSC modulado en un intento de calcular la temperatura de transición vítrea, que resultó ser 57°C.

[0327] El análisis de DSC mostró una única endotermia aguda con un inicio de 136,2°C (ΔH 76 J.g⁻¹) que se confirmó que era una fusión por microscopía de etapa caliente. Ver Fig 18. Análisis TGA de *Rp-4* no mostró pérdida de peso antes de la descomposición por encima de 240°C, lo que confirma que el material sea no solvatada.

[0328] El análisis de DSC de *S_P-4* mostró una única endotermia ancha con un inicio de 93,9°C (ΔH 43 J.g⁻¹) confirmada en una fusión por 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 240°C, lo que confirma que el material no está solvatado.

[0329] El análisis de DSC de *S_P-4* (Forma 6) mostró una endotermia amplia con un inicio de 120,7°C (ΔH 79 J.g⁻¹).

Ejemplo de Referencia 26. Sorción de vapor gravimétrico (GVS)

SMS DVS intrínseca

[0330] Isotermas de sorción se obtuvieron utilizando un analizador de sorción de humedad SMS DVS intrínseca, controlado por software SMS Analysis Suite. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25°C mediante los controles del instrumento. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un caudal total de 200 ml.min⁻¹. La humedad relativa se midió con una sonda Rotronic calibrada (rango dinámico de 1.0-100% de HR), ubicada cerca de la muestra. El cambio de peso (relajación de la masa) de la muestra en función del % de HR fue supervisado constantemente por la microbalanza (precisión $\pm$ 0,005 mg).

[0331] Típicamente se colocó 5-20 mg de muestra en una cesta de acero inoxidable de malla tarada en condiciones ambientales. La muestra se cargó y descargó al 40% de HR y 25°C (condiciones típicas de la habitación). Se realizó una isoterma de absorción de humedad como se describe a continuación (2 exploraciones que dan 1 ciclo completo). La isoterma estándar se realizó a 25°C a intervalos de 10% de HR en un rango de 0,5-90% de HR.

Tabla 13. Parámetros del método para experimentos intrínsecos DVS de SMS

Parámetros	Valores
Adsorción - Escaneo 1	40 - 90
Desorción/Adsorción - Escaneo 2	90 - 0, 0 - 40
Intervalos (% de HR)	10
Número de escaneos	2
Tasa de flujo (ml.min ⁻¹)	200
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C.min ⁻¹)	0,2
Tiempo de sorción (horas)	Tiempo de espera de 6 horas

[0332] La muestra se recuperó después de la finalización de la isoterma y se reanalizó mediante XRPD.

[0333] El análisis GVS mostró que *R_P-4* no era higroscópico que exhibe absorción reversible de aproximadamente 0,2% en peso de agua de 0 a 90% de humedad relativa. El nuevo análisis de la muestra por XRPD después del experimento GVS no mostró cambios en la forma.

[0334] Se molió una muestra de *S_P-4* con un mortero y luego se pasó sucesivamente a través de tamices de 500 y 250 μ m para producir la muestra como un polvo fino que luego se analizó usando un método de ciclo único modificado. La muestra se tomó desde el 40% de HR (aproximadamente ambiente) hasta el 60% de HR, en lugar del 90% para el método estándar, y luego se cicló al 0% y de nuevo al 40% de HR. Este análisis mostró que *S_P-4* no es higroscópico hasta el 60% de HR, con una absorción reversible de $\sim$ 0,2% en peso de agua de 0 a 60% de HR.

Ejemplo de Referencia 27. Solubilidad acuosa termodinámica

[0335] Se determinó la solubilidad acuosa suspendiendo una cantidad suficiente de compuesto en agua para dar una concentración final máxima de $\geq$ 10 mg.ml⁻¹ de la forma libre original del compuesto. La suspensión se equilibró a 25°C durante 24 horas y luego se midió el pH. Después, la suspensión se filtró a través de un filtro C de fibra de vidrio en una placa de 96 pocillos. A continuación, el filtrado se diluyó en 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 las soluciones de muestra estándar, diluidas y sin diluir. La solubilidad se calculó usando las áreas de los picos determinadas mediante la integración del pico encontrado en el mismo tiempo de retención que el pico principal en la inyección estándar.

Tabla 14. Parámetros del método HPLC para mediciones de solubilidad

Tipo de método:	Fase inversa con elución en gradiente
Columna:	Phenomenex Luna, C18 (2) 5 μ m 50 X 4,6 mm
Temperatura de la columna (°C):	25

(Continuación)

5	Tipo de método:	Fase inversa con elución en gradiente		
	Inyecciones estándar (µl):	1,2, 3, 5, 7, 10		
10	Inyecciones de prueba (µl):	1,2, 3, 10, 20, 50		
	Detección:	260,80		
15	Longitud de onda, ancho de banda (nm):	2		
	Tasa de flujo (ml.min ⁻¹):	2		
20	Fase A:	TFA al 0,1% en agua		
	Fase B:	TFA al 0,085% en acetonitrilo		
25		0,0	95	5
		1,0	80	20
		2,3	5	95
		3,3	5	95
		3,5	95	5
		4,4	95	5

[0336] El análisis se realizó en las condiciones indicadas anteriormente en un sistema de la serie Agilent HP1100 equipado con un detector de matriz de diodos y utilizando el software ChemStation vB.02,01-SRI.

Tabla 15. Resultado de solubilidad acuosa para *R_P-4*, *4* y *S_P-4*.

ID muestra	pH de la mezcla sin filtrar	Solubilidad/mg.ml ⁻¹	Comentarios
<i>R_P-4</i>	7,12	1,58	Suspensión
<i>4</i>	7,03	6,11	Sólido residual
<i>S_P-4</i>	6,88	5,65	Sólido residual

Ejemplo de Referencia 28. Determinación de la pureza química por HPLC

[0337] Se pueden usar varias condiciones de HPLC para determinar la pureza química de los compuestos descritos en este documento. Un ejemplo de este tipo se describe anteriormente en relación con los estudios termodinámicos de solubilidad acuosa. Otro ejemplo se describe a continuación.

Condiciones de HPLC:

LC:	Módulo de separaciones Waters Alliance 2695, detector PDA Waters 2996 y Waters Empower 2 Software (versión 6.00)
Columna:	Phenomenex Luna C ₁₈ (2); 4,6 3 50 mm; 3 µM
Velocidad de flujo:	1,2 ml/min
Volumen de inyección:	10 µL
Fase móvil:	Disolvente A: 95% de agua con 5% de metanol y 10 mM
Acetato de amonio;	
pH ~ 5,3	
Gradiente:	Disolvente B: MeOH con acetato de amonio 10 mM:
	mantener en 0%B 3 min
	0-47%B 3-4 min
	mantener en 47%B 4-10 min
	47%-74%B 10-11 min
	mantener en 74%B 11-13,5 min
	volver a 0%B 13,5-13,6 min
	mantener en 0%B 13,6-15,5 min

[0338] En estas condiciones, la pureza de *4*, *R_P-4*, y *S_P-4* se determinó que era ~ 99,6, ~ 99%, y ~ 99,5%, respectivamente. Se observa que se pueden obtener purezas más altas optimizando los métodos descritos anteriormente.

[0339] La inspección de los difractogramas de XRPD muestra que los dos diastereoisómeros individuales cristalinos dieron patrones de XRPD claramente diferentes. Además, había una clara diferencia en el punto de fusión de los dos diastereoisómeros cristalinos, teniendo *R_P-4* un inicio considerablemente más alto que *S_P-4* (136°C frente a 94°C).

Ejemplo de Referencia 29. Métodos de separación adicionales

[0340] La siguiente separación SFC (condiciones enumeradas a continuación) produjo una 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 N° 07-8656	Chiralpak AS-H (25 X 0,46 cm)
20% metanol/CO ₂ (100 bar)	20% metanol/CO ₂ (100 bar)
50 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
Conc.: 260 mg/30 ml de metanol, vol. iny.: 1,5 ml	

[0341] La siguiente separación SFC (condiciones listadas a continuación) produjo una separación adecuada de una mezcla de los diastereómeros, *R_P-4* y *S_P-4*.

Método preparativo:	Método analítico:
Chiralpak IA (2 X 15 cm) 802091	Chiralpak IA (15X 0,46 cm)
30% de isopropanol (0,1% DEA)/CO ₂ , 100 bar	40% metanol (DEA)/CO ₂ , 100 bar
60 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
vol. iny.: 2 mL, 20 mg/mL de metanol	

Tabla 16. Resumen de los resultados de la caracterización de lotes de *R_P-4*, 4 y *S_P-4*.

Análisis	<i>R_P-4</i>	4	<i>S_P-4</i>
Proton RMN	Diaestereoisómero único	1:1 Mezcla de diastereoisómeros	Diaestereoisómero único
XRPD	Cristalino –diferente de <i>S_P-4</i>	Amorfo	Cristalino – diferente de <i>R_P-4</i>
DSC	Endotermo; fusión - 136°C	Endotermia; 59°C	Endotermia; fundido - 94°C
TGA	Sin pérdida de peso, descomposición >240°C	Sin pérdida de peso, descomposición >240°C	Sin pérdida de peso, descomposición >240°C
IR	Ver arriba	Ver arriba	Ver arriba
Solubilidad Ac (mg.ml ⁻¹)	1,58	6,11	5,65
Pureza HPLC	96,9%	99,6%	99,5%
40°C/75% de HR	Sin cambio de forma	Delicuescencia dentro de 1,5 h	Delicuescencia dentro de 4,5 h
25°C/53% de HR	-	Delicuescencia	Sin cambio de forma
GVS	No higroscópico hasta 90% de HR	-	No higroscópico hasta 60% de HR

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

[0342] El compuesto **8** (isómero *S_P*), C₁₈H₂₁N₂PO₇, cristaliza en el grupo espacial monoclinico P2₁ (ausencias sistemáticas 0k0: k=impar) 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 empleando radiación de Mo-K_α monocromática con grafito (λ = 0,71073 Å) a una temperatura de 100(1)K. Las Figuras 20A y 20B muestran las moléculas numeradas 1 y 2, respectivamente, de la unidad asimétrica.

[0343] La indexación preliminar se llevó a cabo a partir de una serie de treinta y seis marcos de 0,5° de rotación con exposiciones de 30 segundos. Se recogieron un total de 3608 fotogramas con una distancia entre el cristal y el detector de 70,00 mm, anchos de rotación de 0,5° y exposiciones de 20 segundos:

tipo de escaneo	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

[0344] Marcos de rotación se integraron usando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin,

EE. UU.) produciendo una lista de valores F_2 y $\sigma(F^2)$ no promediados que luego se pasaron al paquete de programa SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EE. UU.) para su posterior procesamiento y solución de estructura en una computadora Dell Pentium 4. Se midieron un total de 6909 reflexiones en los rangos $1,58 \leq \theta \leq 25,09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$ produciendo 6909 reflexiones únicas ($R_{\text{int}} = 0,0581$). Los datos de intensidad se corrigieron para Lorentz y efectos de polarización y para absorción usando SADABS (Sheldrick, GM (2007) SADABS. Universidad de Göttingen, Alemania.) (Transmisión mínima y máxima 0,6093, 0,7452).

[0345] La estructura se resolvió por métodos directos (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64, 112-122.)). El refinamiento se realizó 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 utilizaron durante el refinamiento. El esquema de ponderación 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 son de hidrógeno se refinaron de forma anisotrópica y los átomos de hidrógeno se refinaron utilizando un modelo de conducción. El refinamiento 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 distintas de cero y 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 = el número de reflexiones y p = el número de parámetros refinados). El máximo Δ/σ en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0,000 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0,402 y -0,559 e/Å³. Las figuras 20A y 20B son ORTEP (elipsoides térmicos de 30% de probabilidad) 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)

Formula empírica	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ PO ₇
Peso de la fórmula	408,34
Temperatura	100(1) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Constantes de célula:	
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 de absorción	0,185 mm ⁻¹
F(000)	856
Tamaño de cristal	0,40 X 0,10 X 0,08 mm ³
Rango theta para la recopilación de datos	1,58 a 25,09°
Formula empírica	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ PO ₇
Rangos de índice	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
Reflexiones recogidas	6909
Reflexiones independientes	6909 [R (int) = 0,0581]
Compleción a theta = 25.09°	99,6%
Corrección de absorción	Semi-empírico de equivalentes
Transmisión max. y min.	0,7452 y 0,6093
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F ²
Datos/restricciones/parámetros	6909 / 1 / 512
Bondad de 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 pico y agujero	0,402 y -0,559 e.Å ⁻³

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

[0346] (S)-isopropil 2-(((S)-perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)-amino)propanoato, C₁₈H₁₇NPO₅F₅, cristaliza en el grupo espacial triclínico P1 con $a = 5,2641(6)$ Å, $b = 12,0548(13)$ Å, $c = 16,4307(15)$ Å, $\alpha = 74,960(4)^\circ$, $\beta = 83,959(4)^\circ$, $\gamma = 80,275(4)^\circ$, $V = 990,40(18)$ Å³, $Z = 2$, y $d_{\text{calc}} = 1,520$ g/cm³. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron en un detector de área Bruker APEXII CCD empleando radiación Mo-K α monocromática con grafito ($\lambda = 0,71073$ Å) a una temperatura de 143(1)K. La indexación preliminar se realizó a partir de una serie de treinta y seis fotogramas de

rotación de 0,5°C on exposiciones de 20 segundos. Se recogieron un total de 3593 fotogramas con una distancia entre el cristal y el detector de 37,600 mm, anchos de rotación de 0,5° y exposiciones de 20 segundos:

tipo de escaneo	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

[0347] Los fotogramas de rotación se integraron utilizando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EE. UU.), Produciendo una lista de valores $F_2y\sigma(F^2)$ no promediados que luego se pasaron al paquete de programa SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EE. UU.) para más solución de procesamiento y estructura en una computadora Dell Pentium 4. Se midieron un total de 17880 reflexiones en los rangos $1,77 \leq \theta \leq 25,12^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-14 \leq k \leq 14$, $-19 \leq l \leq 19$ produciendo 6897 reflexiones únicas ($R_{int} = 0,0212$). Los datos de intensidad se corrigieron por Lorentz y efectos de polarización y por absorción usando SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. Universidad de Gottingen, Alemania.) (Transmisión mínima y máxima 0,6887, 0,7452).

