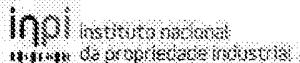


---

(11) Número de Publicação: **PT 2432792 T**



(51) Classificação Internacional:

**C07H 1/00** (2016.01) **C07H 19/10** (2016.01)

**A61K 31/7072** (2016.01) **A61P 31/14**

(2016.01)

**C07F 9/22** (2016.01) **C07F 9/6558** (2016.01)

**C07F 9/24** (2016.01)

---

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2010.05.20**

(30) Prioridade(s): **2009.05.20 US 179923 P**  
**2010.03.31 US 319513 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2012.03.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2016.07.06**  
**159/2016**

(73) Titular(es):

**GILEAD PHARMASSET LLC**

**C/O GILEAD SCIENCES, INC. 333 LAKESIDE DRIVE FOSTER CITY, CA 94404** US

(72) Inventor(es):

**BRUCE S. ROSS**

US

**MICHAEL JOSEPH SOFIA**

US

**GANAPATI REDDY PAMULAPATI**

US

**SUGUNA RACHAKONDA**

US

**HAI-REN ZHANG**

US

(74) Mandatário:

**VASCO STILLWELL DE ANDRADE**

PT

**RUA CASTILHO, 165 1070-050 LISBOA**

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ÉSTER 1-METILETÍLICO DE N-(2'R)-2'-DEOXI-2'-FLUORO-2'-METIL-P-FENIL-5'-URIDILIL]-L-ALANINA**

(57) Resumo:

SÃO REVELADOS NO PRESENTE DOCUMENTO FOSFORAMIDATOS DE NUCLEÓSIDO E SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTES PARA TRATAR DOENÇAS VIRais. ESTES COMPOSTOS SÃO INIBidores DA REPLICaçãO DE ARN VIRal DEPENDENTE DE ARN E SÃO ÚTEIS COMO INIBidores DA HCV NS5B POLIMERASE, COMO INIBidores DE REPLICaçãO DO VHC E PARA O TRATAMENTO DE INFECçãO POR HEPATITE C EM MAMíFEROS.

**RESUMO**

**PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ÉSTER 1-METILETÍLICO DE N-[  
(2'R)-2'-DEOXI-2'-FLUORO-2'-METIL-P-FENIL-5'-URIDILIL]-L-  
ALANINA**

São revelados no presente documento fosforamidatos de nucleósido e sua utilização como agentes para tratar doenças virais. Estes compostos são inibidores da replicação de ARN viral dependente de ARN e são úteis como inibidores da HCV NS5B polimerase, como inibidores de replicação do VHC e para o tratamento de infecção por hepatite C em mamíferos.

## **DESCRIÇÃO**

### **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ÉSTER 1-METILETÍLICO DE N-[ (2'R)-2'-DEOXI-2'-FLUORO-2'-METIL-P-FENIL-5'-URIDILIL]-L- ALANINA**

#### **Campo da Invenção**

São revelados no presente documento fosforamidatos nucleosídicos e sua utilização como agentes para tratar doenças virais. Estes compostos são inibidores da replicação de ARN viral dependente de ARN e são úteis como inibidores da HCV NS5B polimerase, como inibidores da replicação de HCV e para o tratamento de infecção por hepatite C em mamíferos.

#### **Antecedentes**

A infecção pelo vírus da hepatite (HCV) é um grande problema de saúde que conduz a doença hepática crónica, tal como cirrose e carcinoma hepatocelular, num número substancial de indivíduos infetados, estimado ser 2-15 % da população mundial. Estima-se que existam 4,5 milhões de pessoas infetadas só nos Estados Unidos, de acordo com o U.S. Center for Disease Control. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, existem mais de 200 milhões de indivíduos infetados em todo o mundo, com pelo menos 3 a 4 milhões de pessoas a serem infetadas cada ano. Uma vez infetadas, cerca de 20 % das pessoas eliminam o vírus, mas o resto pode ser veículo do HCV para o resto das suas vidas. Dez a vinte por cento dos indivíduos infetados cronicamente desenvolvem eventualmente cirrose que destrói o fígado ou cancro. A doença viral é transmitida por via parentérica através do sangue e produtos do sangue contaminados, agulhas contaminadas, ou sexualmente e verticalmente de mães infetadas ou mães portadoras aos seus filhos. Os tratamentos atuais para a infecção por HCV, que estão restritos à imunoterapêutica com interferão- $\alpha$

recombinante sozinho ou em combinação com o análogo de nucleósido ribavirina, são de benefício clínico limitado. Além disso, não existe uma vacina estabelecida contra HCV. Consequentemente, existe uma necessidade urgente para agentes terapêuticos melhorados que combatam eficazmente a infecção crónica por HCV.

O vírião do HCV é um vírus ARN de cadeia positiva envelopado com uma única sequência genómica oligorribonucleotídea de cerca de 9600 bases que codifica uma poliproteína de cerca de 3.010 aminoácidos. Os produtos da proteína do gene HCV consistem nas proteínas estruturais C, E1, e E2, e nas proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A e NS4B, e NS5A e NS5B. Pensa-se que as proteínas não estruturais (NS) providenciam a maquinaria catalítica para a replicação viral. A NS3 protease liberta NS5B, a ARN polimerase dependente de ARN da cadeia poliproteica. HCV NS5B polimerase é necessária para síntese de um ARN de cadeia dupla de um ARN viral de cadeia simples que serve como um molde no ciclo da replicação do HCV. Portanto, Assim, NS5B polimerase é considerada ser um componente essencial no complexo de replicação do HCV (K. Ishi, et al., *Heptology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118). A inibição da HCV NS5B polimerase previne a formação do ARN de HCV de cadeia dupla e, portanto, constitui uma abordagem atrativa ao desenvolvimento de terapêuticas antivirais específicas do HCV.

O HCV pertence a uma família muito maior de vírus que partilham muitas características comuns.

#### *Vírus Flaviviridae*

A família de vírus Flaviviridae compreende pelo menos três gêneros distintos: *pestivírus*, que causam doença em gado e porcos; *flavivírus*, que são a causa principal de doenças, tais como a febre do dengue e a febre amarela; e *hepacivírus*, cujo único membro é HCV. O gênero flavivírus

inclui mais de 68 membros separados em grupos com base no parentesco serológico (Calisher et al., J. Gen. Virol, 1993, 70, 37-43). Os sintomas clínicos variam e incluem febre, encefalite e febre hemorrágica (Fields Virology, Editores: Fields, B. N., Knipe, D. M., e Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadélfia, PA, 1996, capítulo 31, 931-959). Flavivírus de preocupação global que estão associados com doença humana incluem os vírus da Febre Hemorrágica do Dengue (DHF), vírus da febre amarela, síndrome de choque e vírus da encefalite Japonesa (Halstead, S. B., Rev. Infect. Dis., 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., Science, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., New Eng. J. Med, 1988, 319, 64 1-643).

O género pestivírus inclui vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da febre suína clássica (CSFV, (CSFV, também designada vírus da cólera suína) e vírus da doença da fronteira (BDV) das ovelhas (Moennig, V. et al. Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). As infecções por Pestivírus de animais de quinta domesticados (gado, porcos e ovelhas) causam perdas económicas significativas em todo o mundo. BVDV causa doença mucosal em gado e é de importância económica significativa para a indústria dos animais de quinta (Meyers, G. e Thiel, H.J., Advances in Virus Research, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al., Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Os pestivírus humanos não foram tão extensivamente caracterizados como os pestivírus animais. Contudo, pesquisas serológicas indicam exposição a pestivírus considerável em seres humanos.

Pestivírus e hepacivírus são grupos de vírus estreitamente relacionados dentro da família Flaviviridae. Outros vírus estreitamente relacionados nesta família incluem o vírus GB A, os agentes tipo A do vírus GB, vírus GB B e vírus GB C (também designado vírus da hepatite G, HGV). O grupo hepacivírus (vírus da hepatite C; HCV) consiste num número de estreitamente relacionados, mas

genotipicamente diferenciáveis, vírus que infetam seres humanos. Existem pelo menos 6 genótipos de HCV e mais de 50 subtipos. Devido às semelhanças entre pestivírus e hepacivírus, combinado com a fraca capacidade dos hepacivírus crescerem eficientemente em cultivo celular, o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é frequentemente utilizado como um substituto para estudar o vírus HCV.

A organização genética de pestivírus e hepacivírus é muito semelhante. Estes vírus de ARN de cadeia positiva possuem um quadro de leitura aberta grande único (ORF) que codifica todas as proteínas virais necessárias para a replicação do vírus. Estas proteínas são expressas como uma poliproteína que é co- e pós-traducionalmente processada por ambas proteinases celular e codificada pelo vírus para produzir as proteínas virais maduras. As proteínas virais responsáveis pela replicação do ARN do genoma viral estão localizadas dentro aproximadamente do terminal carboxi. Dois terços do ORF são designados proteínas não estruturais (NS). A organização genética e o processamento da poliproteína da porção de proteína não estrutural do ORF para pestivírus e hepacivírus é muito semelhante. Para ambos pestivírus e hepacivírus, as proteínas não estruturais (NS) maduras, em ordem sequencial do terminal amino da região codificante da proteína não estrutural para o terminal carboxi do ORF, consistem em p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B.

As proteínas NS de pestivírus e hepacivírus partilham domínios de sequência que são característicos de funções proteicas específicas. Por exemplo, Por exemplo, as proteínas NS3 de vírus em ambos grupos possuem motivos de sequências de aminoácido característicos de serina proteinases e de helicases (Gorbalenya *et al.*, *Nature*, 1988, 333, 22; Bazan and Fletterick *Virology*, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3889-3897). De forma semelhante, as proteínas NS5B de

pestivírus e hepacivírus têm os motivos característicos de ARN polimerases dirigidas a ARN (Koonin, E.V. e Dolja, V.V., Crir. Rev. Biochem. Molec. Biol. 1993, 28, 375-430).

Os papéis e funções reais das proteínas NS de pestivírus e hepacivírus no ciclo de vida do vírus são diretamente análogos. Em ambos casos, a NS3 serina proteinase é responsável por todo o processamento proteolítico dos precursores de poliproteína a jusante da sua posição no ORF (Wiskerchen e Collett, Virology, 1991, 184, 341-350; Bartenschlager et al., J. Virol. 1993, 67, 3835-3844; Eckart et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1993, 192, 399-406; Grakoui et al., J. Virol. 1993, 67, 2832-2843; Grakoui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 10583-10587; Hijikata et al., J. Virol. 1993, 67, 4665-4675; Tome et al., J. Virol., 1993, 67, 4017-4026). A proteína NS4A, em ambos casos, atua como um co-fator com a NS3 serina protease (Bartenschlager et al., J. Virol. 1994, 68, 5045-5055; Failla et al., J. Virol. 1994, 68, 3753-3760; Xu et al., J. Virol., 1997, 71:53 12-5322). A proteína NS3 de ambos vírus também funciona como uma helicase (Kim et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1995, 215, 160-166; Jin and Peterson, Arch. Biochem. Biophys., 1995, 323, 47-53; Warrener and Collett, J. Virol. 1995, 69, 1720-1726). Finalmente, as proteínas NS5B de pestivírus e hepacivírus têm a atividade prevista de ARN polimerases dirigidas a ARN (Behrens et al., EMBO, 1996, 15, 12-22; Lechmann et al., J. Virol., 1997, 71, 8416-8428; Yuan et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1997, 232, 231-235; Hagedorn, documento PCT WO 97/12033; Zhong et al., J. Virol., 1998, 72, 9365-9369).

Atualmente, existem opções de tratamento limitadas para indivíduos infetados com o vírus da hepatite C. A opção terapêutica atualmente aprovada é a utilização de imunoterapêutica com interferão- $\alpha$  recombinante sozinho ou em combinação com o análogo de nucleósido ribavirina. Esta

terapêutica é limitada na sua eficácia clínica e apenas 50 % dos pacientes tratados respondem à terapêutica. Portanto, existe uma necessidade significativa para terapêuticas mais eficazes e novas para fazer face à necessidade médica não satisfeita colocada pela infecção pelo HCV.

Um número de alvos moleculares potenciais para o desenvolvimento de fármacos de antivirais que atuam diretamente como terapêuticas anti-HCV foi agora identificado incluindo, mas não são limitado a, a NS2-NS3 autoprotease, a N3 protease, a N3 helicase e a NS5B polimerase. A ARN polimerase dependente de ARN é absolutamente essencial para a replicação do genoma ARN senso positivo de cadeia simples e esta enzima despoletou interesse significativo entre os químicos médicos.

Inibidores de HCV NS5B como terapêuticas potenciais para infecção por HCV foram revistos: Tan, S.-L., et al., Nature Rev. Drug Discov., 2002, 1.867-881; Walker, M.P. et al., Exp. Opin. Investigational Drugs, 2003, 12, 1269-1280; Ni, Z- J., et al., Current Opinion in Drug Discovery and Desenvolvimento, 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; Carroll, S., et al., Infectious Disorders- Drug Targets, 2006, 6, 17-29. O potencial para a emergência de estirpes resistentes ao HCV e a necessidade de identificar agentes com cobertura de genótipo ampla suporta a necessidade de continuar os esforços para identificar nucleósidos novos e mais eficazes como inibidores de HCV NS5B.

Os inibidores de nucleósidos da NS5B polimerase podem atuar tanto como um substrato não natural que resulta na terminação de cadeia ou como um inibidor competitivo que compete com a ligação do nucleótido à polimerase. Para funcionar como um terminador de cadeia o análogo de

nucleósido tem de ser captado pela célula e convertido *in vivo* num trifosfato para competir pelo local de ligação do nucleótido à polimerase. Esta conversão em trifosfato é vulgarmente mediada por quinases celulares que partilham requisitos estruturais adicionais num potencial inibidor de polimerase nucleósido. Infelizmente, isto limita a avaliação direta de nucleósidos como inibidores da replicação do HCV a ensaios baseados na célula capazes de fosforilação *in situ*.

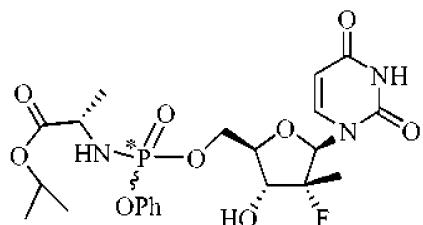
Em alguns casos, a atividade biológica de um nucleósido é impedida pelas suas características de substrato fracas para uma ou mais das quinases necessárias para o converter na forma trifosfato ativa. A formação do monofosfato por uma nucleósido quinase é geralmente vista como a etapa limitante da taxa dos três eventos de fosforilação. Para contornar a necessidade da etapa inicial de fosforilação no metabolismo de um nucleósido ao análogo trifosfato ativo, a preparação de pró-fármacos fosfato adequados foi reportada. Mostrou-se que os pró-fármacos fosforamidatos nucleósidos são precursores do nucleósido trifosfato ativo e inibem a replicação viral quando administrados a células completas infetadas virais (McGuigan, C., et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., et al., Proc. National Acad Sci USA, 1996, 93, 7295-7299; Siddiqui, A. Q., et al., J. Med. Chem., 1999, 42, 4122-4128; Eisenberg, E. J., et al., Nucleosides, Nucleotides e Nucleic Acids, 2001, 20, 1091-1098; Lee, W.A., et al., Antimicrobial Agents e Chemotherapy, 2005, 49, 1898); documento US 2006/0241064; e documento WO 2007/095269.

Limitar também a utilidade dos nucleósidos como agentes terapêuticos viáveis é, por vezes, as suas fracas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. Estas propriedades fracas podem limitar a absorção intestinal de

um agente e limitar a captação no tecido ou célula alvo. Para melhorar as suas propriedades, foram empregues pró-fármacos de nucleósidos. Foi demonstrado que a preparação de fosforamidatos nucleósidos melhora a absorção sistémica de um nucleósido e além disso, a fração fosforamidato destes "pró-nucleótidos" é mascarada com grupos lipofílicos neutrais para obter um coeficiente de partição adequado para otimizar a captação e transporte para a célula aumentando dramaticamente a concentração intracelular do análogo nucleósido monofosfato relativo a administrar o nucleósido parental sozinho. Hidrólise mediada por enzima da fração fosfato éster produz um nucleósido monofosfato em que a taxa limitando a fosforilação inicial é desnecessária. Para este fim, o Pedido de Patente US 12/053.015, que corresponde ao documento WO 2008/121634 e documento US 2010/0016251, descreve um número de pró-fármacos de fosforamidato de nucleósido, muitos dos quais apresentam atividade num ensaio de HCV. Vários compostos revelados no documento US 2010/0016251 foram testados como um candidato potencial clínico para aprovação pela FDA.

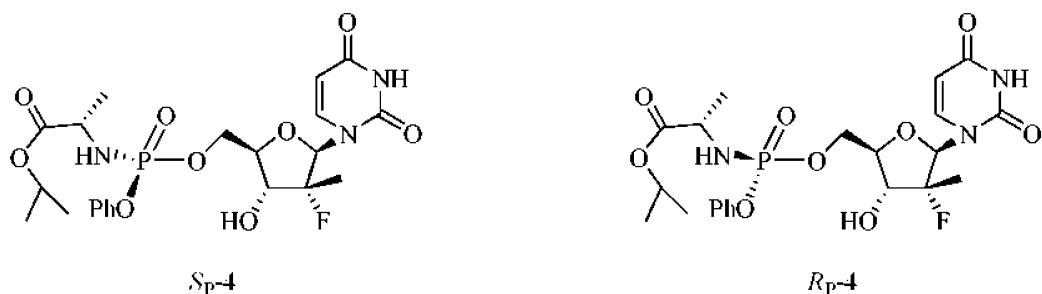
#### **Sumário da Invenção**

A presente invenção proporciona um processo para preparar um composto representado pela fórmula 4, ou um diastereómero à base de fósforo do mesmo:



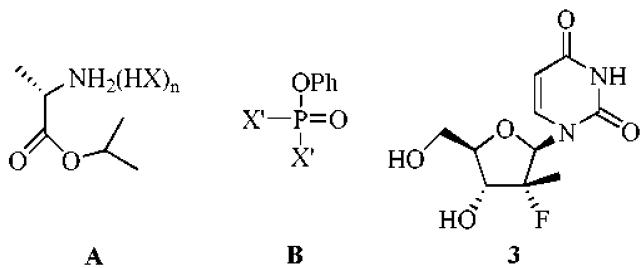
**4**

em que  $P^*$  representa um átomo de fósforo quirral, e em que o dito diastereómero à base de fósforo é representado pela fórmula  $R_P\text{-}4$  ou  $S_P\text{-}4$ :



que compreende:

- a) fazer reagir um isopropil-alanato, **A**, um di-**X'**-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, e uma base para obter uma primeira mistura que compreende **4**, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo;



em que X é uma base de conjugado de um ácido, n é 0 ou 1, e **X'** é um halogénio

- b) fazer reagir a primeira mistura com um composto de proteção para obter uma segunda mistura que compreende **4**, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo, em que o composto de proteção é selecionado a partir de um composto de proteção de t-butildimetilsílico e um composto de proteção de dimetoxitrifenilmetilo; e
- c) submeter opcionalmente a segunda mistura a cristalização, cromatografia, ou extração com a finalidade de obter **4**, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo

Características preferidas do processo da presente invenção são expostas nas reivindicações dependentes.

#### Breve Descrição dos Desenhos

**Figura 1.** Difratograma de XRD de alta resolução de **4**.

**Figura 2.** Difratograma de XRD de alta resolução de R<sub>P</sub>-**4**.

**Figura 3.** Difratograma de XRD de alta resolução de S<sub>P</sub>-**4** (Forma 1).

**Figura 4.** Difratograma de XRD de alta resolução de S<sub>P</sub>-**4** (Forma 1).

**Figura 5.** Difratograma de XRD de alta resolução de S<sub>P</sub>-**4** · CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Forma 2).