[0348] La estructura se resolvió por métodos directos (SHELXS-97 (Sheldrick, GM (2008) Acta Cryst. A64,112-122.)). El refinamiento se realizó 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 utilizaron durante el refinamiento. El esquema de ponderación 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 son de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se refinaron utilizando un modelo de conducción. El refinamiento convergió a $R1 = 0,0259$ y $wR2 = 0,0609$ para 6527 reflexiones observadas para los cuales $F > 4\sigma(F)$ y $R1 = 0,0284$ y $wR2 = 0,0621$ y $GOF = 1,040$ para todos los 6897 reflexiones únicas distintas de cero y 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 = el número de reflexiones y p = el número de parámetros refinados.) El Δ/σ máximo en el ciclo final de mínimos cuadrados fue 0,001 y los dos picos más prominentes en la diferencia final de Fourier fueron +0,254 y -0,236 e/Å³. **Figs. 22A y 22B** son ORTEP (elipsoides térmicos de 30% de probabilidad) de las moléculas 1 y 2 de la unidad asimétrica.

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

Formula empírica	C ₁₈ H ₁₇ NPO ₅ F ₅
Peso de la fórmula	453,30
Temperatura	143(1) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	triclínico
Grupo espacial	P1
Constantes de célula:	
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)°
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
Rango theta para la recopilación de datos	1,77 a 25,12°
Rangos 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%

(Continuación)

Corrección de absorción	Semi-empírico de equivalentes
Transmisión max. y min.	0,7452 y 0,6887
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F^2
Datos/restricciones/parámetros	6897 / 3 / 548
Bondad de ajuste en F^2	1,040
Índices R finales [$I > 2\sigma$ (I)]	$R1 = 0,0259$, $wR2 = 0,0609$
Índices R (todos los datos)	$R1 = 0,0284$, $wR2 = 0,0621$
Parámetro de estructura absoluta	-0,01 (5)
Mayor diferencia pico y agujero	0,254 y -0,236 e.Å ⁻³

Ejemplo 33. Actividad biológica

[0349] Se sembraron células que contenían replicón a 3,000 células/pocillo (50 μ L) en placas blancas/opacas de 96 pocillos, o 1,500 células/pocillo (25 μ L) en placas blancas/opacas de 384 pocillos. Se añadieron 50 μ L de compuesto 2X en la placa de 96 pocillos o se añadieron 25 μ L de compuesto 2X en la placa de 384 pocillos. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ atmósfera durante 4 días. Después de la incubación, se añadió reactivo Bright-Glo (50 ml para placa de 96 pocillos o 25 μ L para placa de 384 pocillos) para medir el indicador de luciferasa de luciérnaga para la replicación del HCV. Se calculó el porcentaje de inhibición frente al control sin drogas.

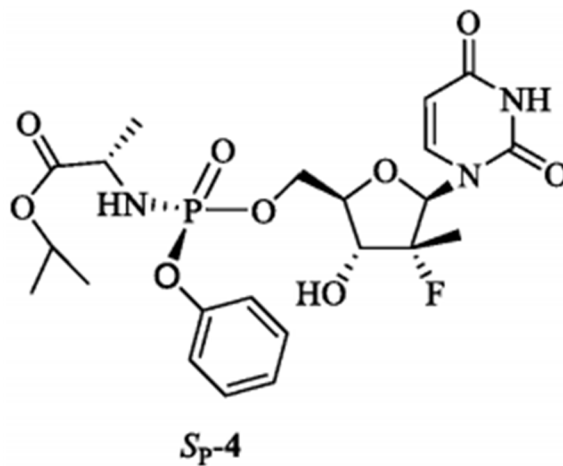
Compuesto	Actividad replicón HCV (μ M)
4	0,58
<i>R_P</i> -4	2,87
<i>S_P</i> -4	0,13

[0350] Se ha demostrado que *R_P*-4 y *S_P*-4 tienen cobertura de genotipo amplio. Por ejemplo, se ha demostrado que ambos son activos contra el virus de la hepatitis C, genotipos 1-4.

REIVINDICACIONES

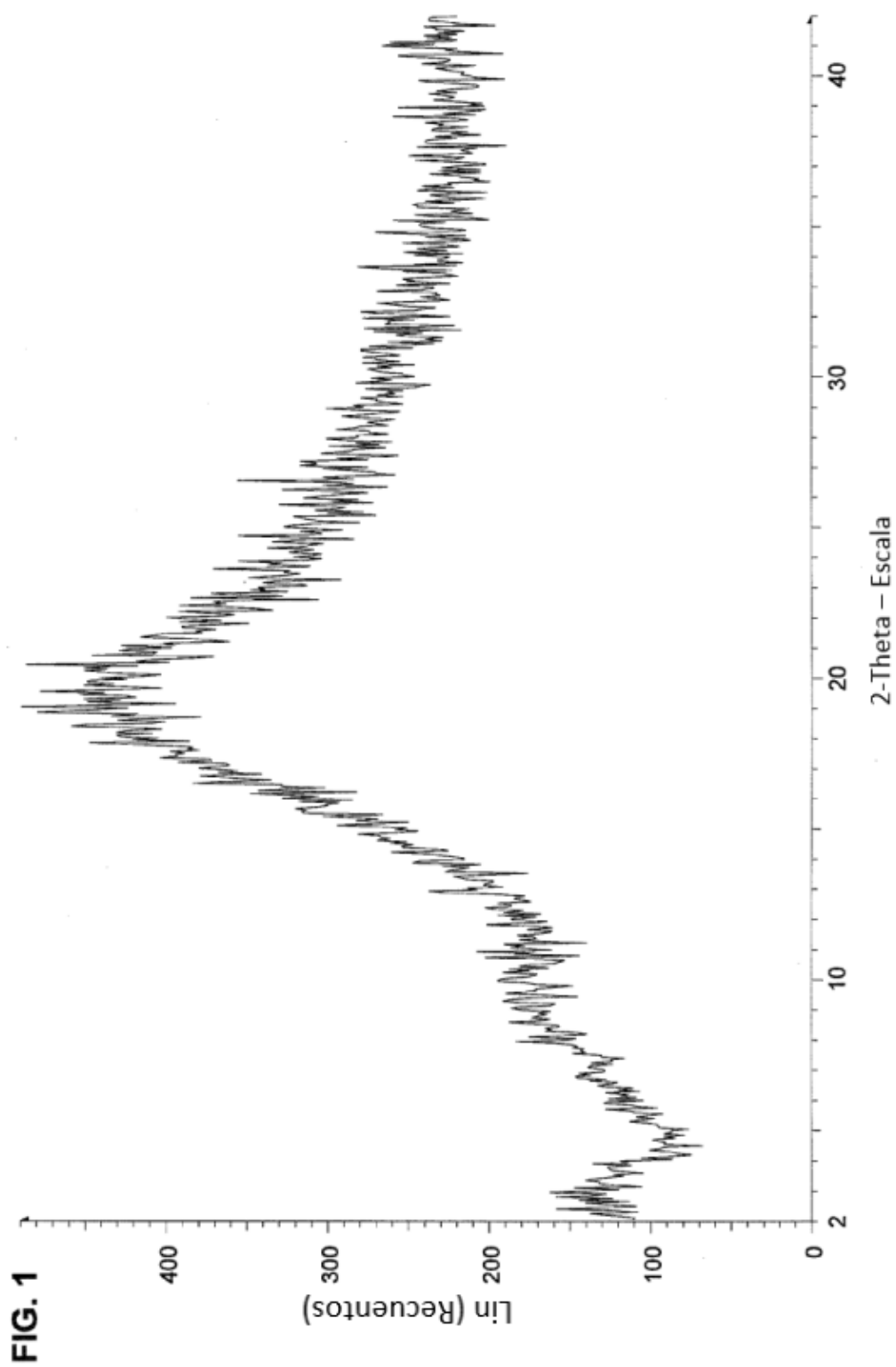
1. Un comprimido que comprende (S)-isopropilo 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H))-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato cristalino representado por la

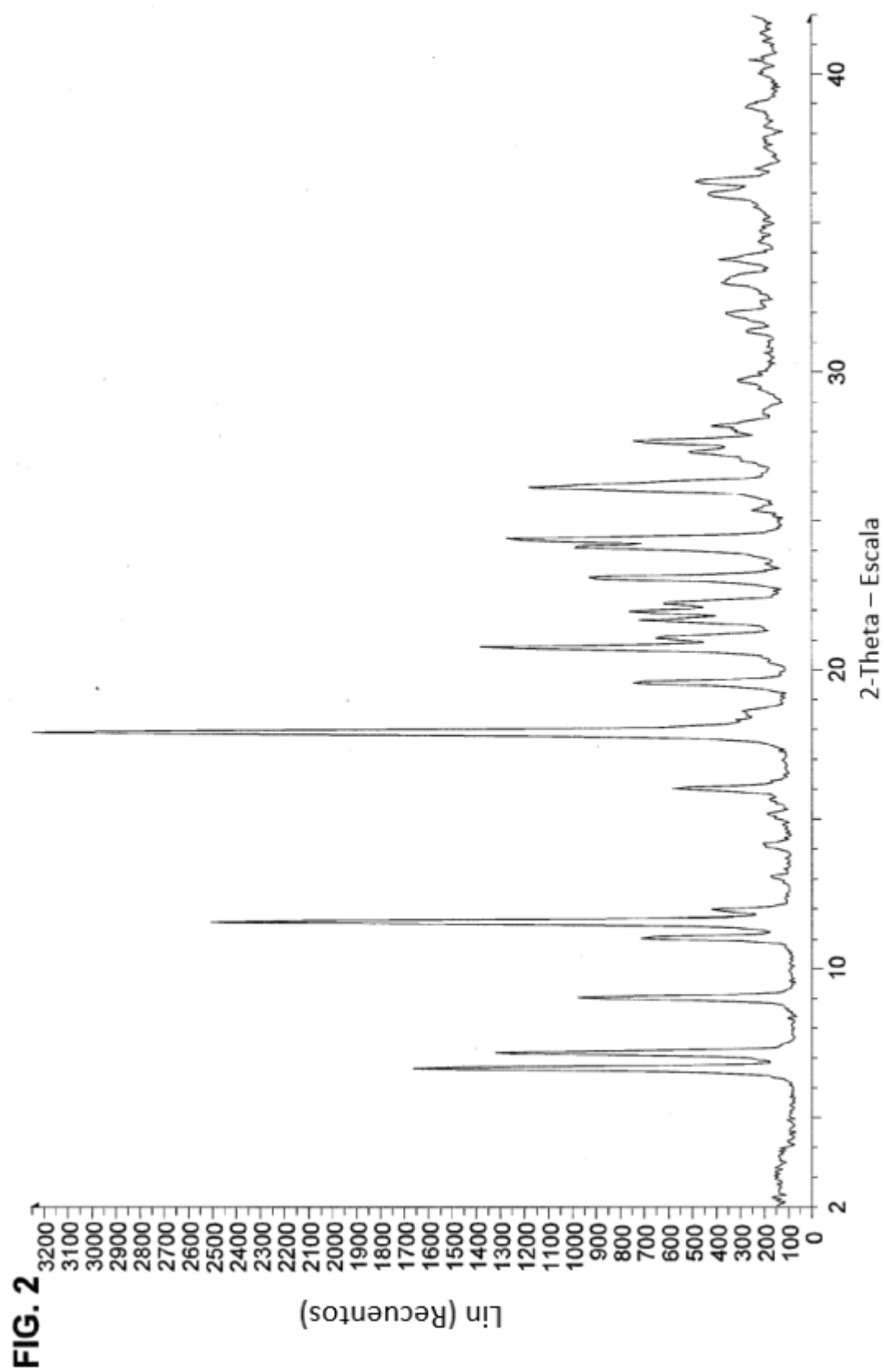
Fórmula Sp-4:

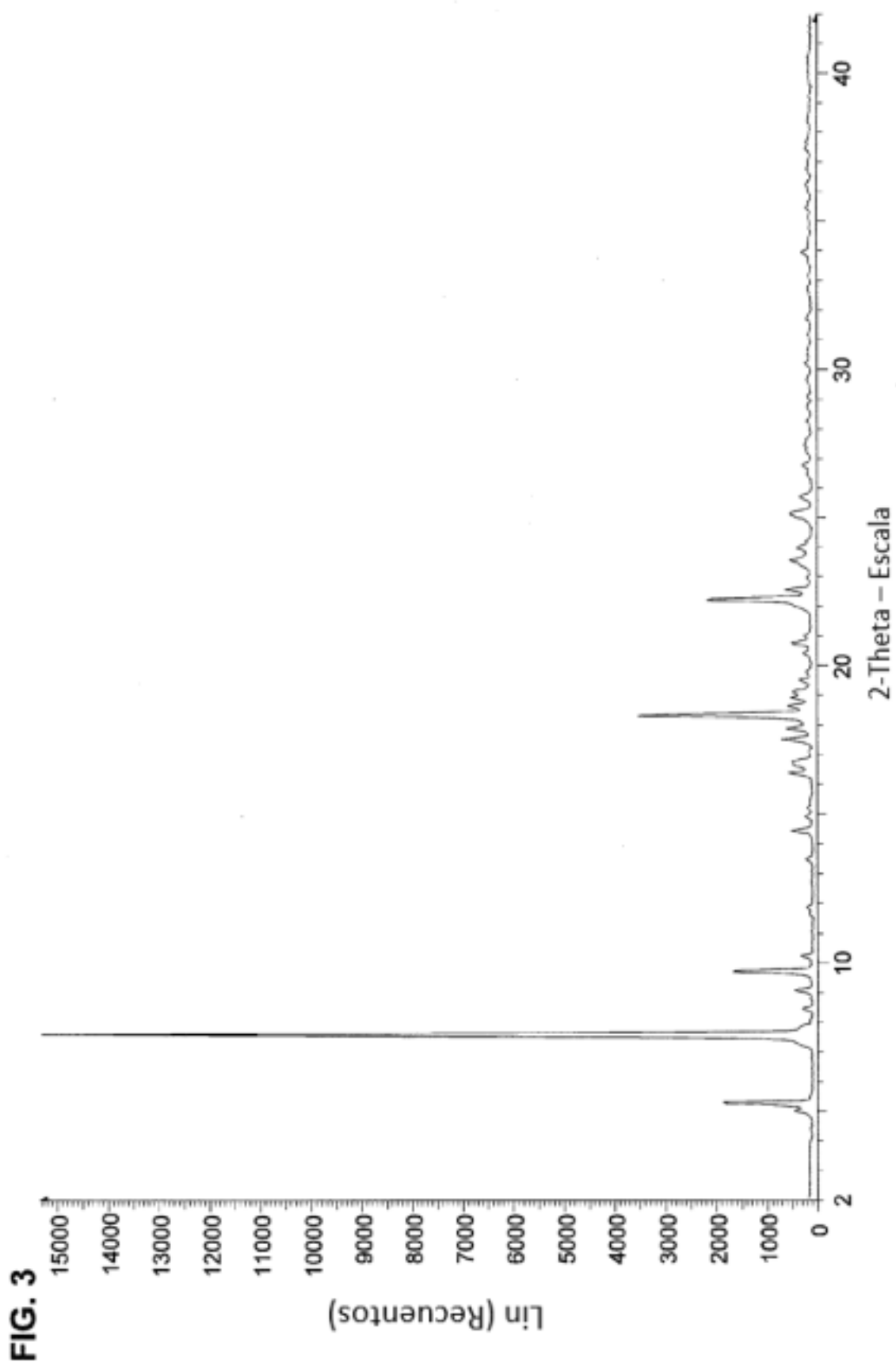


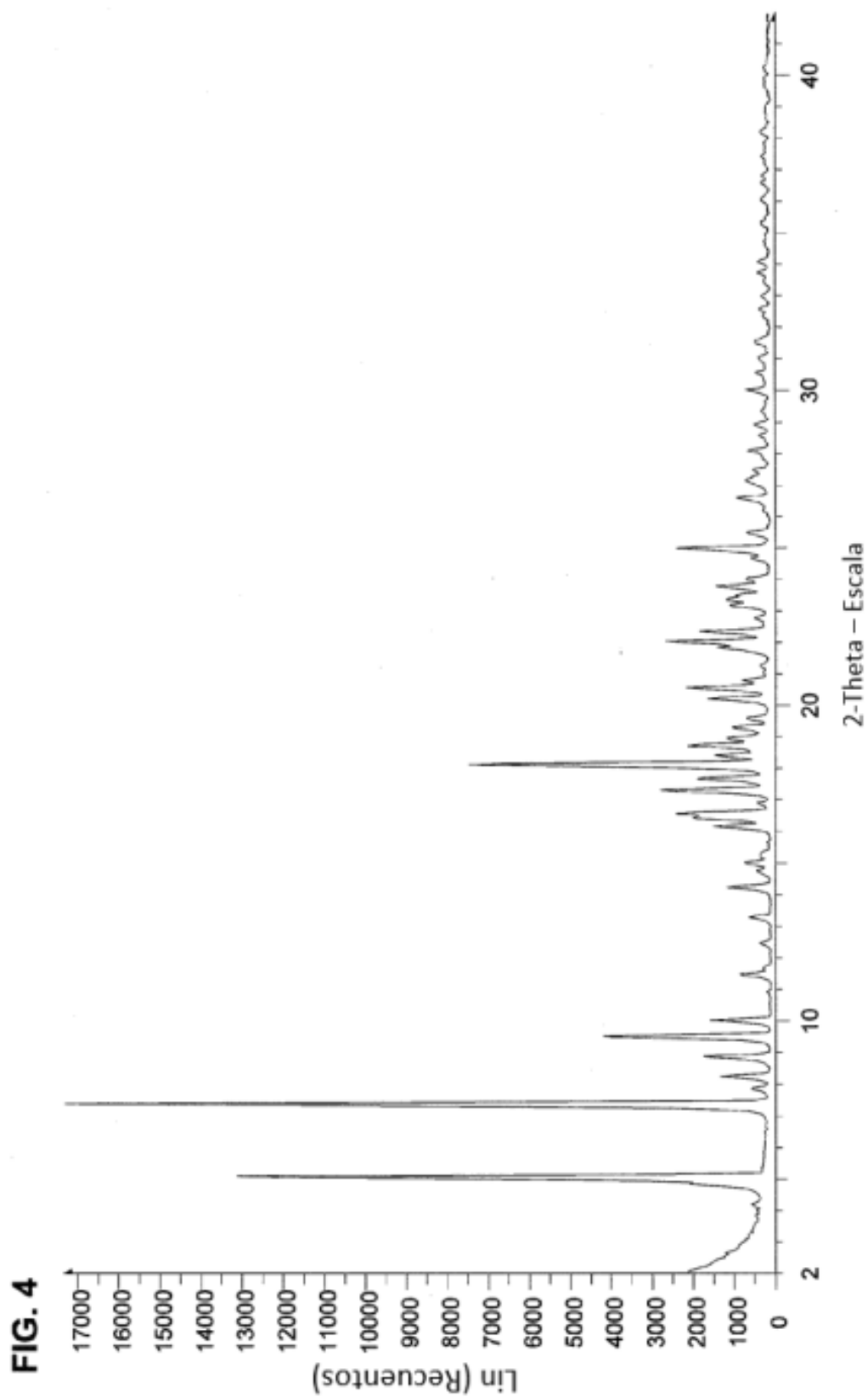
que tiene reflexiones XRPD 2θ ($\pm 0,2^\circ$) en 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8 y 23,3.

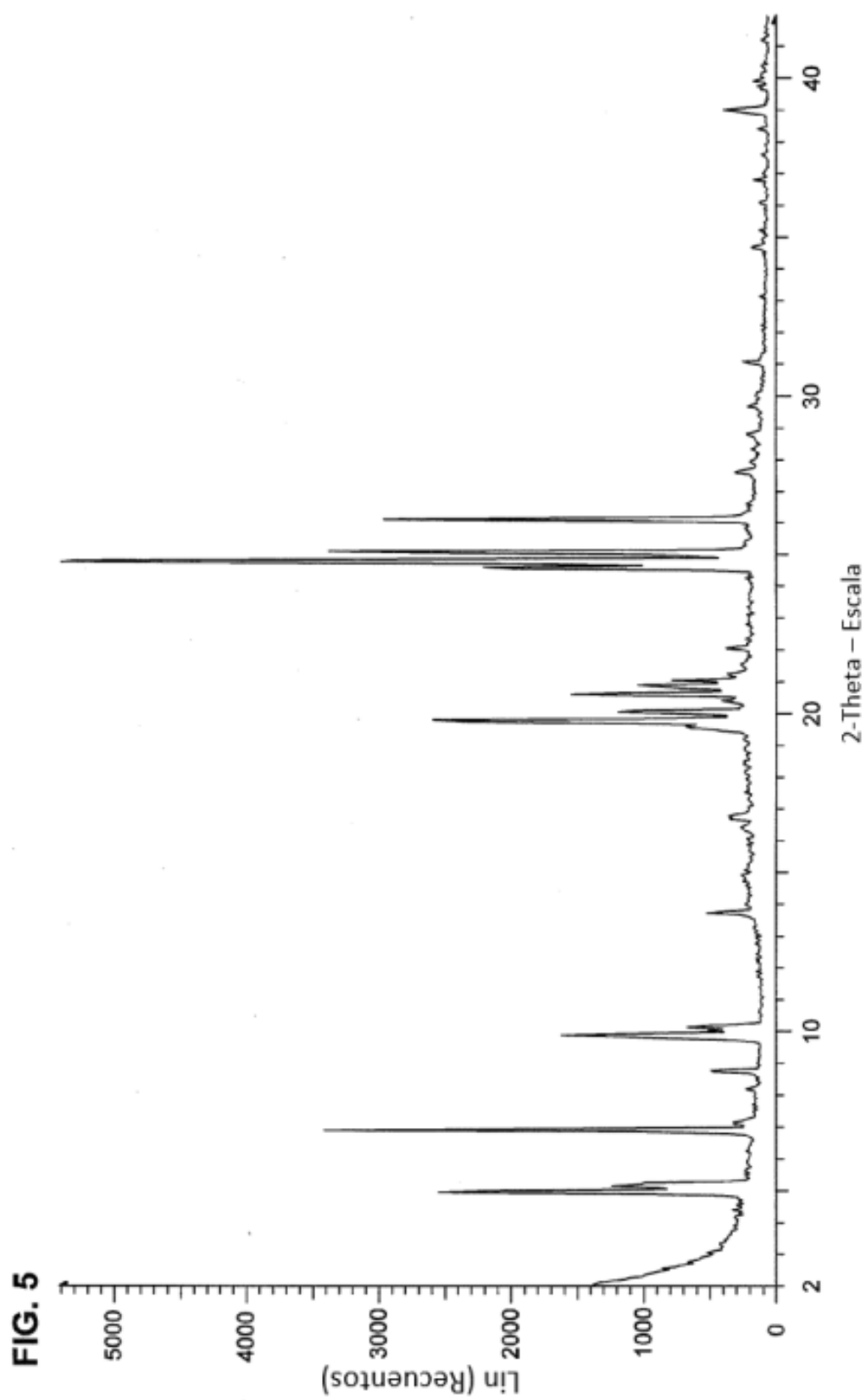
2. Un comprimido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C.