**Figura 6.** Difratograma de XRD de alta resolução de S<sub>P</sub>-**4** · CHCl<sub>3</sub> (Forma 3).

**Figura 7.** Difratograma de XRD de alta resolução de S<sub>P</sub>-**4** (Forma 4).

**Figura 8.** Difratograma de XRD de alta resolução de S<sub>P</sub>-**4** (Forma 5).

**Figura 9.** Difratograma de XRD de alta resolução de S<sub>P</sub>-**4** (amorfo).

**Figura 10.** Estrutura Cristalina de Raios X para S<sub>P</sub>-**4** (Forma 1)

**Figura 11.** Estrutura (Isotrópica) Cristalina de Raios X para S<sub>P</sub>-**4** · CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Forma 2)

**Figura 12.** Estrutura (Anisotrópica) Cristalina de Raios X para S<sub>P</sub>-**4** · CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Forma 2)

**Figura 13.** Estrutura Cristalina de Raios X para S<sub>P</sub>-**4** · CHCl<sub>3</sub> (Forma 3)

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

**Figura 15.** Espetro de FT-IR de R<sub>P</sub>-**4**.

**Figura 16.** Espetro de FT-IR de S<sub>P</sub>-**4**

**Figura 17.** Análise de TGA e DSC de **4**.

**Figura 18.** Análise de TGA e DSC de R<sub>P</sub>-**4**.

**Figura 19.** Análise de TGA e DSC de S<sub>P</sub>-**4**.

**Figura 20A.** Estrutura Cristalina de Raios X para **8** (S<sub>P</sub>-isómero) (molécula N° 1 da unidade assimétrica).

Figura 20B. Estrutura Cristalina de Raios X para **8** (S<sub>P</sub>-isómero) (molécula N° 2 da unidade assimétrica).

## **Descrição Pormenorizada da Invenção**

### *Definições*

A frase "um" ou "uma" entidade, conforme é utilizada no presente documento, refere-se a uma ou mais dessa entidade; por exemplo, um composto refere-se a um ou mais compostos ou pelo menos um composto. Como tal, Como tal, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais", "pelo menos um" podem ser utilizados alternadamente no presente documento.

Os termos "opcional" ou "opcionalmente", conforme utilizados no presente documento, significam que um evento ou circunstância subsequentemente descritos pode, mas não precisa de, ocorrer e que a descrição inclui casos onde o evento ou circunstância ocorre e casos em que não. Por exemplo, "ligação opcional" significa que a ligação pode ou não estar presente e que a descrição inclui ligações simples, duplas ou triplas.

O termo "P\*" significa que o átomo de fósforo é quiral e que tem uma designação correspondente de Cahn-Ingold-Prelog de "R" ou "S", que têm os seus significados aceites simples.

O termo "purificado," como é descrito no presente documento, refere-se à pureza de um dado composto. Por exemplo, um composto é "purificado" quando o dado composto é um componente principal da composição, isto é, pelo menos 50 % p/p puro. Assim, "purificado" abrange pelo menos 50 % p/p de pureza, pelo menos 60 % p/p de pureza, pelo menos 70 % de pureza, pelo menos 80 % de pureza, pelo menos 85 % de pureza, pelo menos 90 % de pureza, pelo menos 92 % de pureza, pelo menos 94 % de pureza, pelo menos 96 % de pureza, pelo menos 97 % de pureza, pelo menos 98 % de pureza, pelo menos 99 % de pureza, pelo menos 99,5 % de pureza, e pelo menos 99,9 % de pureza, em que "substancialmente puro" abrange pelo menos 97 % de pureza, pelo menos 98 % de pureza, pelo menos 99 % de pureza, pelo menos 99,5 % de pureza, e pelo menos 99,9 % de pureza

O termo "metabolito," como é descrito no presente documento, refere-se a um composto produzido *in vivo* após administração a um indivíduo em necessidade do mesmo.

O termo "cerca de" (também representado por ~) significa que o valor numérico indicado é parte de um intervalo que varia dentro do erro experimental padrão.

A expressão "substancialmente como mostrado em..." um padrão de XRPD especificado significa que as posições de pico mostradas no padrão de XRPD são substancialmente as mesmas, dentro da inspeção visual ou recorrer listas de picos selecionados ( $\pm 0,2 {}^{\circ}2\theta$ ). Um perito ordinário entende que as intensidades podem variar dependendo da amostra.

O termo "substancialmente anidro" significa que uma substância contém no máximo 10 % em peso de água, preferentemente no máximo 1 % em peso de água, mais preferentemente no máximo 0,5 % em peso de água, e o mais preferível no máximo 0,1 % em peso de água.

Um solvente ou antissolvente (como usado em reações, cristalização, etc. ou rede e/ou solventes adsorvidos) inclui pelo menos um de um C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub> álcool, um C<sub>2</sub> a C<sub>8</sub> éter, um C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> cetona, um C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> éster, um C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> clorocarbono, um C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> nitrilo, um solvente misturado, um C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub> hidrocarboneto saturado, e um C<sub>6</sub> a C<sub>12</sub> hidrocarboneto aromático.

O C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub> álcool refere-se a um álcool cíclico/acíclico e/ou de cadeia linear/ramificada que tem tal número de carbonos. O C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub> álcool inclui, mas não se limita a, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, hexanol, e ciclohexanol.

O C<sub>2</sub> a C<sub>8</sub> éter refere-se a um éter cíclico/acíclico e/ou de cadeia linear/ramificada que tem tal número de carbonos. O C<sub>2</sub> a C<sub>8</sub> éter inclui, mas não se limita a, dimetil éter, dietil éter, di-isopropil éter, di-n-butil éter, metil- t-butil éter (MTBE), tetrahidrofurano, e dioxano

A C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> cetona refere-se a uma cetona cíclica/acíclica e/ou de cadeia linear/ramificada que tem tal número de carbonos. A C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> cetona inclui, mas não se limita a, acetona, metil etil cetona, propanona, butanona, metil isobutil cetona, metil butil cetona, e ciclohexanona.

O C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> éster refere-se a um éster cíclico/acíclico e/ou de cadeia linear/ramificada que tem tal número de carbonos. O C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> éster inclui, mas não se limita a, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de n-butilo, etc.

O C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> clorocarbono refere-se a um clorocarbono que tem tal número de carbonos. O C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> clorocarbono inclui, mas não se limita a, clorofórmio, cloreto de metileno (DCM), tetracloreto de carbono, 1,2-dicloroetano, e tetracloroetano.

Um C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> nitrílio refere-se a um nitrílio que tem tal número de carbonos. O C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> nitrílio inclui, mas não se limita a, acetonitrílio, propionitrílio, etc.

Um solvente misturado refere-se a um solvente comumente utilizado em química orgânica, que inclui, mas não se limita a, dietileno glicol, diglima (dietileno glicol dimetil éter), 1,2-dimetoxi-etano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etileno glicol, glicerina, hexametilfosforamida, triame de hexametilfósforo, N-metil-2-pirrolidinona, nitrometano, piridina, trietyl amina, e ácido acético.

O termo C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub> hidrocarboneto saturado refere-se a um hidrocarboneto cíclico/acíclico e/ou de cadeia linear/ramificada. O C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub> hidrocarboneto saturado inclui, mas não se limita a, n-pentano, éter de petróleo (ligroína), n-hexano, n-heptano, ciclohexano, e cicloheptano.

O termo C<sub>6</sub> a C<sub>12</sub> aromático refere-se a hidrocarbonetos substituídos e não substituídos que têm um grupo fenilo como sua cadeia principal. Hidrocarbonetos preferidos

incluem benzeno, xileno, tolueno, clorobenzeno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, xilenos, com tolueno sendo mais preferido.

O termo "halo" ou "halogénio" como é usado no presente documento, inclui cloro, bromo, iodo e fluoro.

O termo "grupo de bloqueio" refere-se a um grupo químico que exibe as seguintes características. O "grupo" é derivado de um "composto de proteção." Grupos que são seletivos para hidroxilos primários sobre hidroxilos secundários que podem ser colocados sob condições consistentes com a estabilidade do fosforamidato (pH 2-8) e transmitir ao produto resultante propriedades físicas substancialmente diferentes permitindo uma separação mais fácil do produto grupo 3'-fosforamidato-5'-novo a partir do composto desejado não reagido. O grupo precisa reagir seletivamente com bom rendimento para dar um substrato protegido que é estável para as reações projetadas (veja-se Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>a</sup> ed. T. W. Greene e P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, Nova York, N.Y., 1999). Exemplos de grupos incluem, mas não se limitam a: benzoilo, acetilo, benzoilo fenil-substituído, tetrahidropiranilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-il), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-il) ou 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, CH<sub>2</sub>O-alquilo, CH<sub>2</sub>O-arilo SO<sub>2</sub>-alquilo, SO<sub>2</sub>-arilo, terc-butildimetsilsililo, terc-butildifensilsililo. Acetais, tais como MOM ou THP e semelhantes são considerados grupos possíveis. Compostos fluorados são também contemplados contanto que possam ser unidos ao composto e possam ser seletivamente removidos passando através de uns meios de extração em fase sólida fluorosa (FluoroFlash®). Um exemplo específico inclui um análogo de tritilo fluorado, análogo de tritilo 1-[4-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)fenil]-1,1-difenilmetanol.

Outros análogos fluorados de tritilo, BOC, FMOC, CBz, etc. são também contemplados. Cloretos de sulfonilo como cloreto de p-toluenossulfônico podem reagir seletivamente na posição 5'. Esteres poderiam ser formados seletivamente tal como acetatos e benzoatos. Anidridos dicarboxílicos tais como anidrido succínico e seus derivados podem ser usados para gerar uma ligação éster com um ácido carboxílico livre, tais exemplos incluem, mas não se limitam a oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, adipilo, pimelilo, superilo, azelailo, sebacilo, ftalilo, isoftalilo, tereftalilo, etc. O ácido carboxílico livre aumenta a polaridade dramaticamente e pode também ser usado como um cabo para extrair o produto de reação em fases aquosas suavemente básicas tais como soluções de bicarbonato de sódio. O grupo fosforamidato é relativamente estável em meios ácidos, assim os grupos que requerem condições ácidas de reação, tais como, tetrahidropiranilo, poderiam também ser usados.

O termo "grupo de proteção" que é derivado de um "composto de proteção," tem o seu significado comum e simples, isto é, pelo menos um grupo de proteção ou bloqueio é ligado a pelo menos um grupo funcional (por exemplo, -OH, -NH<sub>2</sub>, etc.) que permite a modificação química de pelo menos um outro grupo funcional. Exemplos de grupos de proteção, incluem, mas não se limitam a, benzoilo, acetilo, benzoilo fenil-substituído, tetrahidropiranilo, tritilo, DMT (4,4'-dimetoxitritilo), MMT (4-monometoxitritilo), trimetoxitritilo, grupo pixilo (9-fenilxanten-9-il), tiopixilo (9-feniltioxanten-9-il) ou 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX), etc.; C(O)-alquilo, C(O)Ph, C(O)arilo, C(O)O(alquilo de cadeia curta), C(O)O(alquíleno de cadeia curta)arilo (por exemplo, -C(O)OCH<sub>2</sub>Ph), C(O)Oarilo, CH<sub>2</sub>O-alquilo, CH<sub>2</sub>O-arilo, SO<sub>2</sub>-alquilo, SO<sub>2</sub>-arilo, um grupo de proteção que compreende pelo menos um átomo de silício, tal como, terc-butildimetsilsililo, terc-butildifenilsililo, Si(alquilo de

cadeia curta)<sub>2</sub>OSi(alquilo de cadeia curta)<sub>2</sub>OH (tal como, -Si(<sup>i</sup>Pr)<sub>2</sub>OSi(<sup>i</sup>Pr)<sub>2</sub>OH.

O termo "composto de proteção," como é usado no presente documento e a não ser que de outro modo definido, refere-se a um composto que contém um "grupo de proteção" e que é capaz de reagir com um composto que contém grupos funcionais que são capazes de serem protegidos.

O termo "grupo abandonante", como é usado no presente documento, tem o mesmo significado ao perito (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure - Quarta Edição por Jerry March, John Wiley e Sons Ed.; 1992 páginas 351-357) e representa um grupo que é parte de e unido a uma molécula substrato; numa reação onde a molécula substrato passa por uma reação de deslocamento (com, por exemplo, um nucleófilo), o grupo abandonante é então deslocado. Exemplos de grupos abandonantes incluem, mas não se limitam a: halogénio (F, Cl, Br, e I), preferentemente Cl, Br, ou I; tosilato, mesilato, triflato, acetato, canforsulfonato, arilóxido, e arilóxido substituído com pelo menos um grupo de remoção de eletrão (por exemplo, p-nitrofenóxido, 2-clorofenóxido, 4-clorofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, pentafluorofenóxido, etc.), etc. O termo "grupo de remoção de eletrão" está de acordo com o seu significado comum no presente documento. Exemplos de grupos de remoção de eletrão incluem, mas não se limitam a, um halogénio, -NO<sub>2</sub>, -C(O) (alquilo de cadeia curta), -C(O) (aril), -C(O)O (alquilo de cadeia curta), -C(O)O (aril), etc.

O termo "reagente básico", como é usado no presente documento, significa um composto que é capaz de deprotonar um grupo hidroxilo. Exemplos de reagentes básicos incluem, mas não se limitam a, um (alquilóxido de cadeia curta)Óxido ((alquilo de cadeia curta)OM) em combinação com um solvente alcoólico, onde (alquilóxidos de cadeia curta)Óxidos incluem, mas não se limitam a, MeO<sup>-</sup>, EtO<sup>-</sup>, <sup>n</sup>PrO<sup>-</sup>, <sup>i</sup>PrO<sup>-</sup>,

$t\text{BuO}^-$ ,  $i\text{AmO}^-$  (iso-amilóxido), etc., e onde M é um catião de metal alcalino, tal como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , etc. Solventes alcoólicos incluem (alquilo de cadeia curta)OH, tal como, por exemplo, MeOH, EtOH,  $n\text{PrOH}$ ,  $i\text{PrOH}$ ,  $t\text{BuOH}$ ,  $i\text{AmOH}$ , etc. Bases não alcoxi podem também ser usadas tal como hidreto de sódio, hexametildisilazano de sódio, hexametildisilazano de lítio, diisopropilamida de lítio, hidreto de cálcio, carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de césio, DBU, DBN, reagentes de Grignard, tais como (alquilo de cadeia curta)Mg(halogénio), que incluem, mas não se limitam a  $\text{MeMgCl}$ ,  $\text{MeMgBr}$ ,  $t\text{BuMgCl}$ ,  $t\text{BuMgBr}$ , etc.

O termo "base" abrange o termo "reagente básico" e pretende-se que seja um composto que é capaz de desprotonar um composto que contém protão, isto é, uma base de Brønsted. Além dos exemplos indicados acima, exemplos adicionais de uma base incluem, mas não se limitam a piridina, colidina, 2,6-(alquilo de cadeia curta)-piridina, dimetil-anilina, imidazol, N-metilimidazol, pirazol, N-metil-pirazol, trietilamina, di-isopropiletilamina, etc.

O termo "grupo de remoção de eletrão" é de acordo com o seu significado comum. Exemplos de grupos de remoção de eletrão incluem, mas não se limitam a, um halogénio (F, Cl, Br, ou I),  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{C(O)}$  (alquilo de cadeia curta),  $-\text{C(O)}$  (aril),  $-\text{C(O)O}$  (alquilo de cadeia curta),  $-\text{C(O)O}$  (aril), etc.

O termo "co-crystalatos" incluem co-crystalatos de 4,  $R_P\text{-4}$ , ou  $S_P\text{-4}$  em combinação com sais, que abrangem sais farmaceuticamente aceitáveis.

O termo "saís," como é descrito no presente documento, refere-se a um composto que compreende um catião e um anião, que pode ser produzido por meio da protonação de um fração aceitadora de protão e/ou desprotonação de um fração dadora de protão. Deveria ser indicado que protonação da fração aceitadora de protão resulta na formação de uma espécie catiónica em que a carga é equilibrada pela

presença de um anião fisiológico, ao passo que desprotonação da fração dadora de protão resulta na formação de uma espécie aniónica em que a carga é equilibrada pela presença de um catião fisiológico.

A frase "sal farmaceuticamente aceitável" significa um sal que é farmaceuticamente aceitável. Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não se limitam a: (1) sais de adição de ácido, formados com ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, e semelhantes; ou formados com ácidos orgânicos, tais como ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido lático, ácido malônico, ácido mállico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido 1,2-etanodissulfônico, ácido 2-hidroxietanossulfônico, ácido benzenossulfônico, ácido 4-clorobenzenossulfônico, ácido 2-naftalenossulfônico, ácido 4-toluenossulfônico, ácido canforsulfônico, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutâmico, ácido salicílico, ácido mucónico e semelhantes ou (2) sais de adição de base formados com as bases conjugadas de qualquer dos ácidos inorgânicos listados anteriormente, em que as bases conjugadas compreendem um componente catiónico selecionado entre  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NHgR}'^{4-g+}$ , em que  $\text{R}''$  é um  $\text{C}_{1-3}$  alquilo e  $g$  é um número selecionado entre 0, 1, 2, 3, ou 4. Deverá ser compreendido que todas as referências a sais farmaceuticamente aceitáveis incluem formas de adição de solvente (solvatos) ou formas cristalinas (polimorfos), conforme definido no presente documento, do mesmo sal de adição de ácido.

O termo "alquilo" refere-se a um resíduo de hidrocarboneto de cadeia ramificada ou não ramificada, saturada, monovalente contendo 1 a 30 átomos de carbono. O

termo "C<sub>1-M</sub> alquilo" refere-se a um alquilo compreendendo 1 a M átomos de carbono, onde M é um número inteiro com os seguintes 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, ou 30. O termo "C<sub>1-4</sub> alquilo" refere-se a um alquilo contendo 1 a 4 átomos de carbono, O termo "alquilo de cadeia curta" indica um resíduo de hidrocarboneto de cadeia simples ou ramificada compreendendo 1 a 6 átomos de carbono. "C<sub>1-20</sub> alquilo" conforme utilizado no presente documento, refere-se a um alquilo compreendendo 1 a 20 átomos de carbono. "C<sub>1-10</sub> alquilo" conforme utilizado no presente documento, refere-se a um alquilo compreendendo 1 a 10 átomos de carbono. Exemplos de grupos alquilo incluem, mas não são limitados a, grupos alquilo de cadeia curta incluem metilo etilo, propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo ou pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, e octilo. O termo (ar)alquilo ou (heteroaril)alquilo indicam que o grupo alquilo é opcionalmente substituído por um grupo arilo ou um heteroarilo, respectivamente.

O termo "alquenilo" refere-se a um radical da cadeia hidrocarboneto não substituído com 2 a 10 átomos de carbono com uma ou duas ligações duplas olefínicas, preferentemente uma ligação dupla olefínica. O termo "C<sub>2-M</sub> alquenilo" refere-se a um alquenilo compreendendo 2 a N átomos de carbono, onde N é um número inteiro com os seguintes valores: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10. O termo "C<sub>2-10</sub> alquenilo" refere-se a um alquenilo compreendendo 2 a 10 átomos de carbono, O termo "C<sub>2-4</sub> alquenilo" refere-se a um alquenilo compreendendo 2 a 4 átomos de carbono, Exemplos incluem, mas não são limitados a, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo) ou 2-butenilo (crotilo).

O termo "arilo", conforme utilizado aqui, e a menos que seja de outra forma especificado, refere-se a fenilo (Ph), bifenilo ou naftilo substituído ou não substituído,

preferencialmente o termo arilo refere-se a fenilo substituído ou não substituído. O grupo arilo pode ser substituído com uma ou mais frações selecionadas entre hidroxilo, F, Cl, Br, I, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfônico, sulfato, ácido fosfônico, fosfato e fosfonato, seja desprotegidos ou protegidos conforme necessário, conforme conhecido daqueles peritos na especialidade, por exemplo, conforme ensinado em T.W. Greene e P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3<sup>a</sup> edição, John Wiley & Sons, 1999.

O termo "arilóxido," como é usado no presente documento, e a não ser que de outro modo especificado, refere-se a fenóxido substituído ou não substituído (PhO-), p-fenil-fenóxido (p-Ph-PhO-), ou naftóxido, preferentemente o termo arilóxido refere-se a fenóxido substituído ou não substituído. O grupo arilóxido pode ser substituído com uma ou mais frações selecionadas a partir dentre hidroxilo, F, Cl, Br, I, -C(O)(alquilo de cadeia curta), -C(O)O(alquilo de cadeia curta), amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfônico, sulfato, ácido fosfônico, fosfato, e fosfonato, não protegido, ou protegido conforme for necessário, como é conhecido aos peritos na especialidade, por exemplo, como ensinado em T.W. Greene e P.G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, 1999.

O termo "preparação" ou "forma farmacêutica" destina-se a incluir ambas as formulações sólidas e líquidas do composto ativo e um perito na especialidade apreciará que um ingrediente ativo pode existir em diferentes preparações dependendo da dose desejada e parâmetros farmacocinéticos.

O termo "excipiente" como é usado no presente documento refere-se a um composto que é usado para preparar uma composição farmacêutica, e é geralmente segura, não tóxica e não é biologicamente nem de outro modo indesejável, e inclui excipientes que são aceitáveis para

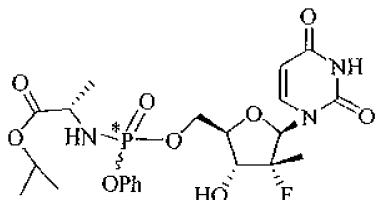
utilização veterinária bem como utilização farmacêutica humana.

O termo "cristalino" refere-se a uma situação onde uma amostra sólida de  $S_P\text{-4}$  ou  $R_P\text{-4}$  tem características cristalinas quando determinado por difração de raios X de pó ou uma técnica de raios X de cristal único.

O termo "semelhante a cristal" refere-se a uma situação onde uma amostra sólida de  $S_P\text{-4}$  ou  $R_P\text{-4}$  tem características cristalinas quando determinado por um meio, por exemplo, visualmente ou por meio de microscopia óptica ou polarizante, mas não tem características cristalinas quando determinado por outro meio, por exemplo, difração de raios X de pó. Métodos de determinar visualmente a cristalinidade de uma amostra sólida por meio visual ou por meio de microscopia óptica ou polarizante são revelados em USP <695> e <776>. Uma amostra sólida de  $S_P\text{-4}$  ou  $R_P\text{-4}$  que é "semelhante a cristal" pode ser cristalina sob certas condições, mas pode tornar-se não cristalina, quando submetida a outras condições.

O termo "amorfo" refere-se a uma situação onde uma amostra sólida de  $S_P\text{-4}$  ou  $R_P\text{-4}$  não é nem cristalina nem semelhante a cristal.

Revela-se no presente documento um composto representado pela fórmula 4:

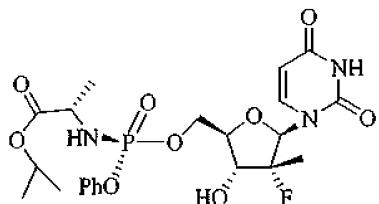


4

em que  $P^*$  representa um átomo de fósforo quiral. Devido ao átomo de fósforo quiral, o composto representado pela fórmula 4 comprehende dois diastereómeros designados como  $R_P\text{-4}$  e  $S_P\text{-4}$ . O composto representado pela fórmula 4 pode também ser parte de um solvato, um hidrato, ou um solvato/hidrato misturado. O solvato é designado como  $4 \cdot nS$ ,

enquanto o hidrato é designado como  $\mathbf{4} \cdot mH_2O$ , onde S é um solvente em rede, n varia numa quantidade de número inteiro ou número não inteiro de cerca de 0 a cerca de 3 e m varia numa quantidade de número inteiro ou número não inteiro de cerca de 0 a cerca de 5. Finalmente, o composto representado pela fórmula **4** poderia não existir como um solvato ou hidrato, mas têm uma certa quantidade vantajosa de solvente adsorvido (S) ou água. Em cujo caso, a quantidade de S ou água pode variar de cerca de 0 % em peso a cerca de 10 % em peso com base no peso do composto representado pela fórmula **4**. O composto representado pela fórmula **4** e seus solvatos e hidratos do mesmo é cristalino, semelhante a cristal, ou amorfo.

Também se revela no presente documento um composto representado pela fórmula  $R_P\text{-4}$ :

 $R_P\text{-4}$ 

O composto representado pela fórmula  $R_P\text{-4}$  pode também ser parte de um solvato, um hidrato, ou um solvato/hidrato misturado. O solvato é designado como  $R_P\text{-4} \cdot nS$ , enquanto o hidrato é designado como  $S_P\text{-4} \cdot mH_2O$ , onde S é um solvente em rede, n varia numa quantidade de número inteiro ou número não inteiro de cerca de 0 a cerca de 3 e m varia numa quantidade de número inteiro ou número não inteiro de cerca de 0 a cerca de 5. Finalmente, o composto representado pela fórmula  $R_P\text{-4}$  poderia não existir como um solvato, hidrato, ou solvato/hidrato misturado, mas têm uma certa quantidade vantajosa de solvente adsorvido (S), água, ou ambos S e água. Em cujo caso, a quantidade de S ou água pode variar de cerca de 0 % em peso a cerca de 10 % em peso com base no peso do composto representado pela fórmula  $R_P\text{-4}$ . O composto

representado pela fórmula  $R_P\text{-}4$  e seus solvatos e hidratos do mesmo é cristalino, semelhante a cristal, ou amorfo.

Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  cristalino.

Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  cristalino que tem reflexões  $2\theta$  de XRPD ( $^{\circ}$ ) em cerca de: 6,6, 7,1, 9,0, 11,6, 17,9, 20,7, 24,1, 24,4, e 26,2.

Também se revela no presente documento um  $R_P\text{-}4$  cristalino que tem reflexões  $2\theta$  de XRPD ( $^{\circ}$ ) em cerca de: 6,6, 7,1, 9,0, 11,0, 11,6, 12,0, 16,0, 17,9, 19,6, 20,7, 21,0, 21,7, 21,9, 22,2, 23,1, 24,1, 24,4, 26,1, 27,3, 27,7, e 28,2.

Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  cristalino que tem um padrão de difração de XRPD substancialmente como mostrado na Fig. 2.

Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  que tem os seguintes picos de FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1742, 1713, 1679, 1460, 1377, 1259, 1157, e 1079.

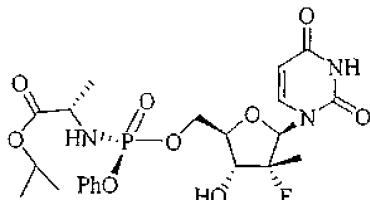
Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  que tem um espetro de FT-IR substancialmente como mostrado na Fig. 15.

Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  substancialmente puro.

Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  substancialmente puro cristalino.

Também se revela no presente documento  $R_P\text{-}4$  substancialmente puro amorfo.

Revela-se no presente documento um composto representado pela fórmula  $S_P\text{-}4$ :



$S_P\text{-}4$

O composto representado pela fórmula  $S_P\text{-}4$  pode também

ser parte de um solvato, um hidrato, ou um solvato/hidrato misturado. O solvato é designado como  $S_{\text{P-4}} \cdot nS$ , enquanto o hidrato é designado como  $S_{\text{P-4}} \cdot mH_2O$ , onde S é um solvente em rede, n varia numa quantidade de número inteiro ou número não inteiro de cerca de 0 a cerca de 3 e m varia numa quantidade de número inteiro ou número não inteiro de cerca de 0 a cerca de 5. Finalmente, o composto representado pela fórmula  $S_{\text{P-4}}$  poderia não existir como um solvato ou hidrato, mas têm uma certa quantidade vantajosa de solvente adsorvido (S) ou água. Em cujo caso, a quantidade de S ou água pode variar de cerca de 0 % em peso a cerca de 10 % em peso com base no peso do composto representado pela fórmula  $S_{\text{P-4}}$ . O composto representado pela fórmula  $S_{\text{P-4}}$  e seus solvatos e hidratos do mesmo é cristalino, semelhante a cristal, ou amorfo.

Também se revela no presente documento  $S_{\text{P-4}}$  cristalino.

Também se revela no presente documento um  $S_{\text{P-4}}$  monoclinico cristalino, preferentemente que tem os seguintes parâmetros de célula unitária um  $\sim 12,88 \text{ \AA}$ , b  $\sim 6,17 \text{ \AA}$ , c  $\sim 17,73 \text{ \AA}$ , e  $\beta \sim 92,05^\circ$ .

Também se revela no presente documento um  $S_{\text{P-4}}$  monoclinico cristalino, preferentemente que tem os seguintes parâmetros de célula unitária um  $\sim 20,09 \text{ \AA}$ , b  $\sim 6,10 \text{ \AA}$ , c  $\sim 23,01 \text{ \AA}$ , e  $\beta \sim 112,29^\circ$ .

Também se revela no presente documento um  $S_{\text{P-4}}$  monoclinico cristalino, preferentemente que tem os seguintes parâmetros de célula unitária um  $\sim 12,83 \text{ \AA}$ , b  $\sim 6,15 \text{ \AA}$ , c  $\sim 17,63 \text{ \AA}$ , e  $\beta \sim 91,75^\circ$ .

Também se revela no presente documento um  $S_{\text{P-4}}$  monoclinico cristalino, preferentemente que tem os seguintes parâmetros de célula unitária um  $\sim 12,93 \text{ \AA}$ , b  $\sim 6,18 \text{ \AA}$ , c  $\sim 18,01 \text{ \AA}$ , e  $\beta \sim 96,40^\circ$ .

Também se revela no presente documento um  $S_{\text{P-4}}$  cristalino que tem reflexões 2θ de XRPD ( $^\circ$ ) em cerca de:

5,2, 7,5, 9,6, 16,7, 18,3, 22,2.

Também se revela no presente documento um **S<sub>P</sub>-4** cristalino que tem reflexões 2θ de XRPD (°) em cerca de: 5,0, 7,3, 9,4, e 18,1.

Também se revela no presente documento um **S<sub>P</sub>-4** cristalino que tem reflexões 2θ de XRPD (°) em cerca de: 4,9, 6,9, 9,8, 19,8, 20,6, 24,7, e 26,1.

Também se revela no presente documento um **S<sub>P</sub>-4** cristalino que tem reflexões 2θ de XRPD (°) em cerca de: 6,9, 9,8, 19,7, 20,6, e 24,6.

Também se revela no presente documento um **S<sub>P</sub>-4** cristalino que tem reflexões 2θ de XRPD (°) em cerca de: 5,0, 6,8, 19,9, 20,6, 20,9, e 24,9.

Também se revela no presente documento um **S<sub>P</sub>-4** cristalino que tem reflexões 2θ de XRPD (°) em cerca de: 5,2, 6,6, 7,1, 15,7, 19,1, e 25,0.

Também se revela no presente documento **S<sub>P</sub>-4** cristalino que tem um padrão de difração de XRPD substancialmente como mostrado em qualquer um de Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, e Fig. 8.

Também se revela no presente documento **S<sub>P</sub>-4** que tem os seguintes picos de FT-IR (cm<sup>-1</sup>) em cerca de: 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208, e 1082.

Também se revela no presente documento **S<sub>P</sub>-4** que tem um espetro de FT-IR substancialmente como mostrado na Fig. 7.

Também se revela no presente documento **S<sub>P</sub>-4** substancialmente puro.

Também se revela no presente documento **S<sub>P</sub>-4** substancialmente puro cristalino.

Também se revela no presente documento **S<sub>P</sub>-4** substancialmente puro amorfo.

#### *Dosagem, Administração, e Utilização*

Uma composição para o tratamento e/ou profilaxia de quaisquer dos agentes virais pode ser preparada usando quaisquer dos compostos 4, **R<sub>P</sub>-4**, ou **S<sub>P</sub>-4**. Os agentes virais

possíveis incluem, mas não estão limitados a: vírus da hepatite C, vírus da hepatite B, vírus da hepatite A, vírus West Nile, vírus da febre amarela, vírus do dengue, rinovírus, vírus da poliomielite, vírus da diarreia viral bovina, vírus da encefalite japonesa, ou os vírus pertencentes aos grupos de Pestivírus, hepacivírus, ou flavivírus.

Uma composição para o tratamento de quaisquer dos agentes virais revelados no presente documento é descrita no presente documento, a dita composição compreende um meio farmaceuticamente aceitável selecionado dentre um excipiente, veículo, diluente, e meio equivalente e quaisquer dos compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4, que é destinado a incluir seus hidratos, solvatos, e quaisquer formas cristalinas de quaisquer dos compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 ou seus hidratos e solvatos dos mesmos.

Os compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 podem ser independentemente formulados numa ampla variedade de formas farmacêuticas de administração oral e veículos. A administração oral pode ser feita na forma de comprimidos, comprimidos revestidas, cápsulas de gelatina moles e duras, soluções, emulsões, xaropes ou suspensões. Os compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 são eficazes quando administrado por administração por supositório, entre outras vias de administração. A forma de administração mais conveniente é geralmente a oral utilizando um regime de dosagem diária conveniente que pode ser ajustado de acordo com a severidade da doença e da resposta do paciente à medicação antiviral.

Os compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 juntamente com um ou mais excipientes, veículos ou diluentes convencionais, podem ser colocados na forma de composições farmacêuticas e dosagens unitárias. As formas de composições farmacêuticas e de dosagens unitárias podem ser compreendidas de ingredientes convencionais em proporções convencionais, com

ou sem compostos ativos adicionais e as formas farmacêuticas unitárias podem conter qualquer quantidade eficaz adequada do ingrediente ativo em igual medida com o intervalo de dosagem diário pretendido a ser utilizado. As composições farmacêuticas podem ser utilizadas como sólidos, tais como comprimidos ou cápsulas cheias, semissólidos, pós, formulações de libertação prolongada ou líquidos, tais como suspensões, emulsões ou cápsulas cheias para utilização oral; ou na forma de supositórios para administração retal ou vaginal. Uma preparação típica conterá cerca de 5 % a cerca de 95 % de composto ou compostos (p/p) ativos.

Os compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 podem ser administrados em separado, mas será geralmente administrado misturado com um ou mais excipientes, diluentes ou veículos farmacêuticos adequados selecionados em relação à via de administração pretendida e a prática farmacêutica convencional.

Preparações em forma sólida incluem, por exemplo, pós, comprimidos, pastilhas, cápsulas, supositórios e grânulos dispersáveis. Um veículo sólido pode ser uma ou mais substâncias que também podem atuar como diluentes, agentes aromatizantes, solubilizadores, lubrificantes, agentes de suspensão, ligantes, conservantes, agentes desintegrantes de comprimidos ou um material encapsulante. Em pós, o veículo geralmente é um sólido finamente dividido que é uma mistura com o componente ativo finamente dividido. Nos comprimidos, o componente ativo é geralmente misturado com o veículo com a necessária capacidade de ligação em proporções adequadas e compactadas na forma e tamanho desejados. Veículos adequados incluem, mas não se limitam a, carbonato de magnésio, estearato de magnésio, talco, açúcar, lactose, pectina, dextrina, amido, gelatina, tragacanto, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, uma cera com baixa fusão, manteiga de cacau e semelhantes. Preparações de forma sólida podem conter, além do

componente ativo, corantes, aromatizantes, estabilizadores, tampões, adoçantes artificiais e naturais, dispersantes, espessantes, agentes solubilizadores e semelhantes. Exemplos de formulações sólidas são exemplificados no documento EP 0524579; documento US 2002/0142050; documento US 2004/0224917; documento US 2005/0048116; documento US 2005/0058710; documento US 2006/0034937; documento US 2006/0057196; documento US 2006/0188570; documento US 2007/0026073; documento US 2007/0059360; documento US 2007/0077295; documento US 2007/0099902; documento US 2008/0014228; documento US 6.267.985; documento US 6.294.192; documento US 6.383.471; documento US 6.395.300; documento US 6.569.463; documento US 6.635.278; documento US 6.645.528; documento US 6.923.988; documento US 6.932.983; documento US 7.060.294; e documento US 7.462.608.

As formulações líquidas que também são adequadas para administração oral incluem formulação líquida incluindo emulsões, xaropes, elixires e suspensões aquosas. Estas incluem preparações de forma sólida que se pretende que sejam convertidas em preparações de forma líquida brevemente antes de utilização. Exemplos de formulação líquida são exemplificados nas Patentes US Nº 3.994.974; 5.695.784; e 6.977.257. Emulsões podem ser preparadas em soluções, por exemplo, em soluções de propilenoglicol aquosas ou podem conter agentes emulsionantes, tais como lecitina, monooleato de sorbitano ou acácia. Suspensões aquosas podem ser preparadas dispersando o componente ativo finamente dividido em água com material viscoso, tal como gomas naturais ou sintéticas, resinas, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e outros agentes de suspensão bem conhecidos.

Os compostos 4, R<sub>P-4</sub>, ou S<sub>P-4</sub> podem ser independentemente formulados para a administração como supositórios. Uma cera com baixa fusão, tal como uma

mistura de glicéridos de ácidos gordos ou manteiga de cacau é primeiro derretida e o componente ativo é disperso homogeneamente, por exemplo, agitando. A mistura homogénea derretida é depois vertida em moldes de tamanho conveniente, permitida arrefecer e solidificar.

Os compostos **4**, **R<sub>P</sub>-4**, ou **S<sub>P</sub>-4** podem ser independentemente formulados para administração vaginal. Pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou vaporizadores contendo além do ingrediente ativo tais veículos conforme são conhecidos na especialidade como sendo apropriados. Certas destas formulações podem também ser usadas em conjunto com um preservativo com ou sem um agente espermicida.

As formulações adequadas juntamente com excipientes, diluentes e veículos farmacêuticos são descritas em Remington: The Science e Practice of Farmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19<sup>a</sup> edição, Easton, Pensilvânia. Um cientista de formulação habilitado pode modificar as formulações dentro dos ensinamentos da especificação para providenciar numerosas formulações para uma via de administração particular sem tornar as composições que contêm os compostos contemplados no presente documento instáveis ou comprometer sua atividade terapêutica.

Adicionalmente, os compostos purificados **4**, **R<sub>P</sub>-4**, ou **S<sub>P</sub>-4** podem ser independentemente formulados em conjunto com lipossomas ou micelas. Como lipossomas, é contemplado que os compostos purificados possam ser formulados numa maneira conforme revelado nas Patentes US 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; e 7.070.801. Como micelas, é

contemplado que os compostos purificados possam ser formulados numa maneira conforme revelado nas Patentes US N° 5.145.684 e 5.091.188.

Quaisquer dos compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 podem ser usados no fabrico de um medicamento para o tratamento de qualquer condição o resultado de uma infecção por qualquer um dos seguintes agentes virais: vírus da hepatite C, vírus West Nile, vírus da febre amarela, vírus da dengue, rinovírus, poliovírus, vírus da hepatite A, vírus da diarreia viral bovina e Vírus da encefalite japonesa.

O termo "medicamento" significa uma substância usado num método de tratamento e/ou profilaxia de um indivíduo em necessidade do mesmo, em que a substância inclui, mas não se limita a, uma composição, uma formulação, uma forma farmacêutica, e semelhantes, que compreende quaisquer dos compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4. A utilização de quaisquer dos compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 no fabrico de um medicamento, para o tratamento de qualquer das condições antivirais reveladas no presente documento, em separado ou em combinação com um outro composto revelado no presente documento, é contemplada. Um medicamento inclui, mas não é limitado a, qualquer uma das composições contempladas pela quarta forma de realização revelada no presente documento.