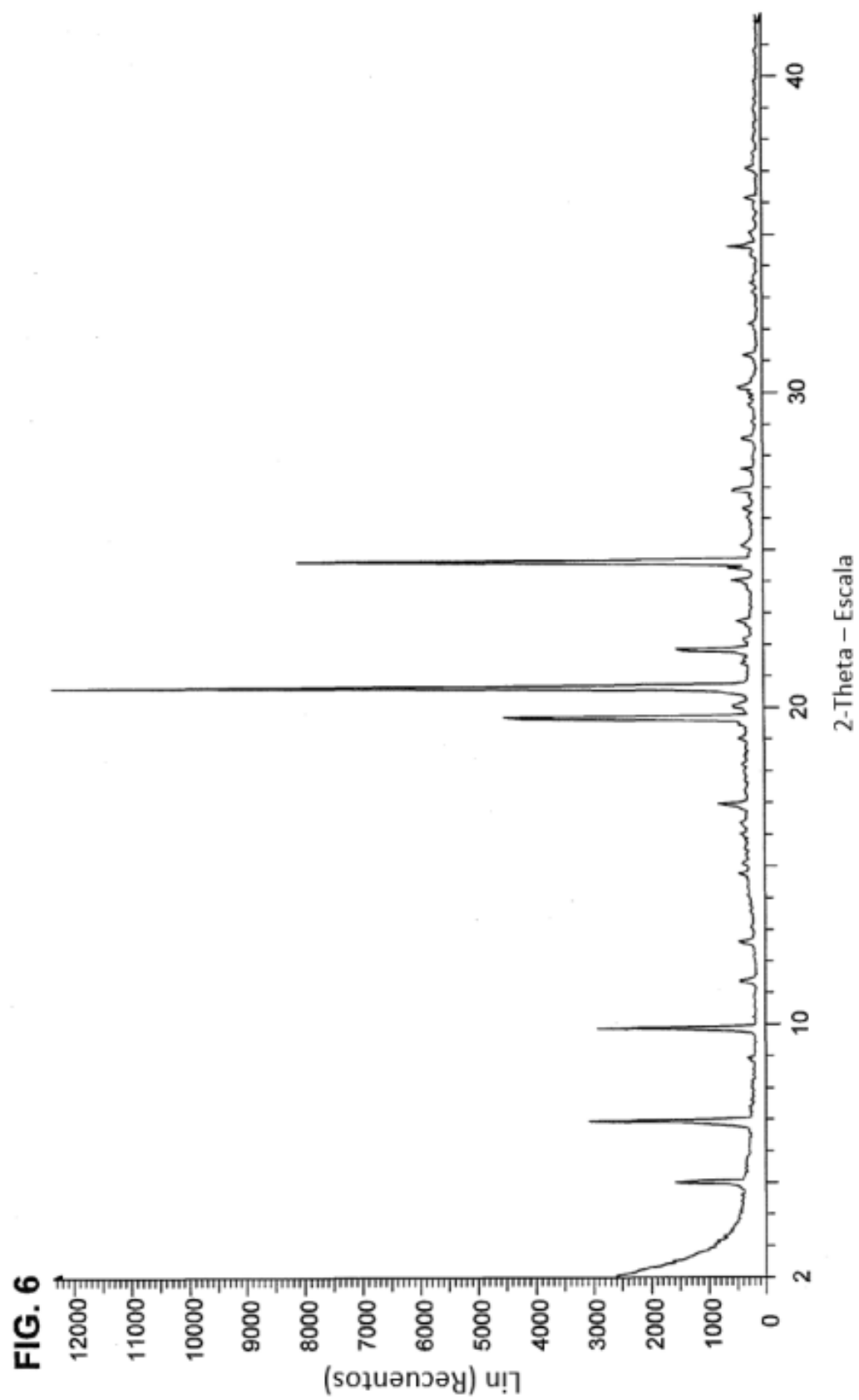


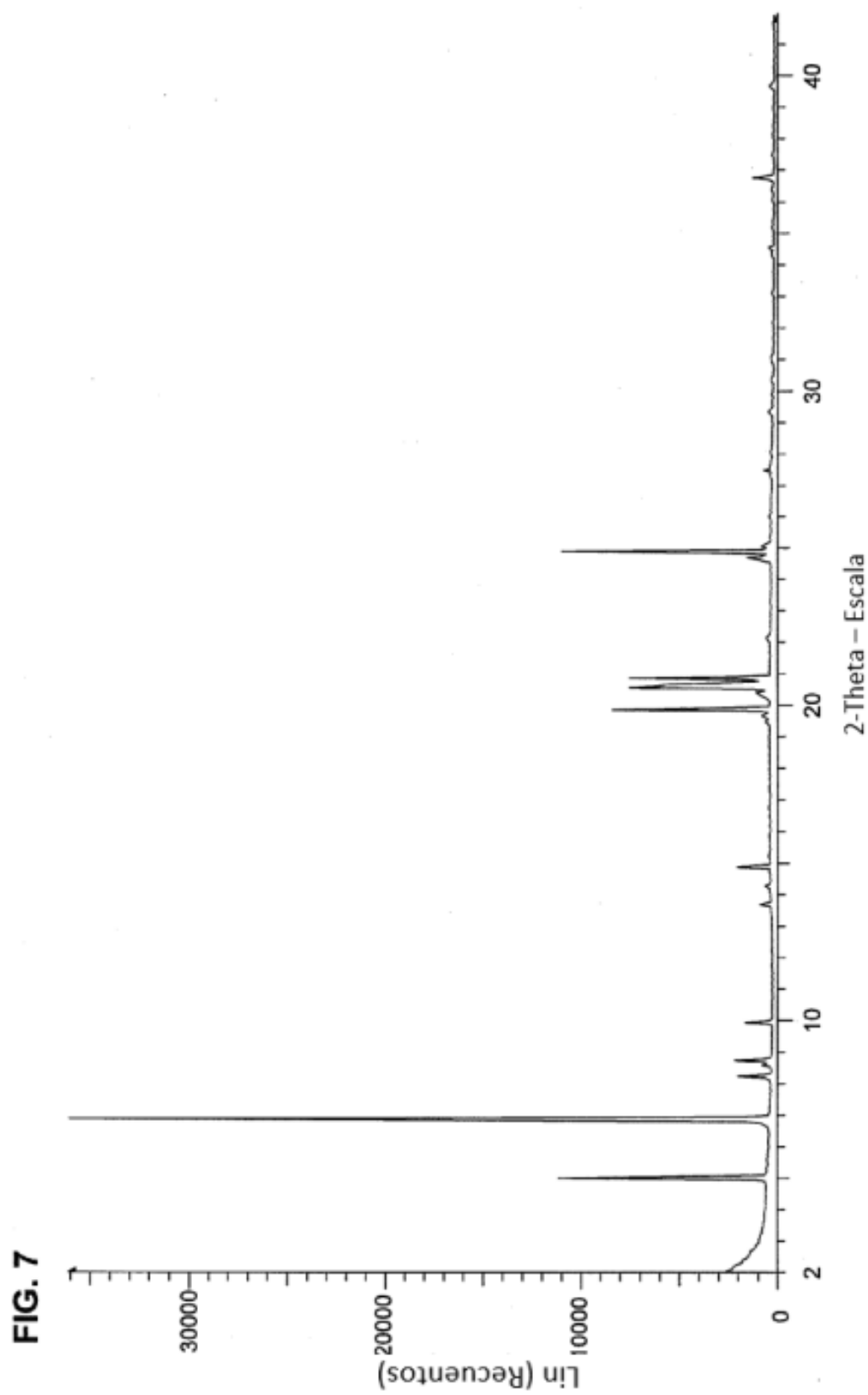












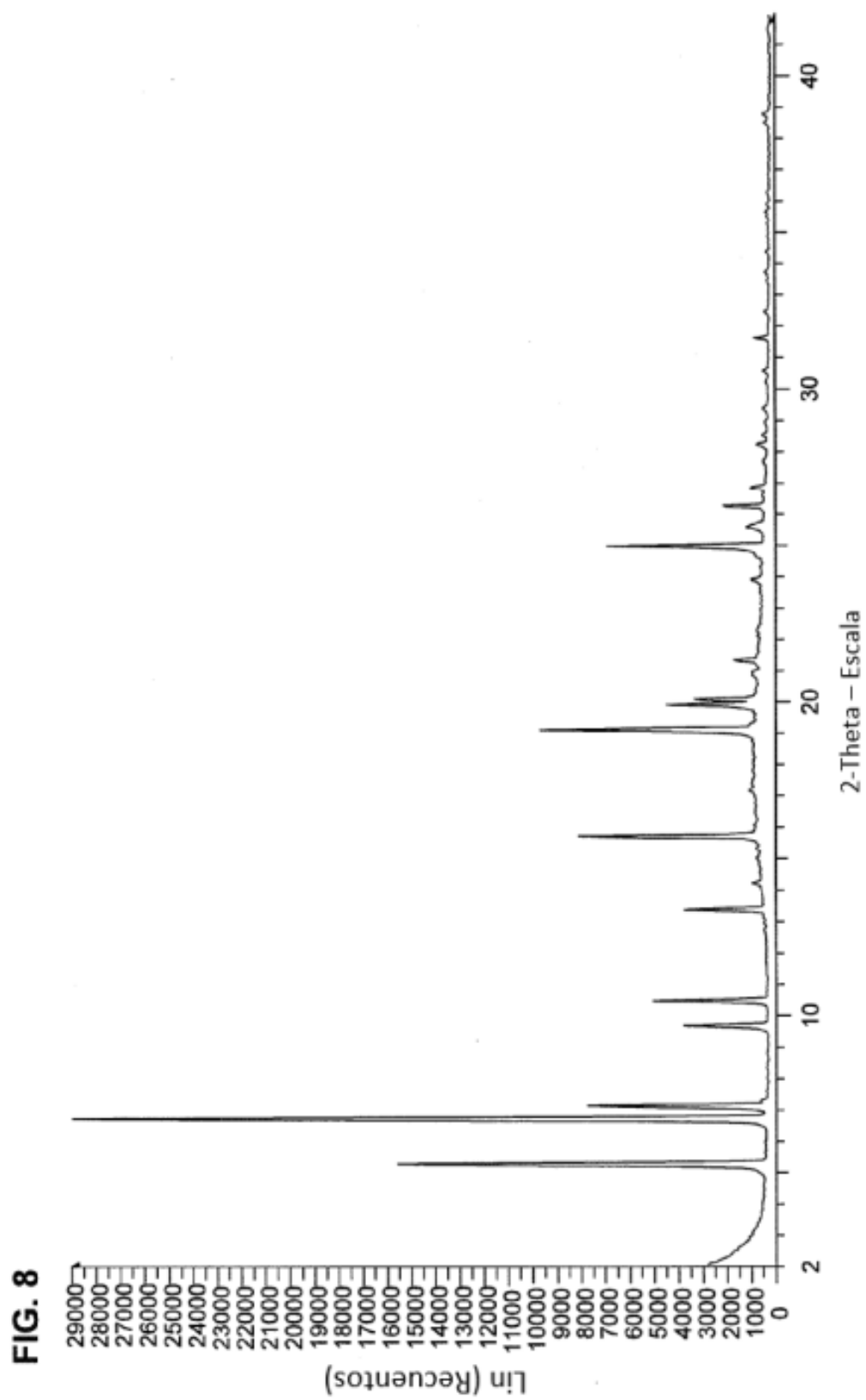
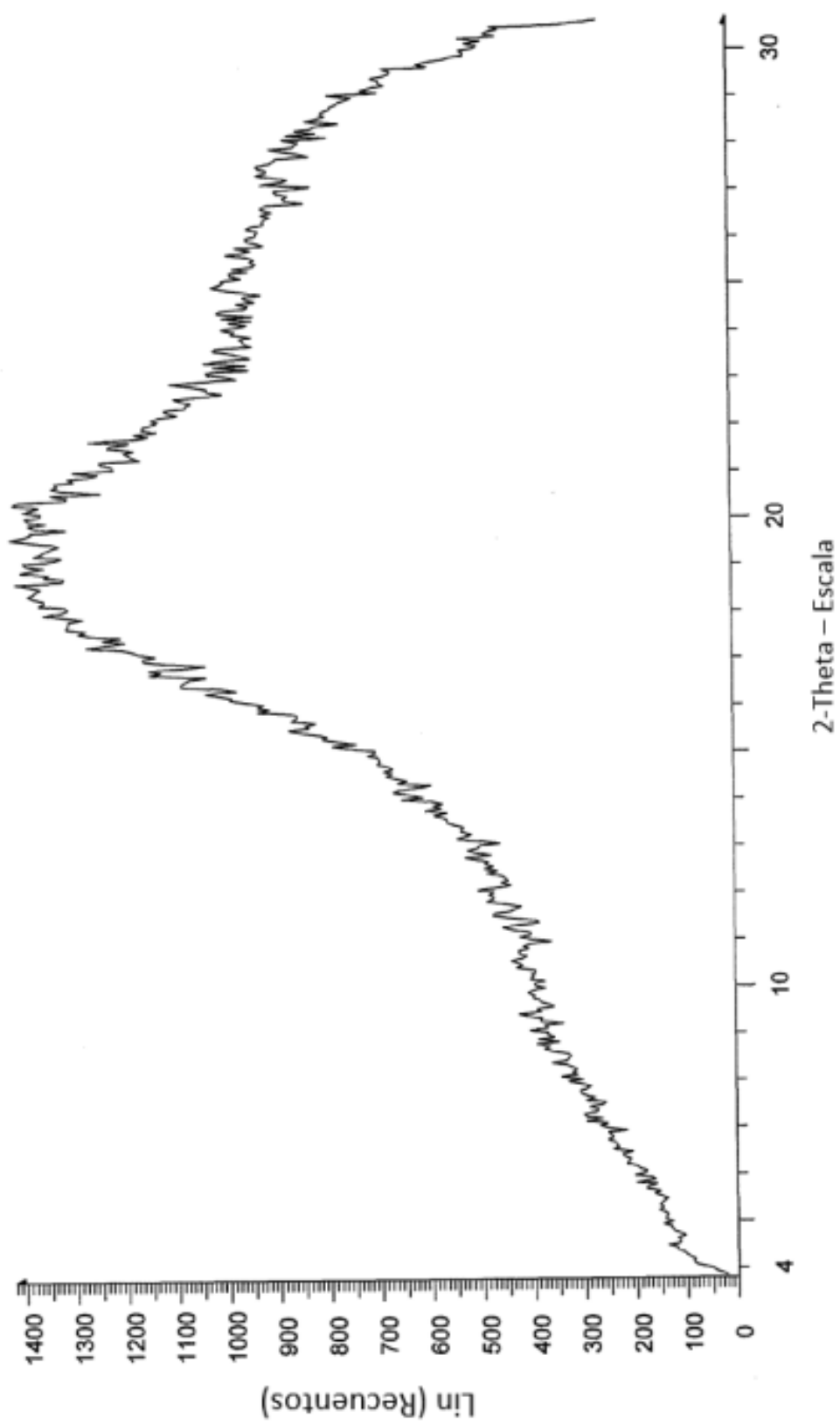