Um método de tratamento e/ou profilaxia num sujeito em necessidade do mesmo é também revelado, o dito método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de quaisquer dos compostos 4, R<sub>P</sub>-4, ou S<sub>P</sub>-4 ao indivíduo.

Pretende-se que um indivíduo em necessidade do mesmo seja um que tenha qualquer condição o resultado de uma infecção por quaisquer dos agentes virais revelados no presente documento, que inclui, mas não é limitado a, vírus da hepatite C, vírus West Nile, vírus da febre amarela, vírus da dengue, rinovírus, poliovírus, vírus da hepatite A, vírus da diarreia viral bovina ou Vírus da encefalite

japonesa, vírus flaviviridae ou pestivírus ou hepaciviruses ou um agente viral que causa sintomas equivalentes ou comparáveis a qualquer dos vírus listados acima.

O termo "indivíduo" significa um mamífero, que inclui, mas não é limitado a, gado, porcos, ovelhas, frangos, perus, búfalos, lamas, avestruz, cães, gatos e seres humanos, de preferência, o indivíduo é um ser humano. É contemplado que no método de tratamento de um indivíduo do mesmo da nona forma de realização pode ser qualquer dos compostos contemplados no presente documento, em separado ou em combinação com um outro composto revelado no presente documento.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz", conforme utilizado aqui, significa uma quantidade necessária para reduzir os sintomas de doença num indivíduo. A dose será ajustada aos requisitos individuais em cada caso particular. Essa dosagem pode variar dentro de limites amplos dependendo de numerosos fatores, tais como a severidade da doença a ser tratada, a idade e estado de saúde geral do paciente, outros medicamentos com os que o paciente está a ser tratado, a via e forma de administração e as preferências e experiência do profissional médico envolvido. Para administração oral, uma dosagem diária de entre cerca de 0,001 e cerca de 10 g, incluindo todos os valores entre, tal como 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,050, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,175, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, e 9,5, por dia deveriam ser apropriados em monoterapêutica e/ou em terapêutica de combinação. Uma dosagem diária particular é entre cerca de 0,01 e cerca de 1 g por dia, incluindo todos os valores incrementais de 0,01 g (isto é, 10 mg) entre, uma dosagem diária preferida de cerca de 0,01 e cerca de 0,8 g por dia, mais preferentemente cerca de 0,01 e cerca de 0,6 g por dia, e o mais preferível cerca de 0,01 e cerca de 0,25 g por dia,

cada de que incluindo todos os valores incrementais de 0,01 g em entre. Em geral, o tratamento é iniciado com uma grande "dose de carga" inicial para reduzir ou eliminar rapidamente o vírus seguido da diminuição da dose para um nível suficiente para prevenir reincidência da infecção. Um perito ordinário no tratamento de doenças descritas aqui será capaz, sem experimentação indevida e com base no conhecimento, experiência e nas revelações deste pedido, de verificar a quantidade terapeuticamente eficaz do composto revelado no presente documento for um dado doença e paciente.

A eficácia terapêutica pode ser verificada a partir de testes da função hepática incluindo, mas não limitado a, níveis proteicos, tais como de proteínas do soro (por exemplo, albumina, fatores de coagulação, fosfatase alcalina, aminotransferases (por exemplo, alanina transaminase, aspartato transaminase), 5'-nucleosidase, γ-glutamyltranspeptidase, etc.), síntese de bilirrubina, síntese de colesterol e síntese de ácidos biliares; uma função metabólica hepática, incluindo, mas não limitada a, metabolismo do hidrato de carbono, metabolismo do aminoácido e amónia. Em alternativa, a eficácia terapêutica pode ser monitorizada medindo ARN do HCV. Os resultados destes testes permitirão optimizar a dose.

Um método de tratamento e/ou profilaxia num indivíduo em necessidade do mesmo é revelado, em que o dito método comprehende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto representado por quaisquer dos compostos **4**, **R<sub>P</sub>-4**, ou **S<sub>P</sub>-4** e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um outro agente antiviral; em que a administração é concorrente ou alternativa. É entendido que o tempo entre a administração alternativa pode variar entre 1-24 horas, que inclui qualquer sub-intervalo entre os mesmos incluindo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, e 23

horas.

Exemplos de “outro agente antiviral” incluem, mas não se limitam a: inibidores de protease NS3 do VHC (veja-se documento EP 1881001, documento US 2003187018, documento US 2005267018, documento WO 2003006490, documento WO 200364456, documento WO 2004094452, documento WO 2005028502, documento WO 2005037214, documento WO 2005095403, documento WO 2007014920, documento WO 2007014921, documento WO 2007014922, documento WO 2007014925, documento WO 2007014926, documento WO 2007015824, documento WO 2008010921, e documento WO 2008010921); Inibidores de protease NS5B do VHC (veja-se documento US 2004229840, documento US 2005154056, documento US 2005-98125, documento US 20060194749, documento US 20060241064, documento US 20060293306, documento US 2006040890, documento US 2006040927, documento US 2006166964, documento US 2007275947, documento US 6784166, US20072759300, documento WO 2002057287, documento WO 2002057425, documento WO 2003010141, documento WO 2003037895, documento WO 2003105770, documento WO 2004000858, documento WO 2004002940, documento WO 2004002944, documento WO 2004002977, documento WO 2004003138, documento WO 2004041201, documento WO 2004065367, documento WO 2004096210, documento WO 2005021568, documento WO 2005103045, documento WO 2005123087, documento WO 2006012078, documento WO 2006020082, documento WO 2006065335, documento WO 2006065590, documento WO 2006093801, documento WO 200702602, documento WO 2007039142, documento WO 2007039145, documento WO 2007076034, documento WO 2007088148, documento WO 2007092000, e documento WO2007095269); inibidores de protease NS4 do VHC (veja-se documento WO 2005067900 e documento WO 2007070556); Inibidores de protease NS5a do VHC (veja-se documento US 2006276511, documento WO 2006035061, documento WO

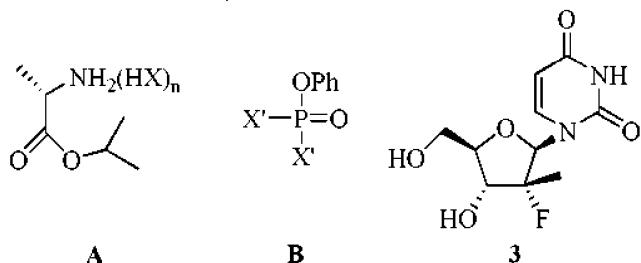
2006100310, documento WO 2006120251, e documento WO 2006120252); agonistas do recetor do tipo Toll (veja-se documento WO 2007093901); e outros inibidores (veja-se documento WO 2000006529, documento WO 2003101993, documento WO 2004009020, documento WO 2004014313, documento WO 2004014852, e documento WO 2004035571); e compostos revelados no Pedido de Patente US N° 12/053,015, depositado em 21 de Março de 2008 (documento US 2010/0016251), interferão- $\alpha$ , interferão- $\beta$ , interferão- $\alpha$  pegilado, ribavirina, levovirina, viramidina, outro inibidor de HCV polimerase nucleosídico, um inibidor de HCV polimerase não nucleosídico, um inibidor de HCV protease, um inibidor de HCV helicase ou um inibidor de fusão de HCV.

Quando quaisquer dos compostos 4, R<sub>P-4</sub>, ou S<sub>P-4</sub> são administrados em combinação com outro agente antiviral, a atividade pode ser aumentada em relação ao composto parental. Quando o tratamento é terapêutica de combinação, tal administração pode ser concorrente ou sequencial em relação à dos derivados de nucleósidos. "Administração concorrente", conforme é utilizado no presente documento, inclui assim administração dos agentes simultânea ou em diferentes tempos. A administração de dois ou mais agentes ao mesmo tempo pode ser conseguida por uma única formulação contendo dois ou mais ingredientes ativos ou pela administração substancialmente simultânea de duas ou mais formas de dosagem com um único agente ativo.

Será entendido que as referências no presente documento ao tratamento se estendem à profilaxia, bem como ao tratamento das condições existentes. Além disso, o termo "tratamento" de uma infecção por HCV, conforme é utilizado no presente documento, também inclui tratamento ou profilaxia de uma doença ou de uma condição associada com ou mediada pela infecção por HCV ou os sintomas clínicos da mesma.

### Preparação

A presente invenção proporciona um processo para preparar 4, ou um diastereómero à base de fósforo do mesmo ( $R_P\text{-}4$  ou  $S_P\text{-}4$ ), que compreende: a) fazer reagir um isopropil-alanato, **A**, um di- $X'$ -fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, e uma base para obter uma primeira mistura que compreende 4, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo;



em que  $X$  é uma base de conjugado de um ácido,  $n$  é 0 ou 1, e  $X'$  é um halogénio; b) fazer reagir a primeira mistura com um composto de proteção para obter uma segunda mistura que compreende 4, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo, em que o composto de proteção é selecionado a partir de um composto de proteção de t-butildimetsilsílico e um composto de proteção de dimetoxitrifenilmetilo; e c) submeter opcionalmente a segunda mistura a cristalização, cromatografia, ou extração com a finalidade de obter 4, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo.

De acordo com uma forma de realização, o alanato de isopropilo está presente como seu sal de ácido clorídrico, que é preferentemente anidro.

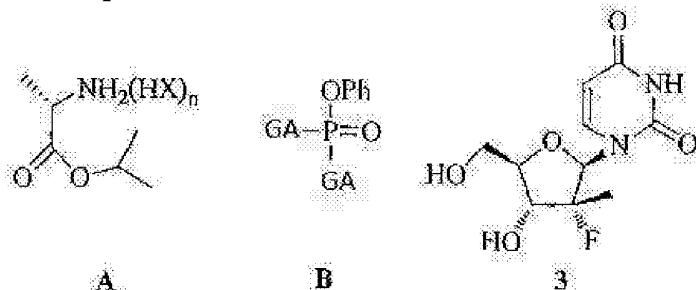
De acordo com uma forma de realização, a base é N-metilimidazol.

De acordo com uma forma de realização, a razão molar de A-a-B-a-3 é 1,6-a-1,3-a-1.

De acordo com uma forma de realização, o composto de proteção é cloreto de t-butildimetsilsílico.

Também é revelado no presente documento um processo para preparar  $S_P\text{-}4$  ou  $R_P\text{-}4$ , que compreende:

a) fazer reagir um isopropil-alanato, **A**, um di-GA-fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, e uma base para obter uma primeira mistura que compreende pelo menos um de  $S_P\text{-4}$  e  $R_P\text{-4}$



em que X é uma base de conjugado de um ácido, n é 0 ou 1, e GA é um grupo abandonante; e

b) submeter opcionalmente a segunda mistura a cristalização, cromatografia, ou extração com a finalidade de obter  $S_P\text{-4}$  ou  $R_P\text{-4}$  purificado.

Um processo para preparar  $R_P\text{-4}$  pode incluir adicionalmente purificar ainda a segunda mistura ou o  $R_P\text{-4}$  purificado por meio de dissolução ou suspensão da segunda mistura ou a mistura de  $R_P\text{-4}$  purificado num solvente; opcionalmente seguido de semear com  $R_P\text{-4}$  cristalino; e adicionar suficiente antissolvente para obter  $R_P\text{-4}$  cristalino.

Um processo para preparar  $S_P\text{-4}$  pode incluir adicionalmente purificar ainda a segunda mistura ou o  $S_P\text{-4}$  purificado por meio de d) dissolução ou suspensão da segunda mistura ou o  $S_P\text{-4}$  purificado num solvente seguido de semear com  $S_P\text{-4}$  cristalino em cerca da temperatura ambiente; colher um primeiro sólido a maioria do qual compreende  $S_P\text{-4}$ ; dissolver o primeiro sólido num solvente na sua temperatura de refluxo; e arrefecer ou adicionar um antissolvente para obter um segundo sólido.

Um processo para a preparação de  $S_P\text{-4}$  pode incluir adicionalmente purificar ainda  $S_P\text{-4}$  por meio de d) dissolução ou suspensão da segunda mistura ou a mistura de  $S_P\text{-4}$  purificado num primeiro solvente seguido de adição de

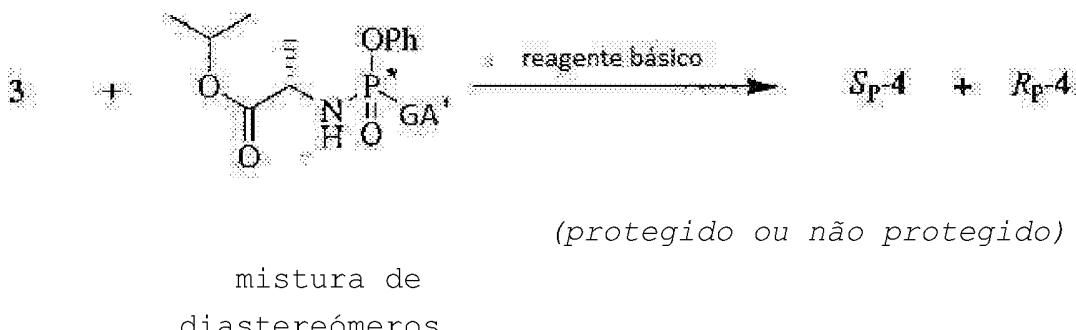
um antissolvente de modo a obter uma primeira composição em que o solvente/antissolvente residual é removido por meio de decantação para obter um resíduo; tratar o resíduo com uma solução que contém o primeiro solvente e antissolvente para produzir uma segunda composição de acordo com o qual após reduzir a pressão propicia um primeiro sólido; dissolver ou suspender o primeiro sólido usando um segundo solvente de modo a obter uma terceira composição; adicionar sementes de cristal de **S<sub>P</sub>-4** à terceira composição; colher um segundo sólido; dissolver ou suspender o segundo sólido num terceiro solvente, opcionalmente aquecido à temperatura de refluxo do terceiro solvente para obter uma quarta composição, e, se for necessário, arrefecer a quarta composição para obter um terceiro sólido que compreende **S<sub>P</sub>-4** que é colhido por meio de filtração.

Num processo para a preparação de **S<sub>P</sub>-4**, **S<sub>P</sub>-4** pode ser purificado ainda da segunda mistura ou o **S<sub>P</sub>-4** purificado por meio de d) adicionar sílica gel à segunda mistura ou o **S<sub>P</sub>-4** purificado seguido de evaporação de solvente para proporcionar uma suspensão seca; agitar a suspensão seca numa primeira combinação de solvente/antissolvente para obter uma primeira suspensão húmida; decantar a primeira combinação de solvente/antissolvente da primeira suspensão húmida para obter uma segunda suspensão húmida e uma primeira composição; adicionar à segunda suspensão húmida uma segunda combinação de solvente/antissolvente seguido de agitação; decantar a segunda combinação de solvente/antissolvente da segunda suspensão húmida para obter uma terceira suspensão húmida e uma segunda composição; repetir opcionalmente as etapas g)-h) na terceira suspensão húmida ou suspensões húmidas adicionais; evaporar o solvente da segunda composição, e opcionalmente qualquer composição adicional obtido a partir da etapa opcional i) para obter um primeiro sólido; dissolver ou suspender o primeiro sólido numa solução que contém um

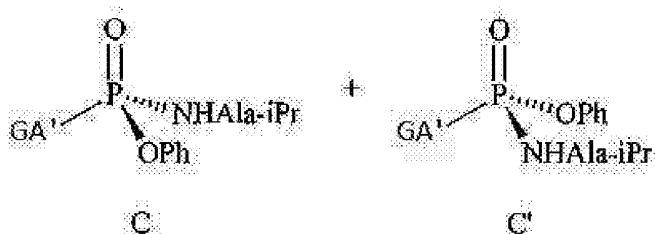
terceiro solvente e opcionalmente um quarto solvente para obter uma terceira composição; adicionar opcionalmente sementes de cristal de  $S_P\text{-4}$  à terceira composição; obter da terceira composição um segundo sólido que compreende  $S_P\text{-4}$ ; e recristalizar opcionalmente o segundo sólido usando um terceiro solvente para obter um terceiro sólido que compreende  $S_P\text{-4}$ .

Um perito ordinário apreciará que os compostos podem ser separados por meio de extração tradicional, cristalização tradicional ou técnicas cromatográficas tradicionais. As técnicas cromatográficas tradicionais incluem, mas não se limitam a, cromatografia em sílica gel (usando, por exemplo, 3-5 % de metanol em DCM ou 4-6 % de isopropanol em DCM) para produzir níveis aumentados de um isómero (50-100 %) e, em seguida, cristaliza-lo. Alternativamente, poderia ser usado cromatografia de fase reversa (usando, por exemplo, 1-30 % de acetonitrilo-fase móvel aquosa). Além disso, os compostos podem ser isolados por meio de cromatografia de fluido supercrítico SFC com dióxido de carbono como o solvente principal e alcoóis tais como metanol como um modificador, preferentemente usando os meios quirais apropriados, tais como, Daicel Chiralpack IA. Alternativamente, cromatografia de SMB pode ser utilizada usando os meios quirais apropriados, tais como, Daicel ChiralPack IA, usando uma mistura de solventes tais como hexanos/isopropanol ou solventes únicos tal como acetato de etilo.

Também se revela no presente documento um processo para preparar  $S_P\text{-4}$ , que compreende: a) fazer reagir um isopropil-alanil-fosforamidato com um 3'-O-protégido ou não protégido, e um reagente básico para obter uma composição que compreende  $S_P\text{-4}$  protégido ou não protégido



em que o isopropil-alanil-fosforamidato está compreendido de uma mistura de diastereómeros representado pelas seguintes estruturas:



em que a razão de C:C' é de cerca de 1:1.

O reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio e a razão de C:C' pode ser maior que ou igual a cerca de 1:1.

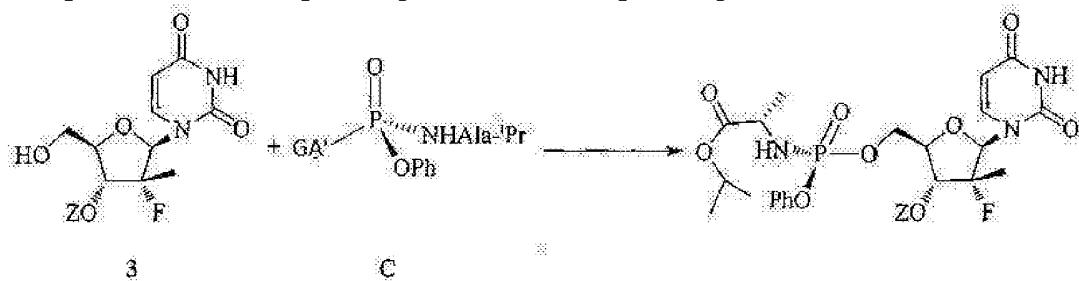
O reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio e a razão de C:C' pode ser maior que cerca de 1:1.

O reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio e a razão C:C' pode ser pelo menos cerca de 1,5:1, cerca de 2,3:1, cerca de 4:1, cerca de 5,7:1, cerca de 9:1, cerca de 19:1, cerca de 32,3:1, cerca de 49:1, ou cerca de 99:1.

GA' pode ser p-nitrofenóxido, o reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio, e a razão de C:C' pode ser pelo menos cerca de 1,5:1, cerca de 2,3:1, cerca de 4:1, cerca de 5,7:1, cerca de 9:1, cerca de 19:1, cerca de 32,3:1, cerca de 49:1, ou cerca de 99:1.