FIG. 9



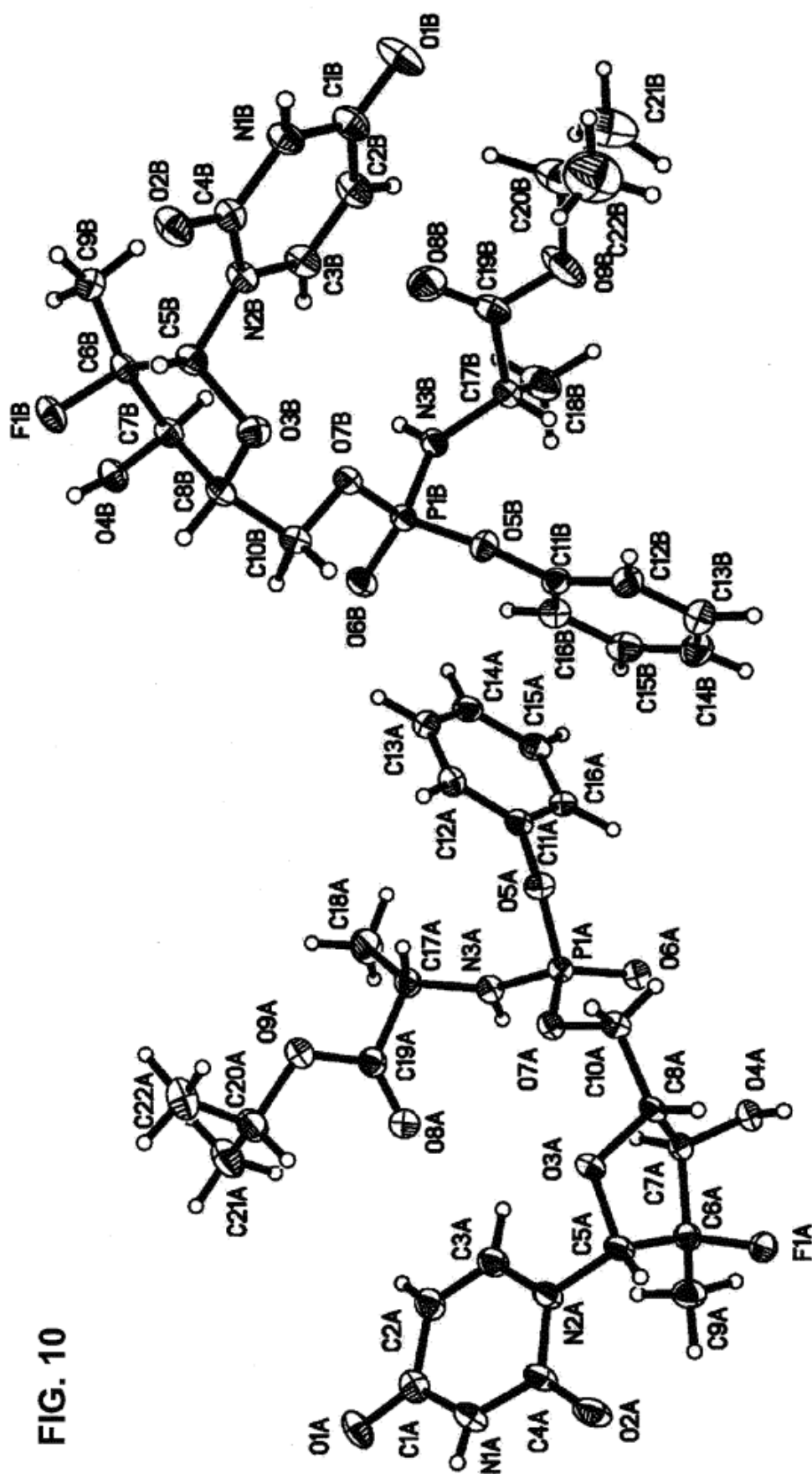
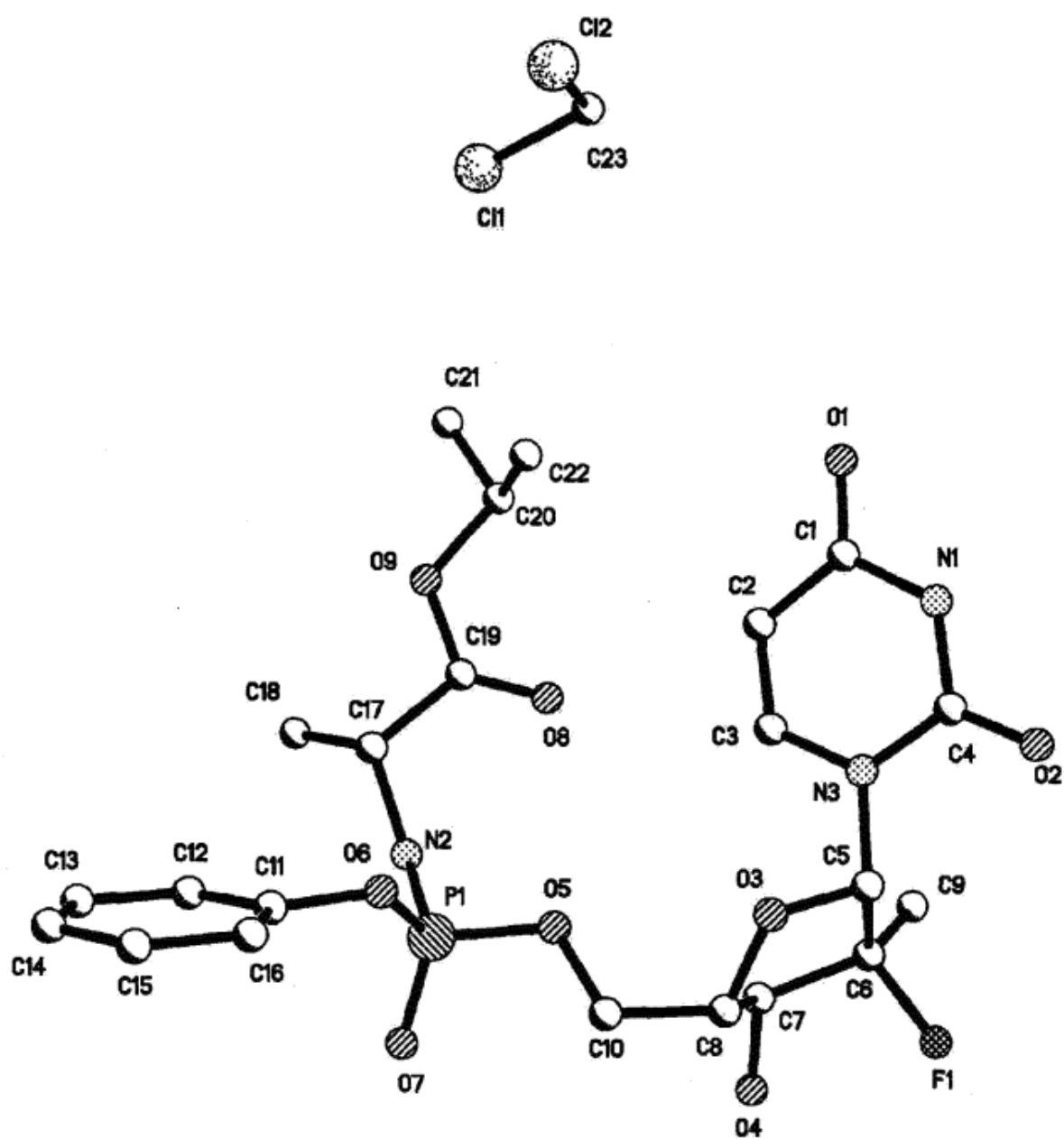


FIG. 10

FIG. 11



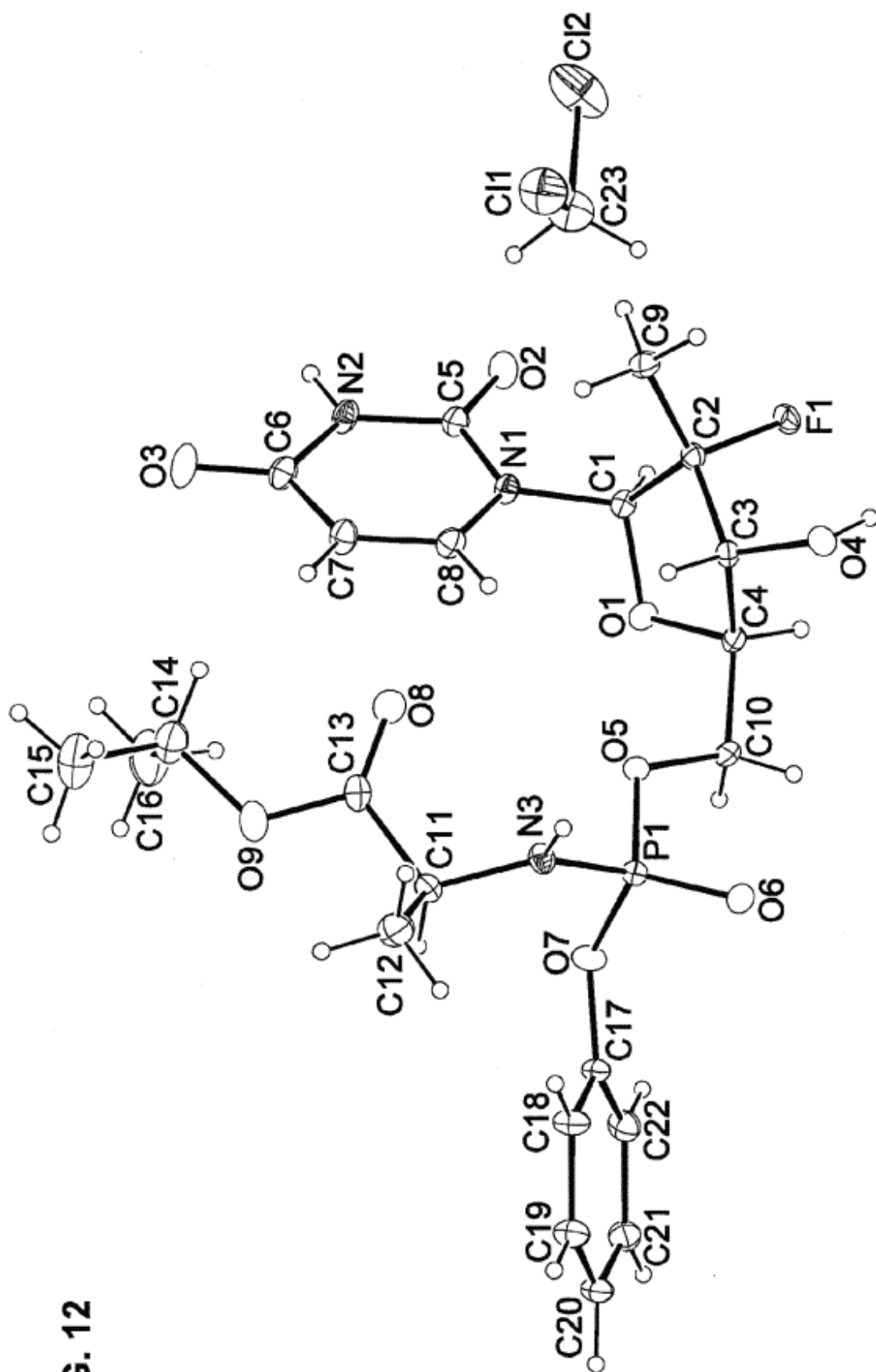


FIG. 12

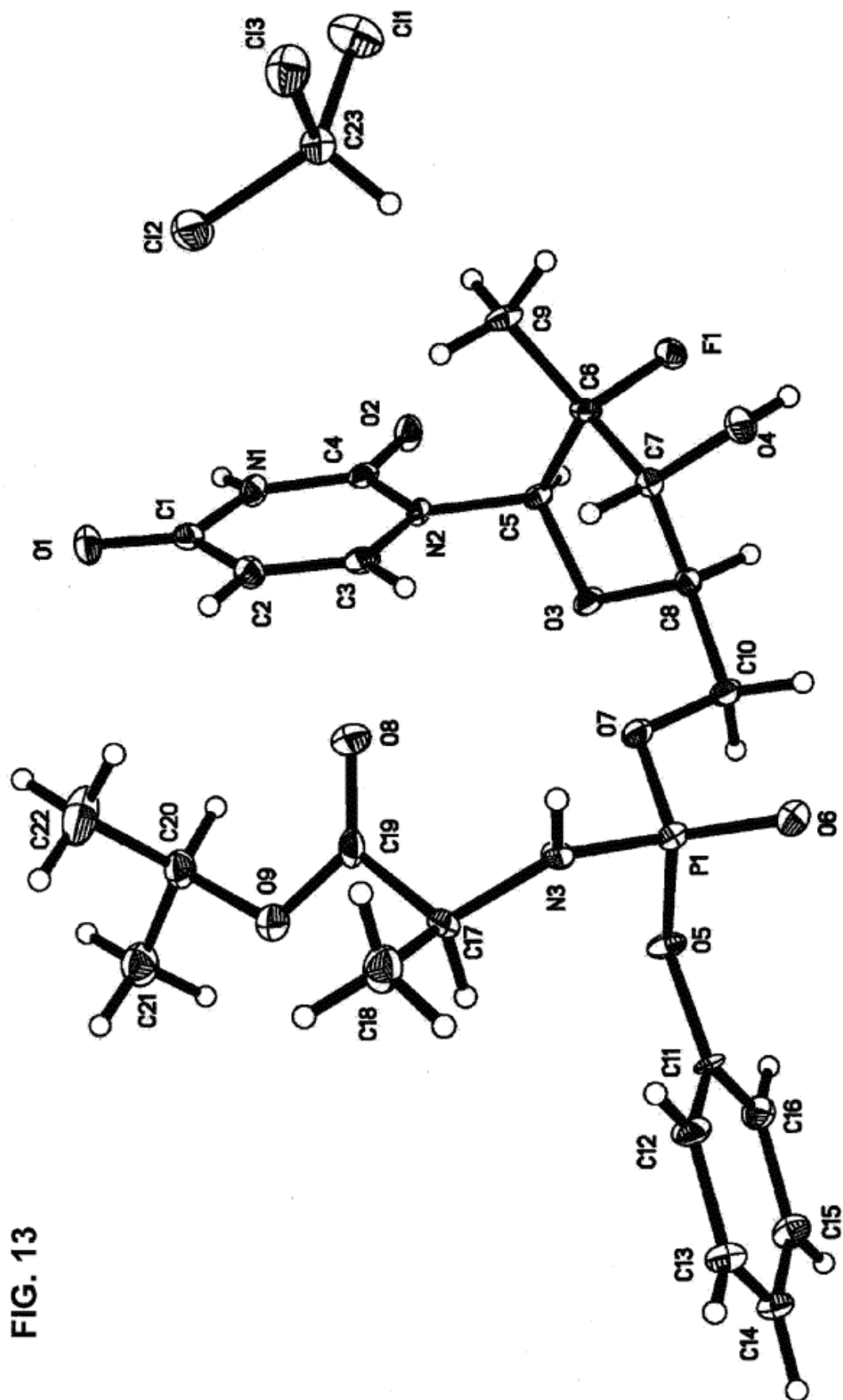


FIG. 13

FIG. 14

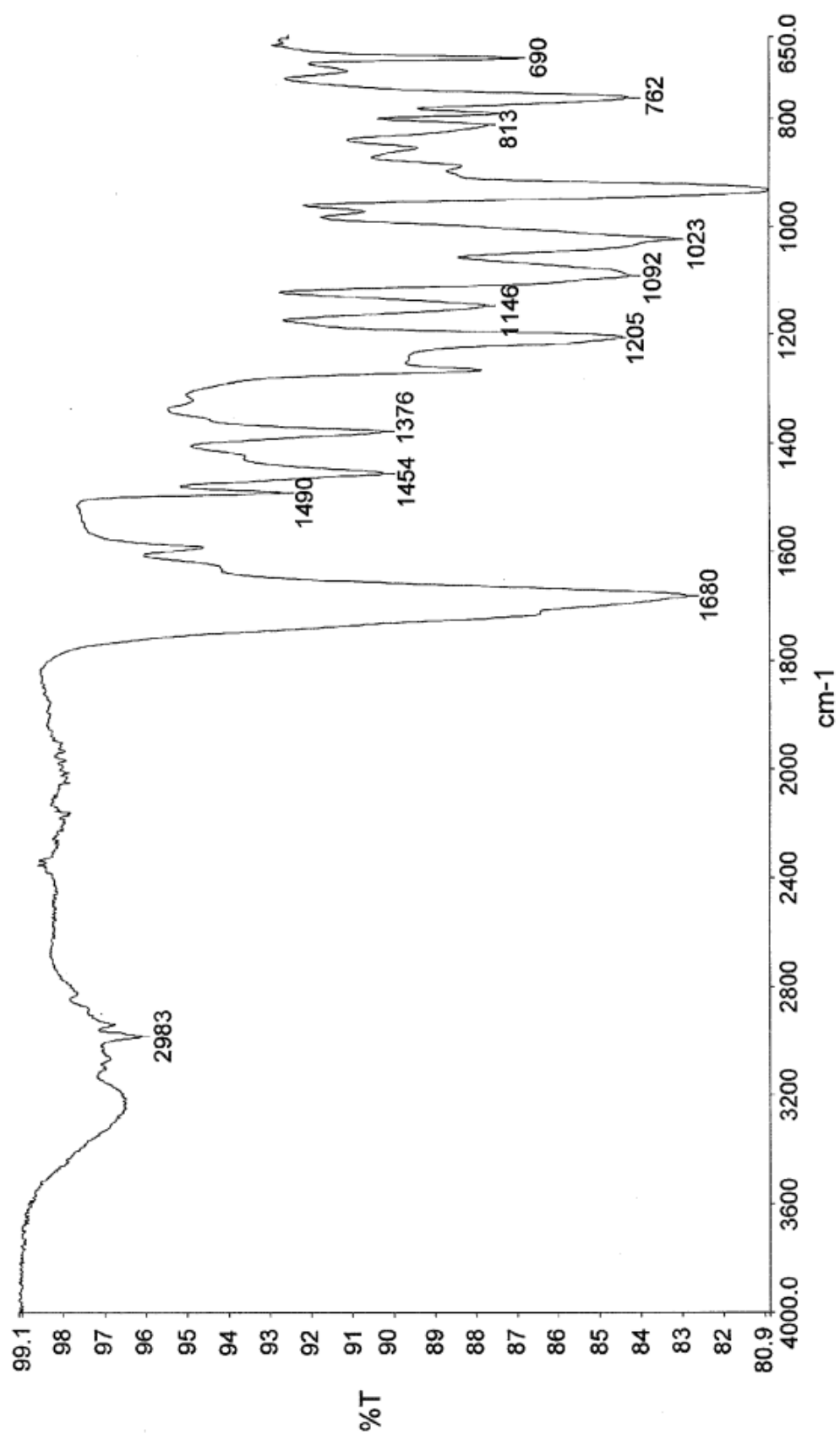


FIG. 15

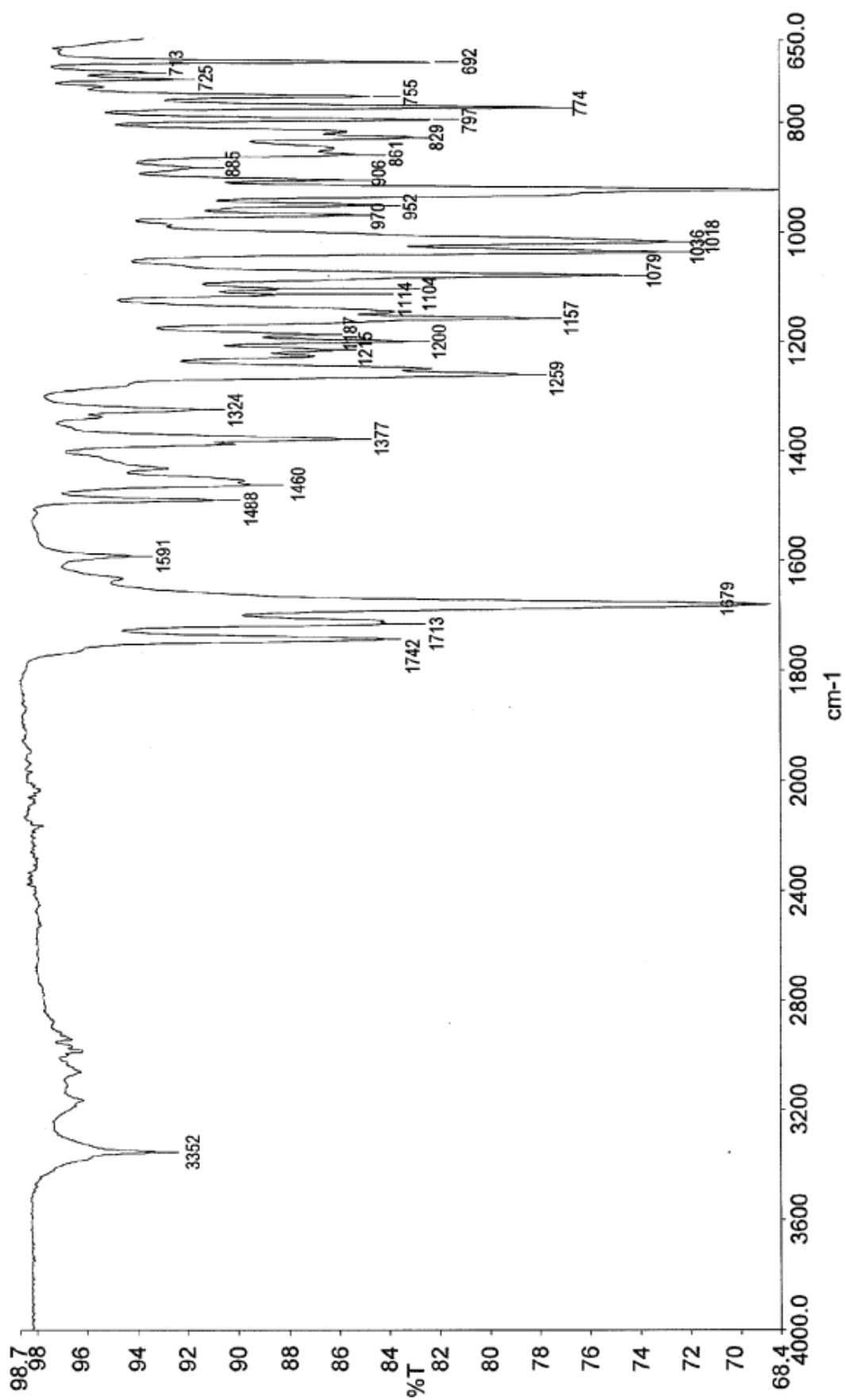