Um processo adicional para preparar S<sub>P</sub>-4 é revelado, e compreende: a) fazer reagir um isopropil-alanil-fosforamidato (C) com um 3'-O-protégido ou não protégido,

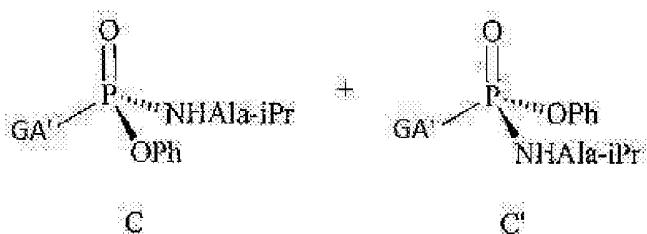
e um reagente básico para obter uma composição que compreende  $S_P\text{-4}$  protegido ou não protegido



em que Z é um grupo de proteção ou hidrogénio; GA' é um grupo abandonante; e b) submeter opcionalmente o  $S_P\text{-4}$  protegido ou não protegido obtido a cromatografia, extração, ou cristalização com a finalidade de obter  $S_P\text{-4}$  protegido ou não protegido purificado. GA' pode ser tosilato, canforsulfonato, ou um arilóxido substituído com pelo menos um grupo de remoção de eletrão; mais preferentemente, GA' pode ser selecionado a partir de entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, e pentafluorofenóxido. Quando  $S_P\text{-4}$  é protegido, isto é, Z não é hidrogénio, o processo pode incluir ainda a desproteção de  $S_P\text{-4}$  protegido. A reação pode ser conduzida num solvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano ou outro solvente etéreo um sendo em separado ou em combinação um com o outro ou com um C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> nitrilo, tal como acetonitrilo.

O processo pode compreender ainda 1) fazer reagir (GA')P(O)(GA)<sub>2</sub>, em que GA, independente de GA', é um grupo abandonante, com (i) isopropil-alanato e um primeiro base para obter (GA')P(O)(GA)(Ala-'Pr) seguido da reação de (GA')P(O)(GA)(Ala-'Pr) com fenol e uma segunda base para obter uma mistura que compreende **C** e **C'**, (ii) fenol e uma primeira base para obter (GA')P(O)(GA)(OPh) seguido da reação de (GA')P(O)(GA)(OPh) com isopropil-alanato e uma segunda base para obter uma mistura que compreende **C** e **C'**, ou (iii) combinar isopropil-alanato, fenol, e pelo menos uma base para obter uma mistura que compreende **C** e **C'**; ou

2) fazer reagir  $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{GA})_2$ , em que  $\text{GA}'$ , independente de  $\text{GA}$ , é um grupo abandonante, com (i) isopropil-alanato e uma primeira base para obter  $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{Ala-}'\text{Pr})$  seguido da reação de  $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{Ala-}'\text{Pr})$  com um precursor de grupo abandonante e uma segunda base para obter uma mistura que compreende **C** e **C'**,



e submeter a mistura a cromatografia ou cristalizar a mistura para obter C. O alanato de isopropilo pode estar presente como seu sal de ácido clorídrico, que é preferentemente, substancialmente anidro.

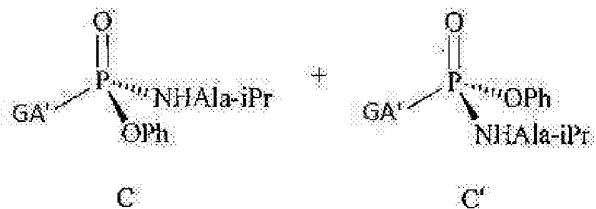
Um processo adicional para preparar  $R_{\text{P-4}}$  é revelado, que compreende: a) fazer reagir um isopropil-alanil-fosforamidato com um 3'-O-protégido ou não protégido 3, e um reagente básico para obter uma composição que compreende  $R_{\text{P-4}}$  protegido ou não protegido



(protégido ou não protégido)

mistura de  
diastereómeros

em que o isopropil-alanil-fosforamidato está compreendido de uma mistura de diastereómeros representada pelas seguintes estruturas:



em que a razão de **C'**:**C** é de cerca de 1:1.

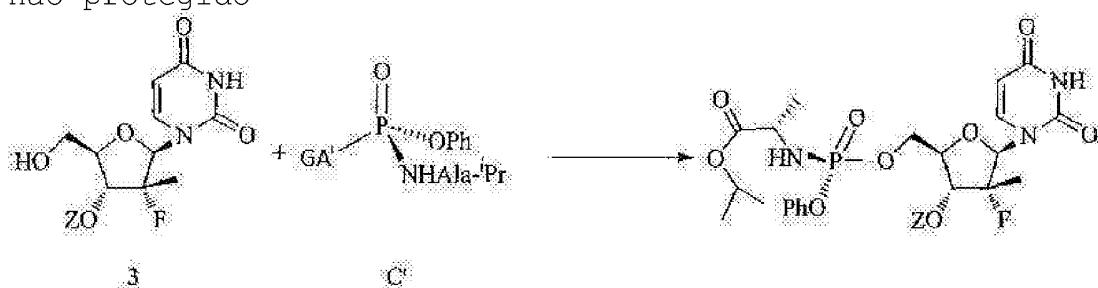
O reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio e a razão de **C'**:**C** pode ser maior que ou igual a cerca de 1:1.

O reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio e a razão de **C'**:**C** pode ser maior que cerca de 1:1.

O reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio e a razão de **C'**:**C** pode ser pelo menos cerca de 1,5:1, cerca de 2,3:1, cerca de 4:1, cerca de 5,7:1, cerca de 9:1, cerca de 19:1, cerca de 32,3:1, cerca de 49:1, ou cerca de 99:1.

O **GA'** pode ser p-nitrofenóxido, o reagente básico pode ser cloreto de t-butilmagnésio, e a razão de **C'**:**C** pode ser pelo menos cerca de 1,5:1, cerca de 2,3:1, cerca de 4:1, cerca de 5,7:1, cerca de 9:1, cerca de 19:1, cerca de 32,3:1, cerca de 49:1, ou cerca de 99:1.

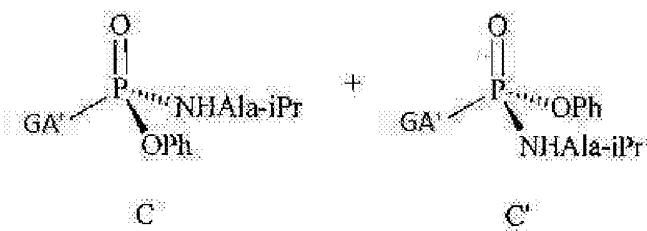
Um método adicional para preparar **R<sub>P</sub>-4** compreende: a) fazer reagir um isopropil-alanil-fosforamidato (**C'**) com um 3'-O-protégido ou não protegido, e um reagente básico para obter uma composição que compreende **R<sub>P</sub>-4** protegido ou não protegido



em que Z é um grupo de proteção ou hidrogénio; **GA'** é um grupo abandonante; e b) submeter opcionalmente o **R<sub>P</sub>-4** protegido ou não protegido obtido a cromatografia, extração, ou cristalização com a finalidade de obter

purificado  $R_P\text{-4}$  protegido ou não protegido.  $\text{GA}'$  pode ser tosilato, canforsulfonato, ou um arilóxido substituído com pelo menos um grupo de remoção de eletrão; mais preferentemente,  $\text{GA}'$  pode ser selecionado dentre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, e pentafluorofenóxido. Quando  $R_P\text{-4}$  é protegido, isto é,  $Z$  não é hidrogénio, o processo pode incluir ainda a desproteger  $R_P\text{-4}$  protegido. A reação pode ser conduzida num solvente aprótico polar, tal como, tetrahidrofurano ou outro solvente etéreo um sendo em separado ou em combinação um com o outro ou com um  $C_2$  a  $C_7$  nitrilo, tal como acetonitrilo.

O processo pode compreender ainda 1) fazer reagir  $(\text{GA}')\text{P}(\text{O})(\text{GA})_2$ , em que  $\text{GA}$ , independente de  $\text{GA}'$ , é um grupo abandonante, com (i) isopropil-alanato e uma primeira base para obter  $(\text{GA}')\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{Ala-Pr})$  seguido da reação de  $(\text{GA}')\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{Ala-Pr})$  com fenol e uma segunda base para obter uma mistura que compreende  $\text{C}$  e  $\text{C}'$ , (ii) fenol e uma primeira base para obter  $(\text{GA}')\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{OPh})$  seguido da reação de  $(\text{GA}')\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{OPh})$  com isopropil-alanato e uma segunda base para obter uma mistura que compreende  $\text{C}$  e  $\text{C}'$ , ou (iii) combinar isopropil-alanato, fenol, e pelo menos uma base para obter uma mistura que compreende  $\text{C}$  e  $\text{C}'$ ; ou 2) fazer reagir  $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{GA})_2$ , em que  $\text{GA}'$ , independente de  $\text{GA}$ , é um grupo abandonante, com (i) isopropil-alanato e uma primeira base para obter  $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{Ala-'}\text{Pr})$  seguido da reação de  $(\text{PhO})\text{P}(\text{O})(\text{GA})(\text{Ala-'}\text{Pr})$  com um precursor de grupo abandonante e uma segunda base para obter uma mistura que compreende  $\text{C}$  e  $\text{C}'$ ,

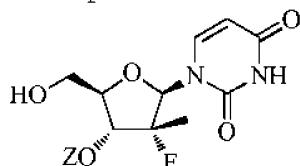


e submeter a mistura a cromatografia ou cristalizar a

mistura para obter C'. O alanato de isopropilo pode estar presente como seu sal de ácido clorídrico, que é preferentemente, substancialmente anidro.

Também é revelada no presente documento uma composição obtida pelos processos indicados acima. Também é revelada no presente documento uma composição obtida por qualquer uma das formas de realização exemplificadas reveladas a seguir. A composição assim obtida pode ser cristalina, do tipo cristal, amorfa, ou uma combinação dos mesmos.

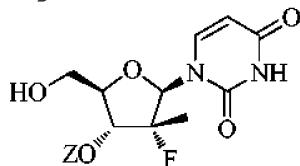
Também é revelado no presente documento um composto **3**



**3**

em que Z é um grupo de proteção ou hidrogénio; que é útil para a preparação de *R<sub>P</sub>-4* ou *S<sub>P</sub>-4*.

O composto **3** pode ser selecionado a partir de entre os compostos que têm as seguintes estruturas



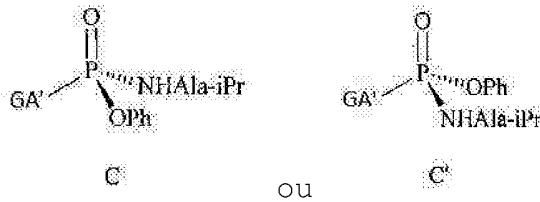
3a: Z = -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)CH<sub>3</sub>

3b: Z = -C(O)OCH<sub>2</sub>Ph

3c: Z = -Si(Me)<sub>2</sub>fBu

3d: Z = -Si(Pr)<sub>2</sub>OSi(Pr)<sub>2</sub>OH

Também é revelado um composto, seu sal, hidrato, solvato, ou combinação do mesmo, representado pelas seguintes estruturas

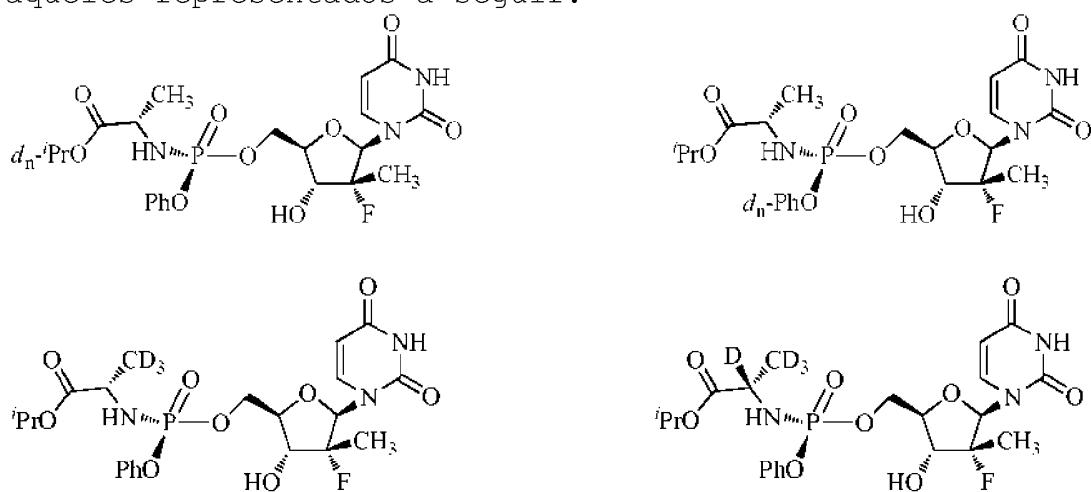


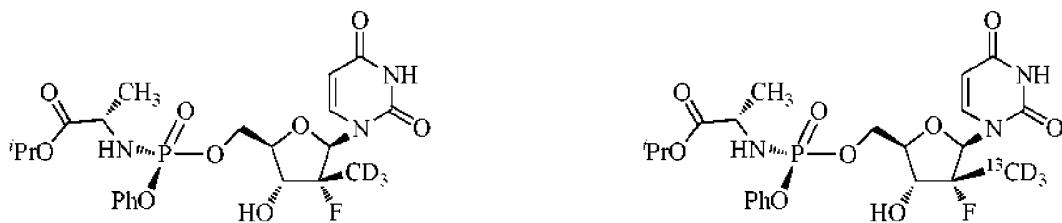
onde  $GA'$  é um grupo abandonante, que é útil para a preparação de  $R_P\text{-}4$  ou  $S_P\text{-}4$ .

$GA'$  pode ser tosilato, canforsulfonato, um arilóxido, ou um arilóxido substituído com pelo menos um grupo de remoção de eletrão.

$GA'$  pode ser selecionado a partir de entre p-nitrofenóxido, 2,4-dinitrofenóxido, e pentafluorofenóxido.

Também se revela no presente documento um análogo marcado isotopicamente de  $R_P\text{-}4$  ou  $S_P\text{-}4$ . O termo análogo "marcado isotopicamente" refere-se a um análogo de  $R_P\text{-}4$  ou  $S_P\text{-}4$  que é um "análogo deuterado", um "análogo  $^{13}\text{C}$ -marcado," ou um "análogo deuterado/ $^{13}\text{C}$ -marcado." O termo "análogo deuterado" significa um composto descrito no presente documento, de acordo com o qual um  $^1\text{H}$ -isótopo, isto é, hidrogénio (H), é substituído por um  $^2\text{H}$ -isótopo, isto é, deutério (D). A substituição de deutério pode ser parcial ou completa. A substituição de deutério parcial significa que pelo menos um hidrogénio é substituído por pelo menos um deutério. Por exemplo, para  $R_P\text{-}4$  ou  $S_P\text{-}4$ , um perito ordinário pode contemplar pelo menos os seguintes análogos deuterados parciais (onde " $d_n$ " representa n-número de átomos de deutério, tais como, para um grupo isopropilo  $n = 1\text{-}7$ , enquanto para um grupo fenilo,  $n = 1\text{-}5$ ), bem como aqueles representados a seguir.





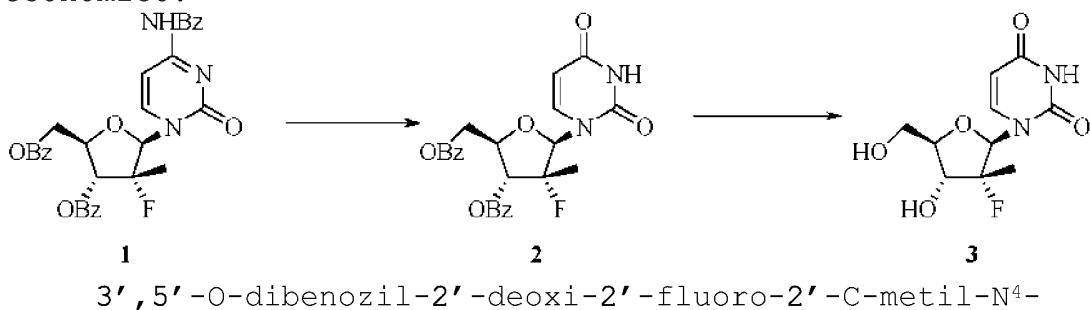
Embora os grupos metilo representados acima sejam mostrados como sendo completamente deuterados, será reconhecido que variações deuteradas parciais são também possíveis, tais como,  $-\text{CDH}_2$  e  $-\text{CD}_2\text{H}$ . Marcadores isotópicos na furanose e base são também contemplados. De modo similar, os termos “análogo  $^{13}\text{C}$ -marcado” e “análogo deuterado/ $^{13}\text{C}$ -marcado” referem-se a um composto descrito no presente documento, de acordo com o qual o átomo de carbono é enriquecido com um  $^{13}\text{C}$ -isótopo o que significa que o grau de enriquecimento excede a abundância natural usual de cerca de 1,1 %.

### **Exemplos**

Não sendo para estar limitado por meio de exemplo, os seguintes exemplos servem para facilitar uma melhor compreensão da descrição.

#### *Aspectos Sintéticos*

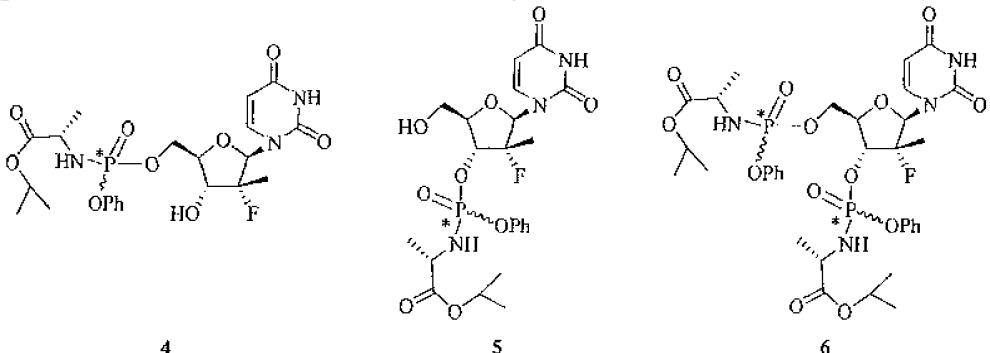
Com a finalidade de preparar o nucleósido uridina, pode-se tirar vantagem de um intermediário de citidina tribenzoilada avançado na síntese de certos análogos 3',5'-diacilados de 3 (veja-se a seguir) já produzidos eficientemente numa escala de planta piloto (veja-se documento WO 2006/031725 ou documento US 2006/0122146). O seguinte método foi encontrado como sendo escalável e económico.



benzoilcitidina (1) é obtida por um método revelado no documento WO 2006/031725 e documento WO 2008/045419. I é tratado com ácido acético aquoso a 70 % para formar 3',5'-O-dibenozil-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (2). Os ésteres benzoílicos podem ser hidrolisados por um número de métodos também, por exemplo, alcóxidos em solvente alcoólico, tal como metóxido de sódio em metanol, carbonato de potássio em metanol, ou análogos de etanol, alquilaminas tais como metilamina em metanol, butilamina etc. Amónia metanólica foi escolhida para o trabalho numa escala maior. O produto uridina (3) pode ser purificado por meio de cristalização para proporcionar um rendimento de 70 % a partir da citidina tribenzoilada (1).