FIG. 16

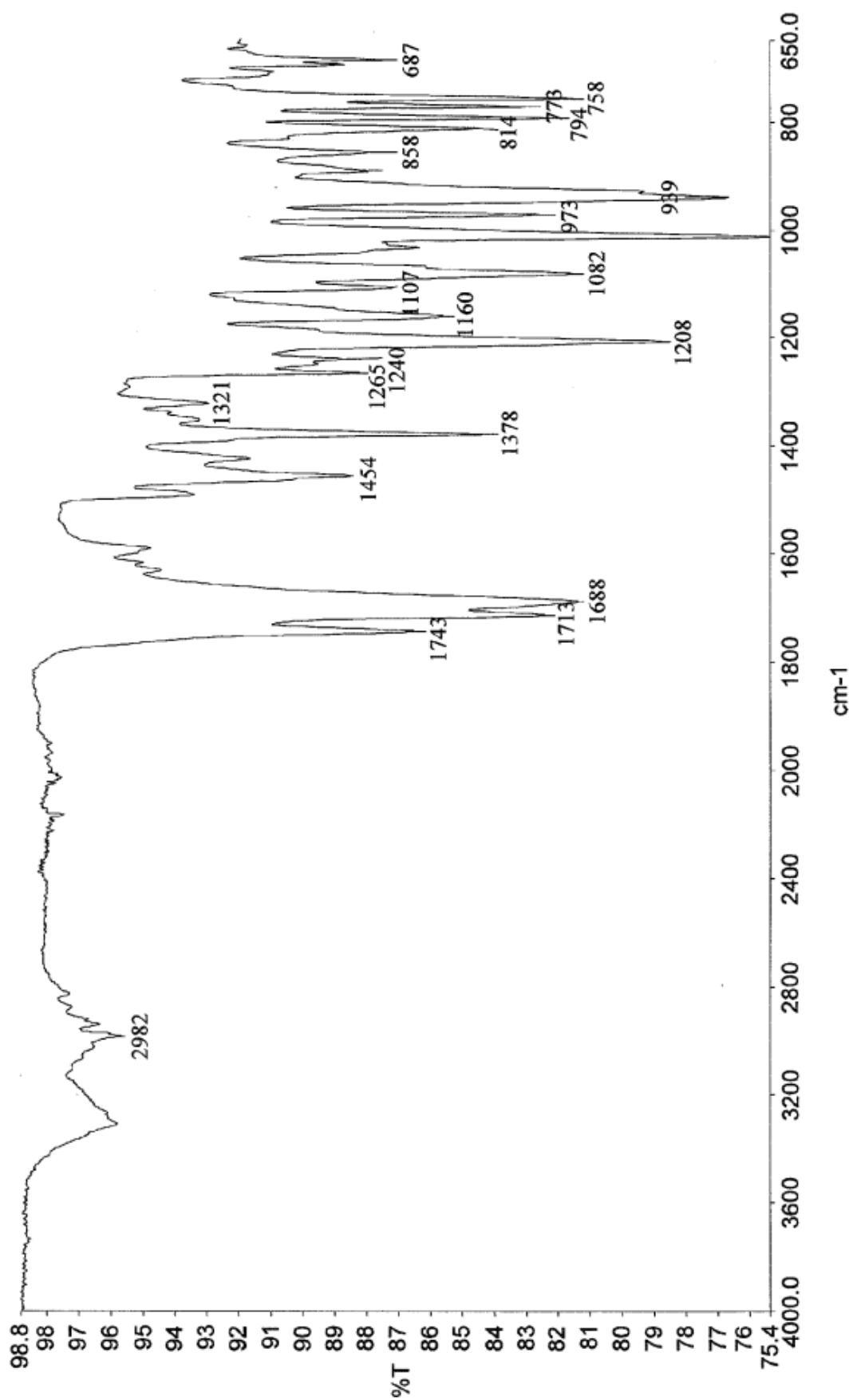


FIG. 17

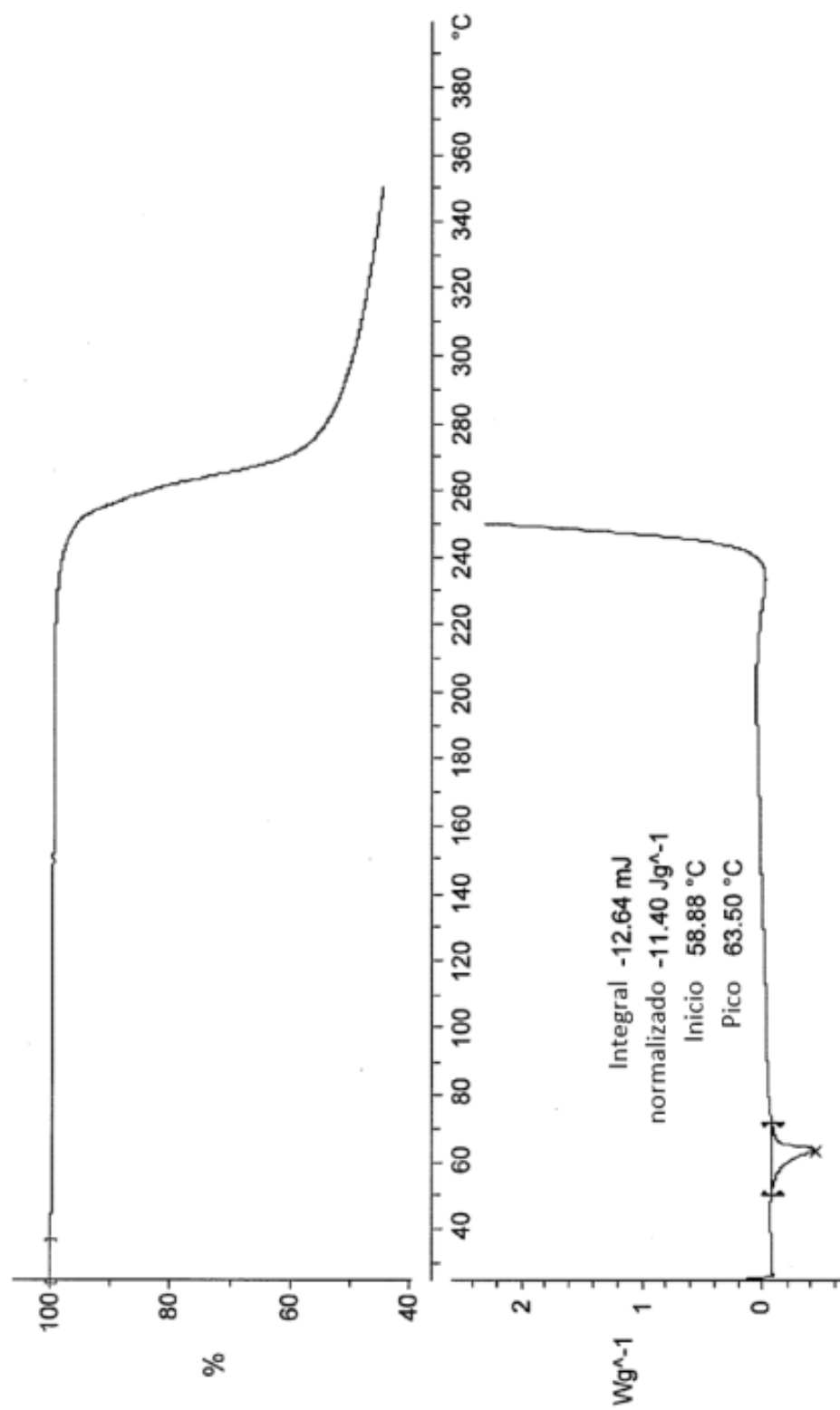


FIG.18

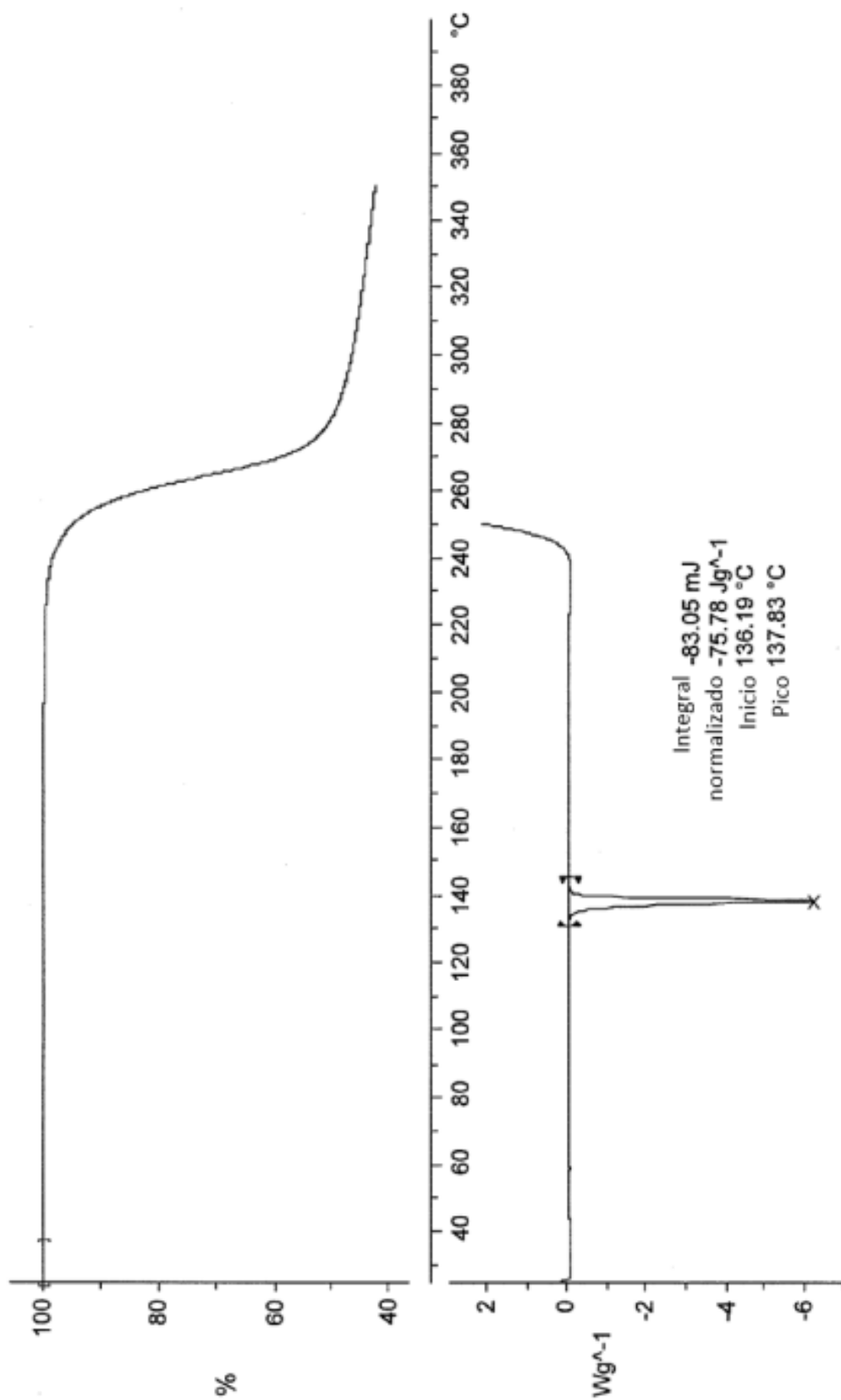


FIG. 19

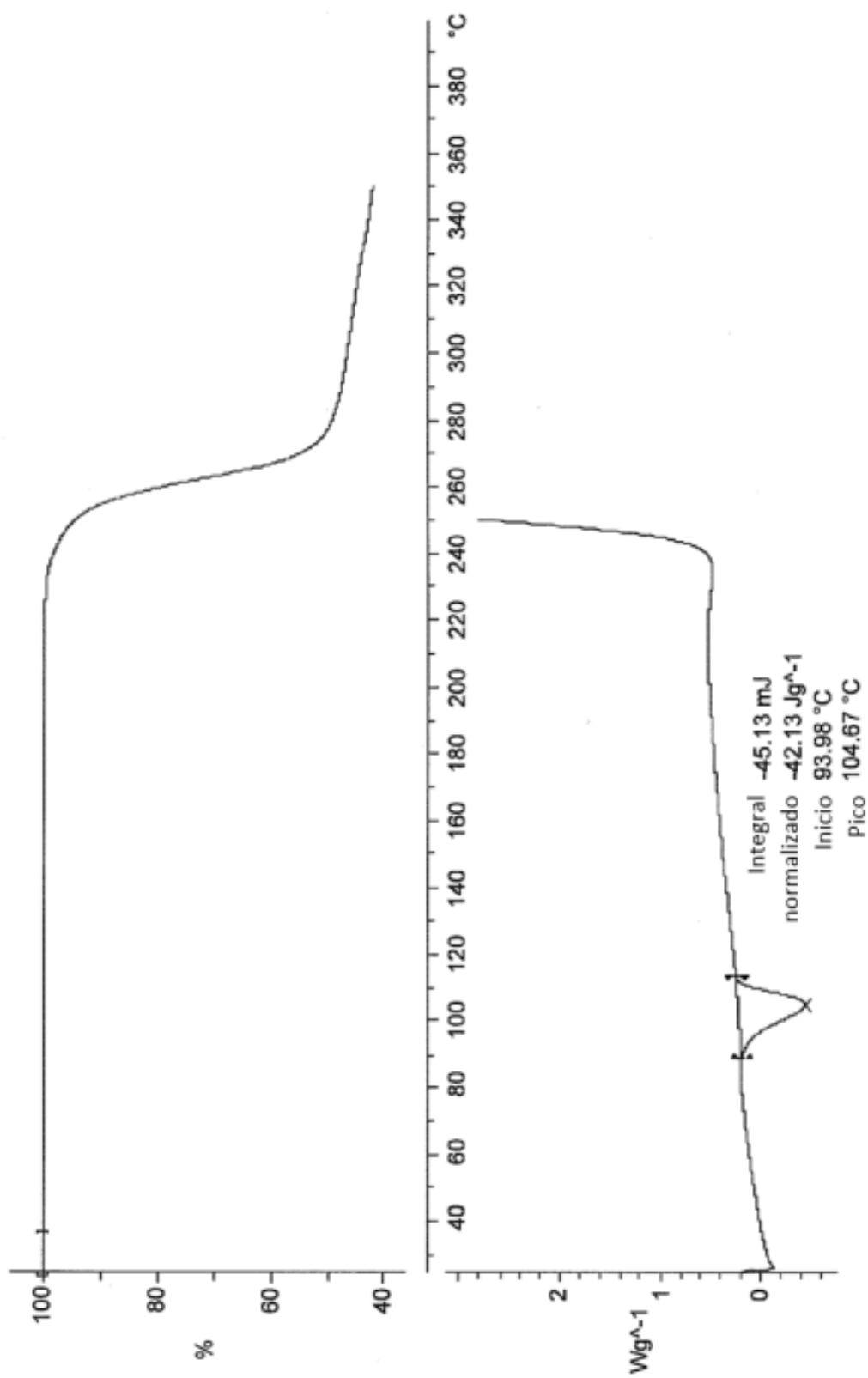


FIG. 20A

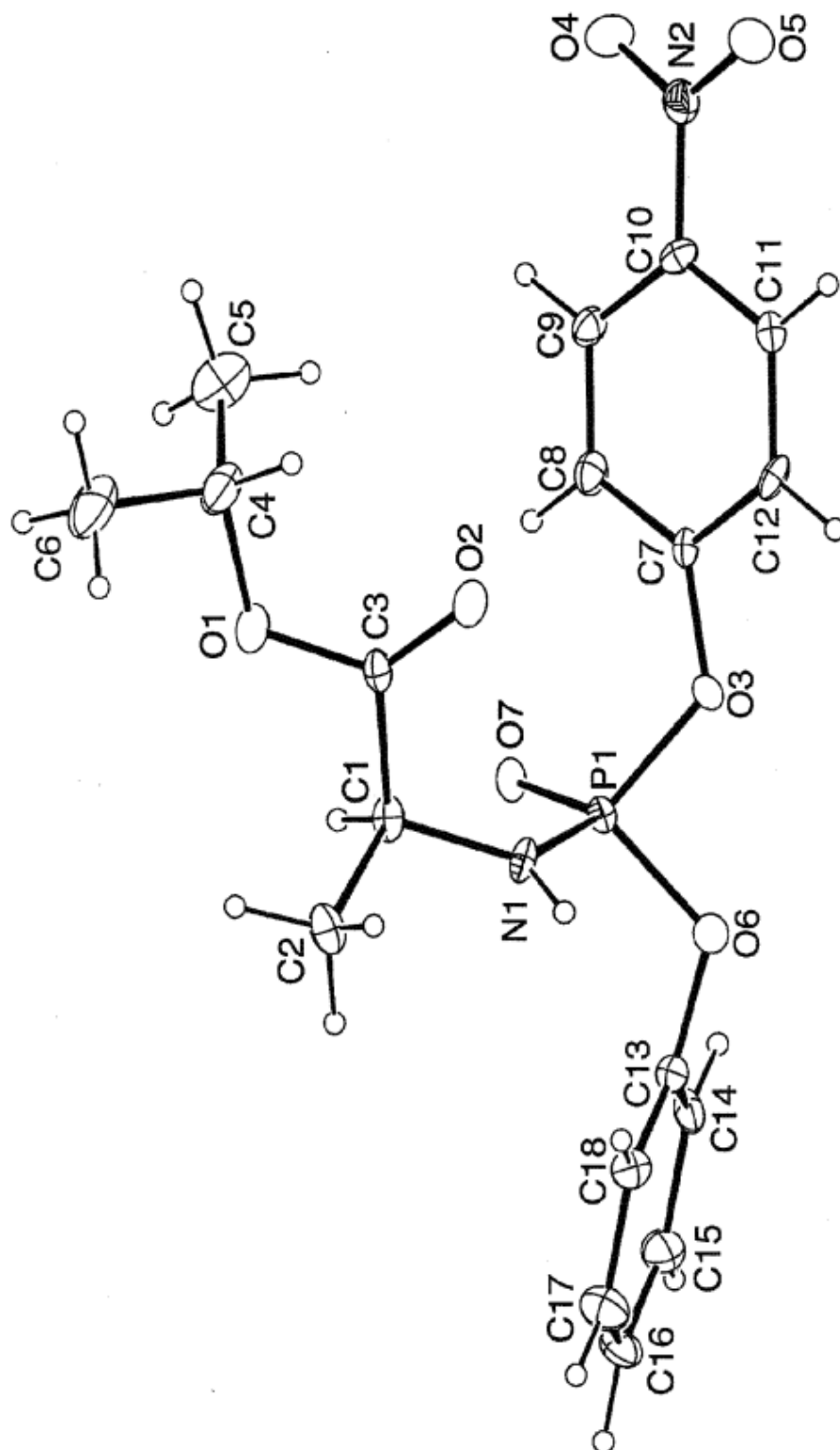
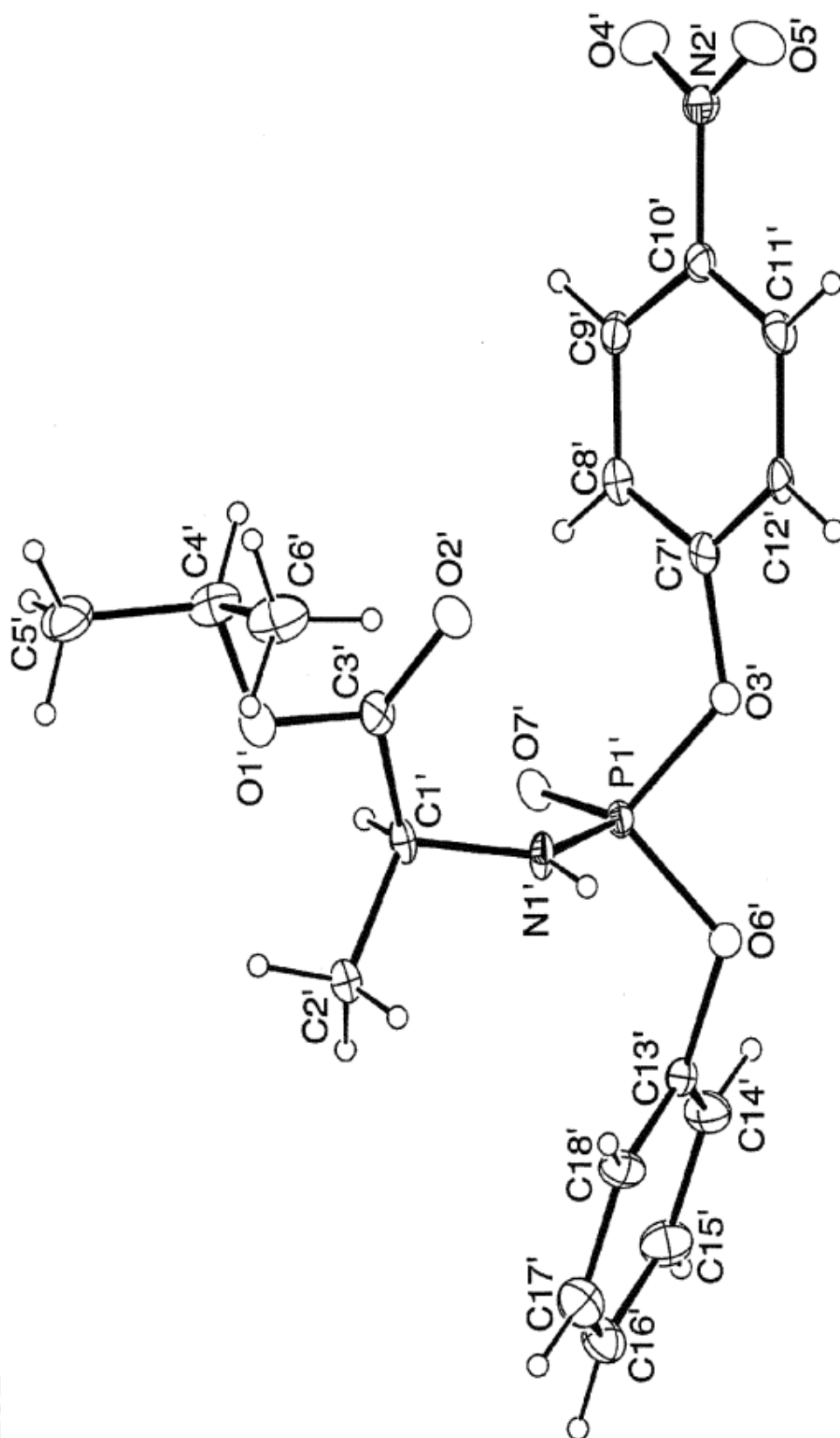


FIG. 20B



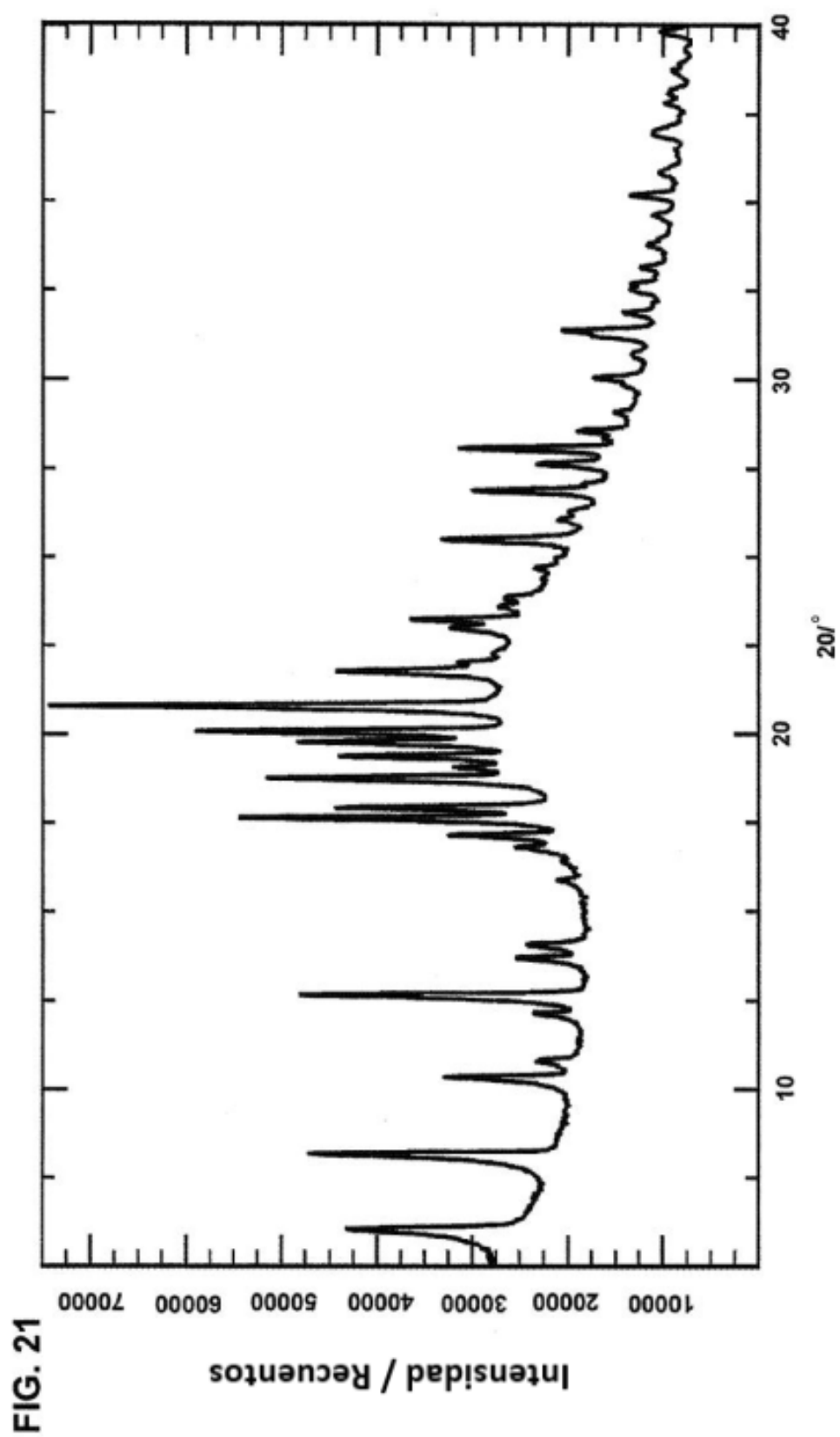


FIG. 22A

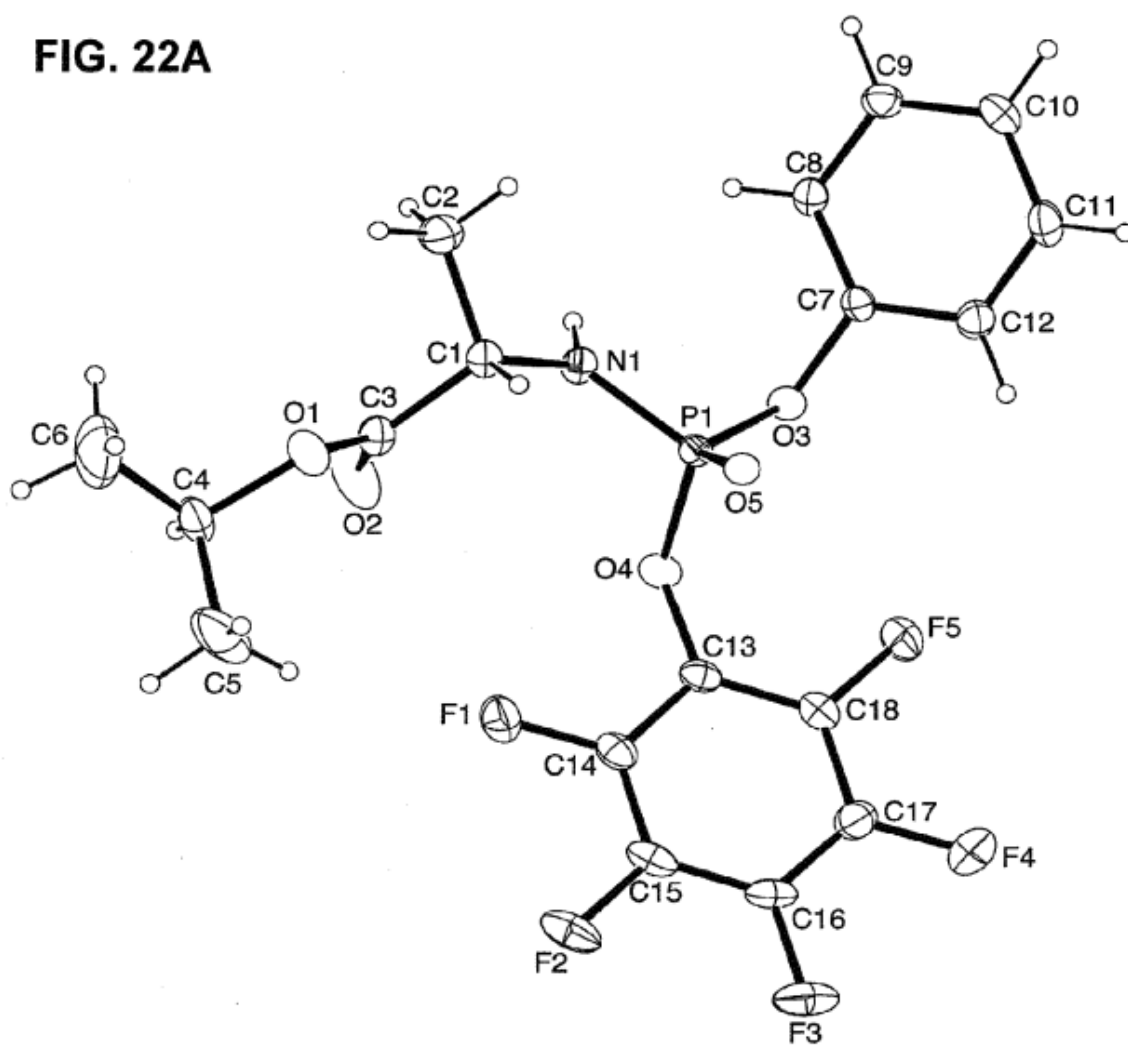


FIG. 22B