Numerosos procedimentos da literatura detalham diferentes vias e condições para preparar fosforamidatos usando diversos equivalentes de dobra de reagentes. Veja-se, por exemplo, McGuigan *et al.* J. Med. Chem. 2005, 48, 3504-3515 e McGuigan *et al.* J. Med. Chem. 2006, 49, 7215. Para o trabalho à escala do processo, existe somente um exemplo presentemente conhecido, que é revelado em Lehsten *et al.*, Org. Process Res. Dev. 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). Nesta referência, os autores introduzem o conceito de um "procedimento one-pot" em que um sal clorídrico de aminoácido e diclorofosfato de fenilo são feitos reagir juntamente com N-metilimidazol em diclorometano. Depois disso, o nucleósido é adicionado para formar o produto 5'-O-fosforamidato desejado, que no presente caso produziria um composto representado pela fórmula 4. Infelizmente, o procedimento de Lehsten apresentou inconvenientes. Por exemplo, o procedimento de Lehsten utilizou um excesso muito grande de reagentes que se tornou necessário adicionar ao custo e dificuldade de purificação cromatográfica. Além disso, Lehsten sugeriu que poderia ser controlada a seletividade da reação no 5'-hidroxilo sobre o 3'-hidroxilo em comparação com uma

referência da literatura através da utilização de temperaturas mais baixas e adição lenta do nucleósido.



5'-O-fosforamidato  
(2 diastereómeros)

**3'-O-fosforamidato**  
**(2 diastereómeros)**

3',5'-bis-O-fosforamidato  
(4 diastereómeros)

A utilização do procedimento de Lehsten para os compostos revelados no presente documento proporcionou cerca de 1-5 % de diastereómeros de 3'-O-fosforamidato mono-substituídos (**5**) e cerca de 10-30 % do produto bis-substituído (**6**). Como a polaridade dos diastereómeros 3' - foi muito similar aos 5'-diastereómeros desejados (**4**), a separação cromatográfica foi muito desafiadora. O aumento de escala do processo foi quase impossível sem descartar uma porção substancial dos 5'-diastereómeros menos polares (**4**) ou aceitar um nível mais alto de contaminação dos 3'-diastereómeros (**5**). Num aumento de escala de 50 g inicial, o produto resultante continha uma contaminação de 3'-diastereómero (**5**) de cerca de 3 %, que co-eluiu com o menos polar do 5'-diastereómero (**4**).

São revelados no presente documento condições de reação que utilizam quantidades menores de reagentes e um método para remover seletivamente a impureza dos diastereómeros de 3'-O-fosforamidato (5) com uma separação cromatográfica mais fácil deste modo propiciando os diastereómeros de 5'-O-fosforamidato desejados com uma pureza muito mais alta (4).

Para a estequiometria do reagente, foi feito um estudo em que a estequiometria dos reagentes foi sistematicamente

alterado e os resultados foram monitorizados por RMN de fósforo da reação em bruto como Lehsten tinham relatado. Nos mais bem-sucedidos é executado, o rendimento isolado e a pureza do produto desejado foram comparados. Observou-se que o 5'-hidroxilo primário reage a um ritmo mais rápido do que o 3'-hidroxilo secundário. Isto cria uma situação de competição entre o progresso da reação de consumir todo o nucleósido de partida e converter produtos 5'- e 3'-monosubstituídos (**4** e **5**) aos produtos 5',3'-bis substituídos (**6**). O produto 3'-monosubstituído converte ao produto bis a uma taxa mais rápida do que o produto 5'-mono-substituído, por isso, é possível reduzir o nível de contaminação de 3'-diastereómero empurrando a reação mais aos produtos bis-substituídos. No entanto, com um meio eficaz para remover os 3'-diastereómeros, a reação pode ser otimizada para produzir mais do 5'-diastereómero desejado sem que tenha que sacrificar tanto do 5'- diastereómero a ser convertido ao bis-substituído (**6**). Foi também observado que o cloridrato de aminoácido é muito higroscópico. Como qualquer água presente iria consumir uma quantidade equivalente do reagente de diclorofosfato de fenilo, deve ser tomado cuidado para manter o aminoácido substancialmente anidro ou ele deve ser feito substancialmente anidro antes de usar. Em suma, Lehsten tinha relatado que a razão ótima de aminoácidos em relação a diclorofosfato de fenilo em relação a nucleósido foi 3,5:2,5:1 respetivamente. Encontrou-se que a razão ótima de aminoácido em relação a diclorofosfato de fenilo em relação a nucleósido de cerca de 1,6 a cerca de 1,3 a cerca de 1 é ótima sob condições em que o 3'-diastereómero pode ser eficientemente removido e quando o cloridrato de aminoácido é substancialmente anidro. Ao utilizar uma menor quantidade dos reagentes, uma economia de custos é realizada juntamente com uma simplificação da separação cromatográfica do produto desejado a partir de reagente de

subprodutos e do nível reduzido de bis diastereómeros.

Num procedimento alternativo, um derivado 3'-hidroxibloqueado de **3** foi preparado usando um grupo de bloqueio de t-butildimethylsílico em duas etapas. Este foi convertido, em seguida, ao seu derivado de 5'-fosforamidato. A intenção era de que o grupo sílico pudesse então ser removido e não haveria 3' isómeros (**5**) ou 3',5'-bis fosforamidatos (**6**). Uma abordagem similar foi demonstrada por Borch e Fries (Patente US 5.233.031) num rendimento global baixo num fosforamidato de alquilo.

Outra abordagem alternativa foi utilizar a síntese direta e, em seguida, utilizar a química para ajudar a diferenciar as impurezas de 3'-diastereómero **5** dos 5'-diastereómeros desejados **4** para ajudar a separação. Desejou-se que um grupo reagisse seletivamente com o hidroxílio primário livre da impureza de 3'-O-fosforamidato **5** sobre o hidroxílio secundário livre do 5'-O-fosforamidato desejado **4**. Foi também desejado que o grupo de bloqueio mudasse significativamente a polaridade do produto 5'-O-bloqueado 3'-O-fosforamidato resultante a partir do 5'-O-fosforamidato desejado **4**. Não haveria etapa extra necessária para remover o grupo de bloqueio como os 5'-diastereómeros desejados **4** não seriam alterados. Os 3'-diastereómeros quimicamente alterados permitiriam então uma separação cromatográfica mais fácil ou separação por meio de suportes sequestrantes especiais ou por meio de extrações.

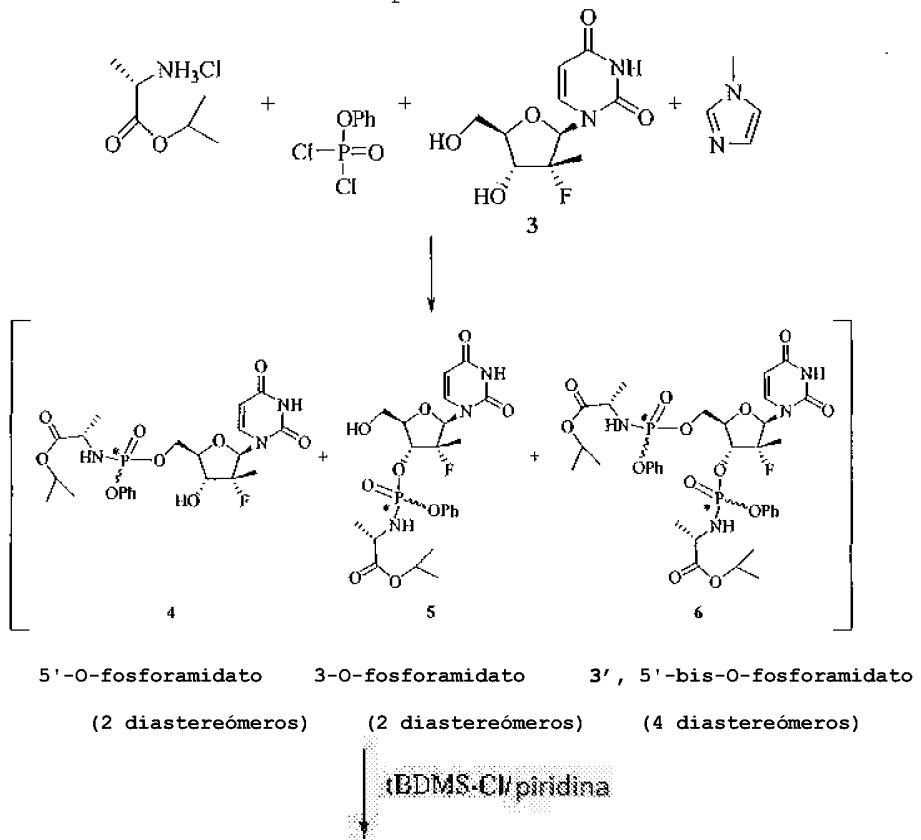
Especificamente, o grupo de bloqueio terc-butildimethylsílico (tBDMS) satisfaz estes critérios e foi o primeiro a ser demonstrado e subsequentemente utilizado numa escala de multi-quilograma. Sob certas condições, tais como em piridina como solvente e base, o grupo tBDMS reage com elevada seletividade na posição hidroxílio primário sobre a posição hidroxílio secundário **3'**. A reação de fosforamidato utiliza N-metilimidazol (NMI) como uma base.

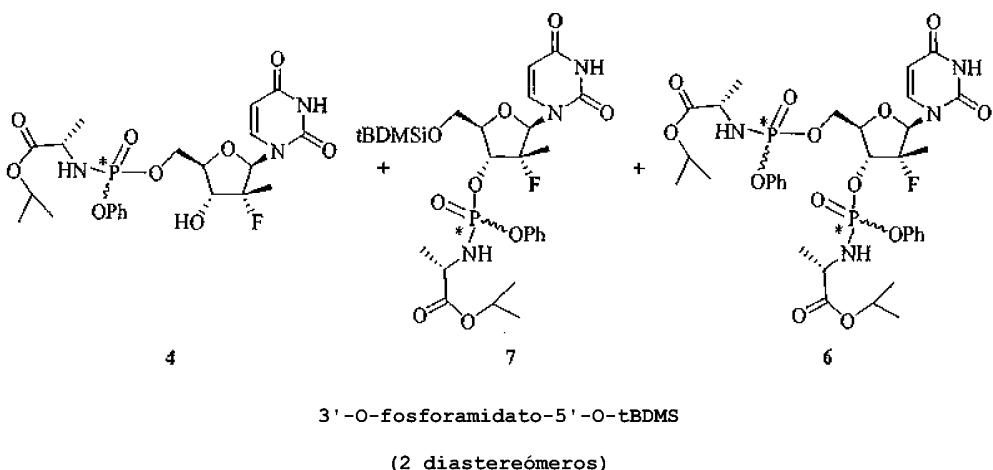
Na presença de NMI, a sililação é menos seletiva. De preferência, a quantidade de NMI deve ser reduzida. Isto pode ser conseguido facilmente, após a reação de fosforamidato por meio de lavagem da solução de reação com ácido clorídrico a 1 N. O NMI e o nucleósido de partida remanescente são removidos, deixando uma mistura em bruto de produtos de produtos mono e bis substituídos e subprodutos de reagente. Este é então dissolvido em piridina e tratado com cloreto de terc-butildimetilsililo. O produto 3'-monosubstituído 5 é convertido em algumas poucas horas ou menos ao 5'-O-tBDMS-3'-O-fosforamidato 7. O progresso da reação pode ser monitorizado por meio de HPLC. A polaridade deste produto silitado 7 é menor que a do bis-fosforamidato 6 e é prontamente removido por meio de cromatografia. Usando este método, foi possível reduzir o nível de 3'-monofosforamidato 5 a menos de 0,1 % do 5'-produto 4 em comparação com 1-3 % sem o tratamento com sililo. De modo similar, o tratamento com cloreto de dimetoxitrifenilmetilo (DMT-Cl) sob as mesmas condições funcionou tão bem. Era também mais fácil de identificar o produto da reação de DMT por meio de TLC como moléculas contendo DMT de mancha laranja brilhante sobre aquecimento ou exposição ao ácido.

Ambas as condições de reação e o sequestro da 3'-impureza são métodos gerais e poderiam ser aplicados à maioria dos fosforamidatos nucleosídicos com um hidroxílo 3' livre. A fração de fosforamidato poderia ser qualquer combinação de éster de aminoácido e álcool aromático. A fração de nucleósido poderia ser qualquer nucleósido em que um 5' fosforamidato levaria a um 5'-monofosfato e poderia ser metabolizado ainda à forma 5'-trifosfato.

O seguinte esquema é o esquema de reação principal ilustrado para preparar isopropil L-alanato fenil fosforamidato de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina com o produto maior como o 5'-O-fosforamidato desejado (4, dois

diastereómeros) e o produto menor como o 3'-O-fosforamidato (5, dois diastereómeros) e o 3',5' -bis-O-fosforamidato (6, quatro diastereómeros). Os reagentes são adicionados nas razões estequiométricas como descrito no método de seção de preparação. A reação é deixada que prosseguisse até cerca de 5 % do material de partida permanecer como julgado por meio da visualização de UV em cromatografia em camada fina (TLC). Também UPLC/MS mostrou que aproximadamente 10 % do 3',5' bis-fosforamidato **6** tinha sido formado em comparação com o 5'-produto desejado. Após extinguir e um tratamento final aquoso ácido, o resíduo bruto da camada orgânica foi preparado para a sililação. Sob as condições de reação descritas, o grupo sililo preferentemente reagido com o 5'- hidroxilo livre do 3'-O-fosforamidato para formar **7**. A reação foi continuada até que o 3'-O-fosforamidato não estivesse mais detetável por meio de UPLC/MS.





Após o tratamento final da reação de sililação, o produto desejado é submetido a cromatografia em sílica gel e é eluído com um gradiente de metanol em diclorometano (1-4 %). O 5'-monofosforamidato desejado 4 elui por último.

#### Método de Preparação

#### Referência

#### **Exemplo 1. Preparação de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3)**

Num balão de 10 L, foi adicionado 3', 5'-O-dibenzoil-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N4-benzoilcitidina (500 g, 0,874 mol) e ácido acético aquoso a 70 % (7,5 L). A solução foi aquecida até o refluxo (110 °C) durante 20 h. A TLC indicou uma reação completa ( $R_f$  0,6 em 5 % de metanol em diclorometano (DCM)). A mistura foi arrefecida até a temperatura ambiente e diluída com água (2 L). Após agitação durante 2 h, o precipitado resultante foi colhido por meio de filtração e o sólido foi enxaguado com água (5 L) e seco na atmosfera à temperatura ambiente durante 12 h para proporcionar 360 g (88 %). Este intermediário dibenzoiluridina foi usado diretamente na seguinte etapa adicionando-o todo a amônia metanólica preparada recentemente (5,4 L, cerca de 25 %) a 0 °C. Esta temperatura foi mantida durante 3 h e, em seguida, deixada que se aquecesse até 15 °C durante 24 h. A TLC indicou uma reação completa ( $R_f$  0,4 em 10 % de metanol em DCM). A

mistura de reação foi filtrada através de um leito de Celite e concentrada sob pressão reduzida para dar o produto bruto (216 g). O produto bruto foi agitado com acetato de etilo (325 ml) durante 3 h à temperatura ambiente. O sólido resultante foi colhido por meio de filtração e lavado com acetato de etilo (216 ml). O sólido foi seco sob vácuo à temperatura ambiente durante 4 h para proporcionar 160 g (78 %) do produto desejado em 98,7 % HPLC pureza.  $^1\text{H}$ -RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,44 (s 1, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, C-6H), 5,97 (d, 1H, C-1'H), 5,64 (d, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (m, 3H, C-5'-Ha, C-3'H. C-4'H), 3,63-3,60 (m, 1H, C5'-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'-CH<sub>3</sub>). ES-MS M-1 259.

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

Sinónimo: mistura diastereomérica de 5'-O-(Isopropil-L-alanato, fosforamidil)-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina de fenilo.

Um balão de três tubulações de 5 L foi equipado com um agitador mecânico, salmoura banho com gelo, termómetro interno, e uma atmosfera de azoto. O balão foi carregado com cloridrato de éster isopropílico L-alanina (82,0 g, 0,490 mol) e diclorometano anidro (0,80 L). Enquanto isto se estava agitando, diclorofosfato de fenilo (85,0 g, 0,40 mol) foi adicionado num lote e agitado. Enquanto se mantinha a temperatura interna entre -5 a 5 °C, uma solução de N-metilimidazol (NMI, 250 g, 3,07 mol) em diclorometano (250 ml) foi adicionada ao longo de um período de uma meia hora. A solução foi deixada a agitar durante 1 h neste intervalo de temperatura. 2'-Deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3,80,0 g, 0,307 mol) foi adicionada a 0 °C numa porção e, em seguida, o balão de reação foi deixado que se aquecesse lentamente no banho de salmoura. Em 1 h, a temperatura interna foi de até -2 °C. A TLC (5 % de metanol

em DCM) a 1 h mostrou que mais de 50 % de nucleósido foi consumido. O banho foi removido e o balão de reação alcançou a temperatura ambiente ao longo de 1 h mais. A TLC após 3 h e a 5 h total mostrou que 95 % do nucleósido de partida foi consumido. A mistura de reação foi extinta por meio da adição de metanol (100 ml) e agitação da reação durante 5 minutos.

A mistura de reação foi lavada com HCl a 1 N (2 X 500 ml) seguido de solução de bicarbonato de sódio saturado (2 X 500 ml). A camada orgânica separada foi seca em sulfato de sódio anidro (50 g) e filtrada. A solução foi evaporada sob pressão reduzida e, em seguida, sob alto vácuo até a secura para dar o produto bruto como um óleo viscoso (170 g). Os RMN do produto bruto ( $^{31}\text{P}$  e  $^1\text{H}$ ) foram tomados. O  $^{31}\text{P}$ -RMN indicou cerca de 1 % da integração de fósforo total foi devido à presença do 3' isómero 5.

Ao produto bruto foi adicionada piridina anidra (1700 ml). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e, em seguida, sob alto vácuo com a finalidade de reduzir o conteúdo de água da mistura bruta através de co-evaporação. O óleo resultante foi redissolvido em piridina anidra (500 ml) e, em seguida, foi adicionado cloreto de t-butildimethylsílico em excesso (9,0 g, 60 mM). A reação foi agitada à temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorizado por meio de UPLC/MS. Após 3 horas, a impureza 3' 5 poderia não mais ser detetada e a reação foi extinta pela adição de metanol (50 ml).

A reação foi evaporada sob pressão reduzida a um óleo. O resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (1,5 L) e lavado com HCl a 1 N (2X 500 ml), seguido de solução de bicarbonato de sódio saturado (2 X 500 ml). A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro (50 g), filtrada e evaporada sob pressão reduzida para dar o produto bruto como um óleo amarelo pálido.

O óleo bruto foi diluído com o mesmo volume de

diclorometano e carregado num cartucho de sílica gel de 2,5 Kg num módulo de compressão radial a 100 psi de pressão de ar. Usando uma bomba de gradiente a 60 psi e uma taxa de fluxo de 400 ml/min, o cartucho foi lavado com cloreto de metileno (4L) seguido de um gradiente de 1-4 % de metanol em cloreto de metileno (48 L). A maioria das impurezas maiores (fosfato de di-(isopropilalanil)fenilo, 3',5'-bis fosforamidato (**6**), aduto de 3'-fosforamidato-5'-TBDMS (**7**)) eluiu com gradiente de ~3 %. O produto desejado eluiu entre 3 e 4 % de metanol. As frações contendo produto foram classificadas em dois lotes. O primeiro continha quantidades pequenas de impurezas superiores e o último foi produto puro. O primeiro conjunto de frações continha quantidades pequenas de impurezas menos polares (impurezas superiores) tais como o 3',5'-bis fosforamidato e o fosfato di-alanilfenilo e principalmente o diastereómero  $R_P$  e foi necessária uma segunda purificação em coluna. (A terminologia relativa, superior vs. inferior refere-se à eluição em cromatografia em sílica gel de fase normal, onde o "isómero superior" significa o isómero que elui primeiro.) O segundo conjunto de frações não tem uma quantidade significativa de impurezas -justo o  $R_P$  restante e principalmente os diastereómeros  $S_P$ . Foi depois recombinado com as frações duas vezes em coluna. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e a espuma branca resultante foi seca adicionalmente (0,20 mmHg) durante 1 h para dar 42 g do lote impuro (4:1 isómero superior vs inferior com base em  $^{31}P$ -RMN) e 38 g do lote puro (1:3 isómero superior vs inferior). O lote impuro foi recolocado em coluna de um modo similar para dar 3,8 g de isómero superior 97 % puro (conjunto de fração separado) e 36 g de produto puro numa razão 4:1. Os dois lotes principais foram dissolvidos em DCM, combinados, evaporados sob pressão reduzida e secos (50 °C, 0,2 mmHg, 24 h) para obter 74 g (45,7 %) de produto puro **4** com uma razão diastereomérica de

48: 51, como uma espuma branca, pf cerca de 75-85 °C.

Com a finalidade de produzir um amorfo sólido da mistura diastereomérica, 74 g da espuma branca foram agitados com t-butil metil éter (750 ml) resultando numa solução parcial e um resíduo sólido gomoso. Enquanto se agita, heptanos (750 ml) foram adicionados lentamente e a suspensão foi mecanicamente agitada durante 1 hora até a maioria da goma ter sido convertida a um sólido branco. O sólido foi raspado com uma espátula e a suspensão resultante foi filtrada. O sólido foi lavado com heptanos (4 X 50 ml) e seco sob vácuo (50 °C, 0,2 mmHg, 24 h) para dar um pó amorfo branco (64 g) com um amplo intervalo de fusão de cerca de 70-80 °C.  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  RMN conformaram com a estrutura e HPLC mostrou uma pureza de 99,8 % com uma razão diastereomérica de 46:54 (também confirmado por  $^{31}\text{P}$  RMN).

Método alternativo para preparar uma mistura sólida de **4**. Após cromatografia, o resíduo foi co-evaporado com diclorometano duas vezes (5 ml/g) e seco durante 24 h a 35-40 °C a 35-45 mTorr. O resíduo de espuma foi crivado através de uma tela de 250 micron e seco adicionalmente sob as mesmas condições até que o diclorometano residual estivesse abaixo de 400 ppm como medido por meio de CG aérea. O pó amorfo fino branco pérola a branco resultante tem um intervalo de temperatura de transição de vidro de 53,7 a 63,5 °C.

Caraterização da mistura de isómeros (**4**):  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,05 (s 1, 1H, NH,  $S_P$ ), 10,00 (s 1, 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 (d 1, 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-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $R_P/S_P$ ), 4,46-4,33 (m, 8H, C- 5'-H<sub>2</sub>, ala-NH, C3'-OH,  $R_P/S_P$ ), 4,12 (m, 2 H, ala-CH-CH<sub>3</sub>,  $R_P/S_P$ ), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H,  $R_P/S_P$ ), 1,39-1,22 (m, 12H, todo CH<sub>3</sub>,  $R_P/S_P$ ).

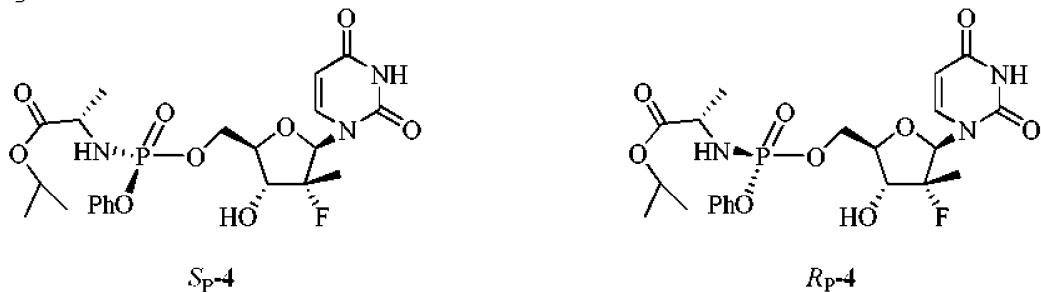
$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,60 ( $R_P$ ), 3,20 Sp em relação a

trifenilfosfato a -17,80 ppm. ES-MS M+1 530,2. Análise Elemental: % calculada (incluindo 0,29 % de água como encontrado por análise 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.

*Discussão sobre a separação de isómeros*

O composto **4** devido à quiralidade no fósforo está compreendido de dois diastereómeros, que são designados como  $S_P\text{-}4$  e  $R_P\text{-}4$ . A atribuição estereoquímica foi feita com base em análise de raios X de cristal único de  $S_P\text{-}4$ . Ambos  $R_P\text{-}4$  e  $S_P\text{-}4$  deram produto cristalino.

Os procedimentos para a cristalização são delineados a seguir.



**Exemplo 3.** Cristalização do isómero  $R_P\text{-}4$ . A fração submetida a cromatografia continha o primeiro eluído, o isómero  $R_P\text{-}4$  menos polar (3,8 g, 97 % puro) foi dissolvido em isopropanol (36 g) e diluído com heptanos até ficar opaco (72 g). A solução foi semeada e agitada à temperatura ambiente durante 5 h. O sólido resultante foi colhido por meio de filtração a vácuo, lavado com heptanos (2x20 ml) e seco (50 °C, 0,2 mm, 24 h) a 2,3 g de agulhas brancas muito pequenas pf 136,2-137,8 °C. A pureza de HPLC do material resultante foi encontrada como sendo de 99,02 %.

$R_P\text{-}4$ :  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,10 (s 1, 1H, NH), 7,36 (m, 2H, o-aromático), 7,26-7,16 (m, 4 H, C6-H, m,p-aromático), 6,16 (d 1, 1H, C1'-H), 5,58 (d, 1H, C5-H), 5,01 (sept, 1H, CH- $(\text{CH}_3)_2$ ), 4,52-4,47 (m, 2H, C-5'-H<sub>2</sub>), 4,10 (d, 1H, C3'-H), 4,02-3,76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH<sub>3</sub>), 1,37-1,20 (m, 12H, todo CH<sub>3</sub>).

**Exemplo 4. Preparação e cristalização de S<sub>P</sub>-4.**

Método I: Precipitação direta a partir do material bruto 4: a uma solução agitada de cloridrato de éster isopropílico L-alanina (10,5 g, 61,5 mmol, azeotropicamente seco, duas vezes, com 50 ml de tolueno cada vez) em diclorometano (100 ml) foi adicionado fenildiclorofosfato (7,5 ml, 50 mmol) à temperatura ambiente. A mistura foi arrefecida até -10 °C e, em seguida, foi adicionada uma solução de NMI (30,5 ml, 384,3 mmol) em 30 ml de diclorometano ao longo de um período de 30 min. Após completar a adição, a mistura foi agitada entre -10 e -15 °C durante 1 h. À mistura acima foi adicionado 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3) (10 g, 38,4 mmol) num lote e a mistura foi agitada a uma temperatura abaixo de -10 °C durante 3 h e, em seguida, lentamente deixada que se aquecesse até 20 °C (6 h). A mistura foi agitada nesta temperatura durante a noite (15 h) e, em seguida, extinta com 10 ml de metanol. O solvente foi evaporado e o resíduo foi redissolvido em EtOAc (200 ml). A camada de EtOAc foi lavada com água (100 ml), HCl a 1 N (3x75 ml), solução de NaHCO<sub>3</sub> aquoso a 2 % (50 ml) e salmoura (50 ml). A camada orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada. O resíduo foi seco sob alto vácuo durante 2 h para dar uma espuma branca (22 g).

A espuma acima foi dissolvida em 33 ml de DCM e, em seguida, foram adicionados 65 ml de IPE (isopropil éter) para dar uma solução saturada. A solução foi filtrada através de uma almofada pequena de Celite e o filtrado foi agitado com sementes de S<sub>P</sub>-4 durante 72 h à temperatura ambiente (cerca de 22 °C - note que o arrefecimento da suspensão até 0 °C levou a saída de óleo do produto bruto). O sólido branco foi filtrado, lavado com IPE (20 ml) e seco para dar 4,58 g (mistura de ~85:15 de S<sub>P</sub>-4:R<sub>P</sub>-4 respetivamente como determinado por <sup>31</sup>P RMN) de um pó branco. O sólido acima foi suspenso em 23 ml de DCM e, em

seguida, submetido a refluxo durante 3 h. A mistura foi arrefecida até a temperatura ambiente e agitada durante 15 h. O sólido branco foi filtrado, lavado com 4,5 ml de DCM frio e seco sob alto vácuo a 45 °C para dar *S<sub>P</sub>-4* puro, pf 93,9-104,7 °C, pureza de HPLC 99,74 % (3,11 g, 15,2 % do nucleóside uridina).

*S<sub>P</sub>-4* <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,63 (s 1, 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 (d 1, 1H, C1'-H), 5,70 (d, 1H, C5-H), 5,02 (sept, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,53 (m, 2H, C-5'-H<sub>2</sub>), 4,11 (d, 1H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH<sub>3</sub>), 3,77 (s 1, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C2'-CH<sub>3</sub>), 1,37 (d, 3H, ala-CH<sub>3</sub>), 1,24 (d, 6H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Método 2: Saída de óleo do material bruto 4: a uma solução agitada de cloridrato de éster isopropílico L-alanina (20,6 g, 123 mmol, azeotropicamente seco, duas vezes, com 75 ml de tolueno cada vez) em diclorometano (200 ml) foi adicionado fenildiclorofosfato (14,9 ml, 100 mmol) à temperatura ambiente. A mistura foi arrefecida até -10 °C e, em seguida, foi adicionada uma solução de NMI (61,3 ml, 769 mmol) em 60 ml de diclorometano ao longo de um período de 30 min. Após completar a adição, a mistura foi agitada entre -10 °C e -15 °C durante 1 h. À mistura acima foi adicionada 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3) (20 g, 76,9 mmol) num lote e a mistura foi agitada a uma temperatura abaixo de -10 °C durante 3 h e, em seguida, lentamente deixada que se aquecesse até 20 °C (6 h). A mistura foi agitada nesta temperatura durante a noite (15 h) e, em seguida, extinta com 10 ml de metanol. O solvente foi evaporado e o resíduo foi redissolvido em EtOAc (400 ml). A camada de EtOAc foi lavada com água (200 ml), HCl a 1 N (3x100 ml), solução de NaHCO<sub>3</sub> aquoso a 2 % (100 ml) e salmoura (50 ml). A camada orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada. O resíduo foi seco sob alto vácuo durante 2 h para dar uma espuma branca (43 g). A espuma

acima foi dissolvida em 86 ml de EtOAc num balão de fundo redondo de duas tubulações equipado com um agitador mecânico. Enquanto se agitava, 100 ml de heptano foram adicionados lentamente e a suspensão foi agitada durante 1 h. A camada de topo foi decantada e o resíduo foi de novo agitado com 50 ml de 2:3 EtOAc/heptano soluções durante 10 min e, em seguida, decantado. O resíduo foi seco sob alto vácuo para dar uma espuma branca (31 g).

A espuma acima foi dissolvida em 46 ml de DCM e, em seguida, foi adicionado 95 ml de IPE para dar uma solução saturada. A solução foi filtrada através de uma almofada pequena de Celite e o filtrado foi agitado com sementes de  $S_{P-4}$  durante 72 h à temperatura ambiente. O sólido branco foi filtrado, lavado com IPE (30 ml) e seco para dar 7,33 g (mistura de ~85:15 de  $S_{P-4}$  :  $R_{P-4}$  respetivamente como determinado por  $^{31}P$  RMN) de pó branco. O sólido acima foi suspenso em 36 ml de DCM e, em seguida, submetido a refluxo durante 3 h. A mistura foi arrefecida até a temperatura ambiente e agitada durante 15 h. O sólido branco foi filtrado, lavado com 7,5 ml de DCM frio e seco sob alto vácuo a 45 °C para dar >99 % de  $S_{P-4}$  puro, (4,78 g, 11,6 % do nucleósido uridina).

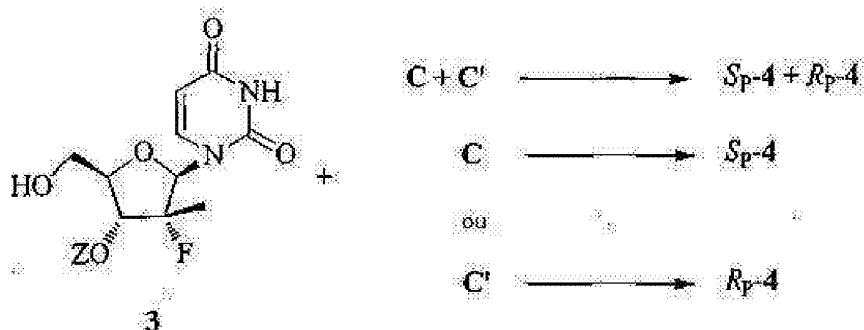
Método 3: Carga de sílica gel de material bruto **4**: 5,0 g de material bruto **4** foram produzidos do mesmo modo que para a mistura de diastereómeros justo antes da etapa de cromatografia em coluna partindo com aproximadamente 2,5 g de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3). O material bruto foi dissolvido em 10 ml de DCM e 10 g de sílica gel foram adicionados à solução. O solvente foi evaporado para dar uma suspensão seca. A suspensão foi agitada com 40 ml de 50 % de EtOAc/hexanos durante 15 min e, em seguida, filtrado. A sílica gel foi lavada com 10 ml adicionais de 50 % de EtOAc/hexanos. A sílica gel foi então lavada com 15 % de MeOH/DCM (100 ml) e colhida separadamente. O solvente foi evaporado e seco sob alto vácuo para dar 4,0 g de

resíduo (espuma). O resíduo foi dissolvido em DCM (6 ml) e, em seguida, foi adicionado ~9 ml de IPE para preparar uma solução saturada. A mistura foi então suavemente agitada durante a noite com sementes de  $S_P\text{-}4$  à temperatura ambiente. O sólido branco foi filtrado e lavado com IPE (5 ml) para dar 1,28 g de produto.  $^{31}\text{P}$  RMN revelou que o produto acima contém 77:23 mistura de  $S_P\text{-}4$  :  $R_P\text{-}4$  respetivamente. Esta foi recristalizado a partir de 20 ml de DCM para obter 0,75 g de >99 % de  $S_P\text{-}4$  puro (cerca de 12 % do nucleósido uridina). Esta preparação de  $S_P\text{-}4$  não requer a etapa de sililação como foi feito para a mistura, assim todo o procedimento de reação é mostrado acima. Aspetos de formas polimórficas e cristalinas únicas de  $S_P\text{-}4$  são apresentados a seguir.

Método 4: 40,0 g de mistura 1:1 de 4 foram dissolvidos em 90 ml de diclorometano. Diisopropiléter (70 ml) foi adicionado à solução acima para dar uma solução saturada. (A quantidade de diisopropil éter pode variar com base na pureza do produto.) A solução foi semeada com  $S_P\text{-}4$  puro (> 99 %) e a mistura foi suavemente agitada com uma barra agitadora à temperatura ambiente durante 20 h (formação de sólido foi observada após 2 h). O sólido foi filtrado, lavado com 40 ml da mistura de diisopropiléter/diclorometano (1:1) e seco para dar um sólido branco (16,6 g, 89,35 %  $S_P\text{-}4$  puro por meio de RMN). Este sólido foi suspenso em 83 ml de diclorometano e submetido a refluxo durante 3 h. A suspensão foi arrefecida até a temperatura ambiente e agitada durante a noite. O sólido foi filtrado e lavado com 10 ml de DCM frio. O sólido foi seco sob vácuo para dar  $S_P\text{-}4$  (13,1 g, 99,48 % puro por meio de HPLC). 11 g deste sólido foi redissolvido em 330 ml de DCM sob condições quentes. A solução foi arrefecida até a temperatura ambiente e deixada nesta temperatura durante a noite. O produto cristalino foi filtrado e seco para dar 10,5 g de  $S_P\text{-}4$  (99,74 % por meio

de HPLC).

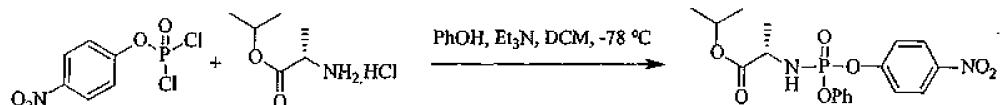
Os compostos  $S_p\text{-}4$  e  $R_p\text{-}4$  podem alternativamente ser preparados por um método revelado no presente documento e não formam uma parte da presente invenção, por meio da reação de nucleósido (protegido ou não protegido) 3 com um isopropil-alanil-fosforamidato (mistura de C e C', C ou C'), como mostrado na seguinte equação.



P.D. Howes et al. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2003, Vol. 22, N° 5-8, pp. 687-689 ("Howes") revela 2'- e 5'-fosforamidatos obtidos por uma reação com cloreto de t-butilmagnésio. Neste documento, Howes revela que quando um nucleósido 3'-deoxi-citidina é reagido com éster metílico do ácido (S)-2-[cloro-fenoxy-fosforilamino] propiónico na presença de 1,2 equivalentes de cloreto de t-butilmagnésio, fosforilação seletiva na 2'-posição ocorreu, mas que com um equivalente adicional de fosforilação seletiva de cloreto de t-butilmagnésio na 5'-posição ocorreu. Esta revelação deveria ser contrastada com essa que é revelada em Esquema 1 de Howes.

#### Referência

#### **Exemplo 5-1. Preparação de éster isopropílico do ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxy)-fenoxy-fosforilamino] propiónico**

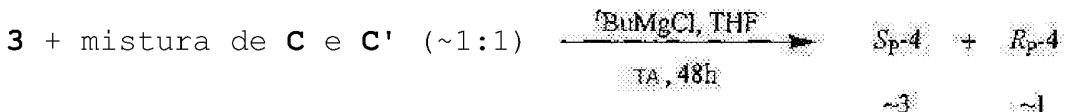


A uma solução agitada de fosforodicitrífato de 4-nitrofenilo 12,8 g, 50 mmol) em diclorometano (100 ml) foi

adicionada uma solução de fenol e trietilamina (7,7 ml, 55 mmol) em diclorometano (100 ml) a -78 °C ao longo de um período de 20 min. A mistura foi agitada nesta temperatura durante 30 min e, em seguida, transferido a outro balão de fundo redondo que contém cloridrato de éster isopropílico L-alanina (8,38 g, 50 mmol) em diclorometano (100 ml) a 0 °C. À mistura foi adicionada uma segunda porção de trietilamina (14,6 ml, 105 mmol) ao longo de um período de 15 min. A mistura foi agitada a 0 °C durante 1 h e, em seguida, o solvente foi evaporado. O resíduo foi triturado com acetato de etilo (150 ml) e o sólido branco foi retirado por filtração. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para dar um óleo amarelo pálido. O composto bruto foi submetido a cromatografia usando gradiente de 0-20 % de acetato de etilo/hexanos para dar o produto (17 g, 83 % de rendimento) como uma mistura de diastereómeros em cerca de uma razão 1:1.  $^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  -0,31, -0,47;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  8,31-8,27 (m, 2H), 7,51-7,37 (m, 4H), 7,27-7,19 (m, 3H), 6,70-6,63 (m, 1H), 4,85-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,21-1,19 (m, 3H), 1,11-1,09 (m, 6H); MS (ESI)  $m/z$  407 ( $M-1$ ) $^+$ .  $^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -2,05, -2,10;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,22 (d,  $J = 9,2$  Hz, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26-7,18 (m, 3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88 (m, 1H), 1,38 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H), 1,22 (dd,  $J = 6,2$  & 3,0 Hz, 6H); MS (ESI)  $m/z$  407 ( $M-1$ ) $^+$ .

### Referência

#### Exemplo 5-2. Preparação de S<sub>P-4</sub>/R<sub>P-4</sub>.

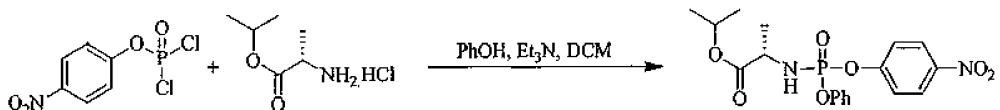


A uma solução agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (130 mg, 0,5 mmol) em THF seco (1,5

ml) foi adicionada uma solução a 1,0 M de cloreto de terc-butilmagnésio (1,05 ml, 1,05 mmol, 2,1 equiv)) à temperatura ambiente ao longo de um período de 5 min. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)-2-[(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (mistura 1:1 de isómeros, 408 mg, 1 mmol) em THF (1,5 ml) foi adicionado gota a gota ao longo de um período de 5 min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 48 h e, em seguida, extinta com NH<sub>4</sub>Cl saturado aquoso (20 ml). A mistura foi dividida em partições entre acetato de etilo (50 ml) e água (20 ml). O extrato orgânico combinado foi seco em sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado sob pressão reduzida para dar um resíduo amarelo pálido. A cromatografia em coluna do resíduo usando gradiente de 0-2 % de MeOH/diclorometano deu um sólido espumoso branco (125 mg, 47 % de rendimento, mistura de S<sub>P</sub>-4/R<sub>P</sub>-4 em cerca de uma razão de 3,05:1,0).

#### Referência

**Exemplo 6. Preparação e isolamento não cromatográfico de éster isopropílico do ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico**



O cloridrato de éster isopropílico L-alanina (330 g, 1,97 mol) foi pré-seco por meio de co-evaporação com tolueno (2 x 400 ml) sob pressão reduzida e, em seguida, seco num forno a vácuo (50 °C, 0,2 mmHg, 17 h). A uma solução agitada de fosforodicloridato de 4-nitrofenilo (500,0 g, 1,953 mol) em diclorometano anidro (3,0 L) foi adicionada uma solução de fenol (183,8 g, 1,953 mol) e trietilamina (300 ml, 2,15 mol) em diclorometano (900 ml) a -60 °C temperatura interna ao longo de um período de 3 horas. A mistura foi agitada nesta temperatura durante 30 min adicionais e, em seguida, deixada que se aquecesse até

-5 °C ao longo de 2,5 horas. O éster de aminoácido pré-seco foi adicionado a -5~0 °C sob uma atmosfera de azoto ao longo de 10 min. O resíduo de sal de aminoéster no balão de adição foi transferido à mistura de reação via enxague com diclorometano (2 x 100 ml). A mistura foi agitada a 0 °C durante 40 min e uma segunda porção de trietilamina (571 ml, 4,10 mol) foi adicionada ao longo de um período de 40 min a 0 °C. A mistura foi agitada a 0~10 °C durante 3 h e, em seguida, o sólido branco (cloridrato de trietilamina) foi retirado por filtração e enxaguado com diclorometano (3 x 300 ml). O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi triturado com metil t-butil éter (MTBE, 4 L). O sal de sólido adicional assim formado foi retirado por filtração e enxaguado com MTBE (3 x 150 ml). O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para dar um óleo de cor castanho claro limpo. O resíduo foi co-evaporado com hexanos (2 x 140 ml) para remover qualquer MTBE residual e seco ainda sob vácuo a 40 °C durante 2 horas. O resíduo seco foi misturado com diisopropil éter (IPE, 1,1 L) e agitado a 5 °C num banho de água com gelo. Uma quantidade pequena de sementes de cristal do S<sub>P</sub>-isómero desejado do produto foi adicionada à solução e a mistura foi agitada a 5 °C durante ao longo de 22 h para formar uma suspensão meio espessa. Esta foi deixada que repousasse num congelador (-10 °C) durante 44 h. O produto precipitado foi colhido via filtração e enxaguado com solventes misturados pré-arrefecidos de IPE e hexanos (1:1, 3 x 190 ml). O sólido foi seco sob vácuo (0,5 mm Hg) à temperatura ambiente até que um peso constante fosse obtido para dar 227,23 g (rendimento: 28,5 %) como um pó branco sólido. A razão de dois diastereómeros S<sub>P</sub>:R<sub>P</sub> foi 9,65/1 com base em <sup>31</sup>P RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ -0,31 (S<sub>P</sub>), -0,47). O produto foi recristalizado por meio de dissolução em IPE (840 ml) enquanto se aquecia num banho a 60 °C. A solução acima foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h e, em seguida,

uma quantidade pequena de sementes de cristal de isómero de Sp foi adicionada. O pó branco sólido foi formado dentro de 2 horas e o balão foi armazenado num congelador (-10 °C) durante 16 horas. Um sólido cristalino fino e branco obtido foi filtrado, lavado com IPE pré-arrefecido (3x 50 ml) e seco sob vácuo (ambiente, 0,5 mm Hg) a um peso constante para dar um sólido fofo branco (177,7 g, 22 % de rendimento global ou 44 % de rendimento global com base em rendimento teórico do isómero Sp) com uma razão diastereomérica de 48/1 com base em P-RMN. Pf 62-66 °C.

**$^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz, DMSO-d6):** δ -0,31;  **$^1\text{H}$  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, 6H);

**$^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -2,05; (162 MHz, DMSO-d6): δ -0,31;  **$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,22 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26-7,18 (m, 3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88 (m, 1H), 1,38 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,22 (dd, J = 6,2 & 3,0 Hz, 6H);  **$^1\text{H}$  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, 6H)

**MS (ESI) m/z 407 (M-1)<sup>+</sup>.**

A estereoquímica de **8** (Sp-isómero) foi confirmado por meio de cristalografia de raios X de cristal único, veja-se pormenores proporcionados a seguir.

### Referência

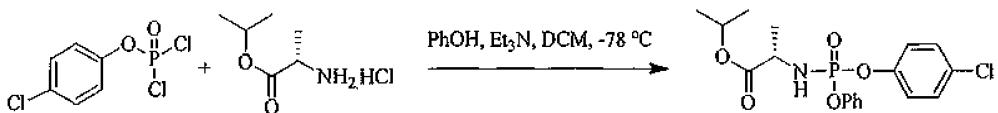
**Exemplo 7. Separação da mistura diastereomérica éster isopropílico do ácido [(S)-2-[(4-nitro-fenoxy)-fenoxifosforilamino] propiónico por meio de SFC**

Um amostra da mistura de diastereómeros (4,8 g) enriquecida com o R<sub>P</sub>-isómero foi submetida a SFC usando uma coluna ChiralPak AD-H (2x15 cm) e eluída com 35 % de

isopropanol em dióxido de carbono a 100 bar. Uma carga de injeção de 4 ml de amostra numa concentração de 17 mg/ml de metanol foi usada. O R<sub>P</sub>-isómero [éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (R)- (4-nitro-fenoxy)-fenoxi-fosforilamino] propiónico] eluiu primeiro. As frações apropriadas das múltiplas execuções foram combinadas e concentradas sob pressão reduzida para dar 2,9 g do R<sub>P</sub>-isómero [éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (R)- (4-nitro-fenoxy)-fenoxifosforilamino] propiónico] como um óleo viscoso amarelo claro e 1,9 g do S<sub>P</sub>-isómero [éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (S)- (4-nitro-fenoxy)-fenoxi-fosforilamino] propiónico] como um sólido branco. Dados analíticos de R<sub>P</sub>-isómero são similares aos do produto isolado pelo método de cristalização acima. **Dados analíticos para éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (R)- (4-nitro-fenoxy)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (8, R<sub>P</sub>-isómero):** <sup>31</sup>P RMN (162 MHz, DMSO-d6): δ - 0,47; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d6): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,46-7,38 (m, 4H), 7,27-7,20 (m, 3H), 6,68 (dd, J = 13,8, 10,2 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); MS (ESI) m/z 407 (M-1)<sup>+</sup>.

### Referência

**Exemplo 8-1. Preparação de éster isopropílico do ácido 2-[ (4-cloro-fenoxy)-fenoxi-fosforilamino] propiónico racémico (±):**



A uma solução agitada de fosforodicloridato de 4-cloro-fenilo (2,45 g, 10,0 mmol) em diclorometano (20 ml) foi adicionada uma solução de fenol (0,94 g, 10 mmol) e trietilamina (1,56 ml, 11 mmol) em diclorometano (20 ml) a -78 °C ao longo de um período de 20 min. A mistura foi agitada nesta temperatura durante 30 min e, em seguida, transferida a outro balão de fundo redondo que contém cloridrato de éster isopropílico L-alanina (1,67 g, 10

mmol) em diclorometano (50 ml) a 0 °C. À mistura foi adicionado um segundo lote de trietilamina (2,92 ml, 21 mmol) ao longo de um período de 15 min. A mistura foi agitada a 0 °C durante 1 h e, em seguida, o solvente foi evaporado. O resíduo foi triturado com acetato de etilo (30 ml) e o sólido branco foi retirado por filtração. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para dar um óleo amarelo pálido. O composto bruto foi submetido a cromatografia usando 1gradiante de 0-20 % de acetato de etilo/hexanos para dar o produto (2,0 g, 50 % de rendimento) como uma mistura de diastereómeros em cerca de uma razão 1:1. **<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ** -1,58, -1,62; **<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ** 7,06-7,51 (m, 8H), 7,15-7,28 (m, 2H), 7,29-7,47 (m, 2H), 4,0-4,10 (m, 1H), 3,82-3,88 (m, 3H), 1,35-1,36 (dd, 6H); 1,19-1,22 (m, 3H).

**MS (ESI) m/z** 398 (M-1)<sup>+</sup>. O produto resultante é purificado por meio de extração, cristalização, ou cromatografia, como indicado acima.

#### Referência

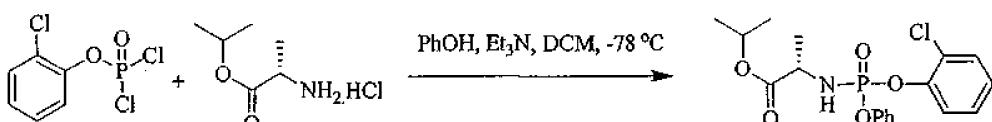
**Exemplo 8-2. Preparação de 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2 il)metoxi)(fenoxi)-fosforilamino)propanoato de (S)-isopropilo (4).**

A uma solução 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) em THF seco (50 ml) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv)) à temperatura ambiente ao longo de um período de 15 min. Após 30 min, uma solução de **éster isopropílico do ácido (2-[ (4-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico** racémico (4,08 g, 10 mmol) em THF (15 ml) foi adicionada gota a gota ao longo de um período de 10 min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 72. A TLC co-manchada com o produto autêntico mostrou que ao redor de 5 % do produto

desejado tinha sido formado em comparação com o nucleósido de partida.

### Referência

**Exemplo 9-1. Preparação de éster isopropílico do ácido 2-[ (2-cloro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico racémico ( $\pm$ ).**



A uma solução agitada de fosforodicloridato de 2-cloro-fenilo (9,8 g, 40 mmol) em diclorometano (80 ml) foi adicionada uma solução de fenol (3,76 g, 40 mmol) e trietilamina (6,16 ml, 44 mmol) em diclorometano (80 ml) a -78 °C ao longo de um período de 20 min. A mistura foi agitada nesta temperatura durante 30 min e, em seguida, transferida a outro balão de fundo redondo que contém cloridrato de éster isopropílico L-alanina (6,7 g, 40 mmol) em diclorometano (150 ml) a 0 °C. À mistura foi adicionada uma segunda porção de trietilamina (11,6 ml, 84 mmol) ao longo de um período de 15 min. A mistura foi agitada a 0 °C durante 1 h e, em seguida, o solvente foi evaporado. O resíduo foi triturado com acetato de etilo (100 ml) e o sólido branco foi retirado por filtração. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para dar um óleo amarelo pálido. O composto bruto foi submetido a cromatografia usando 1 gradiente de 0-20 % de acetato de etilo/hexanos para dar o produto (11,3 g, 72 % de rendimento) como uma mistura de diastereómeros em cerca de uma razão 1:1.

**RMN (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -1,58, -1,61; **<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,06-7,51 (m, 8H), 5,02-5,94 (m, 1H), 4,10-4,16 (m, 1H), 3,31-3,94 (m, 1H), 1,18-1,35 (m, 3H), 1,38-1,40 (dd, 6H); MS (ESI) *m/z* 398 (M-1)<sup>+</sup>. O produto resultante é purificado por meio de extração, cristalização, ou cromatografia, como indicado acima.

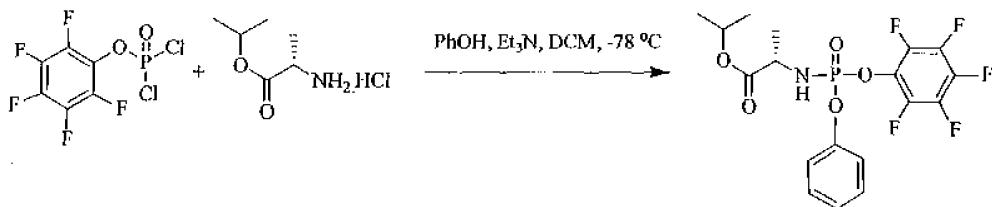
**Referência**

**Exemplo 9-2. Preparação de 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi(fenoxy)-fosforilamino)propanoato de (S)-isopropilo.**

A uma solução 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) em THF seco (50 ml) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv)) à temperatura ambiente ao longo de um período de 15 min. Após 30 min, uma solução de **éster isopropílico do ácido (2-[2-cloro-fenoxy]-fenoxy-fosforilamino] propiónico** (racémico 4,08 g, 10 mmol) em THF (15 ml) foi adicionado gota a gota ao longo de um período de 10 min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 72 h. A TLC co-manchada com o produto autêntico mostrou que ao redor de 5-10 % do produto desejado tinha sido formado em comparação com o nucleóside de partida.

**Referência**

**Exemplo 10-1. Preparação de éster isopropílico do ácido 2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenoxy)-fenoxy-fosforilamino] propiónico racémico (±).**



A uma solução agitada de fosforodicloridato de pentafluorofenilo (6,0 g, 20 mmol) em diclorometano (40 ml) foi adicionada uma solução de fenol e trietilamina (3,08 ml, 22 mmol) em diclorometano (40 ml) a -78 °C ao longo de um período de 20 min. A mistura foi agitada nesta temperatura durante 30 min e, em seguida, transferida a outro balão de fundo redondo que contém cloridrato de éster

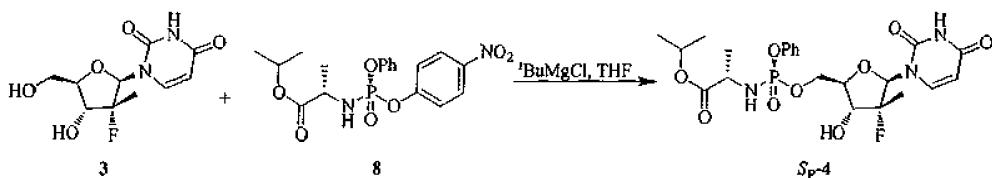
isopropílico L-alanina (3,35 g, 20 mmol) em diclorometano (100 ml) a 0 °C. À mistura foi adicionado um segundo lote de trietilamina (5,84 ml, 42 mmol) ao longo de um período de 15 min. A mistura foi agitada a 0 °C durante 1 h e, em seguida, o solvente foi evaporado. O resíduo foi triturado com acetato de etilo (60 ml) e o sólido branco foi retirado por filtração. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para dar um óleo amarelo pálido como uma mistura de diastereómeros em cerca de uma razão 1:1. **<sup>31</sup>P RMN (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -0,49, -0,58.** O produto resultante é purificado por meio de extração, cristalização, ou cromatografia, como indicado acima.

#### Referência

**Exemplo 10-2. Preparação de 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi(fenoxy)-fosforilamino)propanoato de (S)-isopropilo.**

A uma solução 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) em THF seco (50mL) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv)) à temperatura ambiente ao longo de um período de 15 min. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (2-[(2,3,4,5,6-pentafluoro fenoxy)-fenoxi-fosforilamino] propiónico racémico bruto (4,08 g, 10 mmol) em THF (15 mL) foi adicionada gota a gota ao longo de um período de 10 min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 72 h. A TLC co-manchada com o produto autêntico mostrou que ao redor de 40-50 % do produto desejado tinha sido formado em comparação com o nucleósido de partida.

A preparação e purificação de C ou C' proporciona o acesso direto a S<sub>P</sub>-4 ou R<sub>P</sub>-4, como ilustrado nos seguintes exemplos.



**Referência Exemplo 11. Preparação de S<sub>P</sub>-4** (32 mg-escala): a uma solução agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroximetil-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona 3 (32 mg, 0,12 mmol) em THF seco (1 ml) foi adicionada uma solução a 1 M de cloreto de terc-butilmagnésio (0,26 ml, 0,26 mmol, 2,1 equiv) à temperatura ambiente ao longo de um período de 3 min. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (8, S<sub>P</sub>-isómero) em THF (0,5 ml) foi adicionada gota a gota ao longo de um período de 3 min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 42 h e, em seguida, extinta com NH<sub>4</sub>Cl saturado aquoso (10 ml). A mistura foi dividida em partições entre acetato de etilo e água. O extrato orgânico combinado foi seco em sulfato de sódio anidro e concentrado. O resíduo foi submetido a cromatografia usando gradiente de 0-4 % de metanol/diclorometano para dar S<sub>P</sub>-4 como sólido espumoso (29 mg, 44,5 % de rendimento). <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P RMN confirmam o que é revelado no presente documento.

**Referência Exemplo 12. Preparação de S<sub>P</sub>-4** (2,6 g-escala, sem cromatografia): a uma solução agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroximetil-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (2,6 g, 10 mmol) em THF seco (50 ml) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (12,4 ml, 21 mmol, 2,1 equiv) à temperatura ambiente ao longo de um período de 15 min. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)-2-[(S)-(4-nitro-fenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (8, S<sub>P</sub>-isómero, 4,08 g, 10 mmol) em THF (15 ml) foi adicionada gota ao longo de um período de 10

min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 6 0 h e, em seguida, extinta com NH<sub>4</sub>Cl saturado aquoso (20 ml). A mistura foi dividida em partições entre acetato de etilo (150 ml) e sequencialmente, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso a 10 % (3 x 20 ml) e água (20 ml). O extrato orgânico combinado foi seco em sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado sob pressão reduzida para dar um resíduo amarelo pálido (3,8 g). O resíduo foi dissolvido em diclorometano (7,6 ml) e, em seguida, agitado durante 20 h à temperatura ambiente. O sólido branco foi filtrado, lavado com 1:1 IPE/diclorometano (5 ml) e seco sob vácuo para dar o produto puro como sólido branco (1,85 g, 35 % de rendimento).

**Referência Exemplo 13. Preparação de S<sub>P</sub>-4 usando NaHMDS:** uma solução agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il) -1H-pirimidina-2,4-diona (71 mg, 0,27 mmol) em THF seco (2,0 ml) foi adicionada uma solução a 2,0 M de sódio bis(trimetilsilil)amida (NaHMDS) em THF (270 ml, 0,54 mmol) a -78 °C ao longo de um período de 2 min. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (S) -(4-Nitro-fenoxy)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (8, S<sub>P</sub>-isómero, 111 mg, 0,27 mmol) em THF (1 ml) foi adicionada à mistura. A mistura de reação foi deixada a agitar nesta temperatura durante 2 h e, em seguida, aquecida até -20 °C em cuja temperatura foi agitada durante 20 h adicionais. A TLC indicou ~30 % de material de partida de nucleósido não reagido. Por este motivo, 0,5 equivalente adicional do reagente (55 mg, 0,14 mmol) em THF (0,5 ml) foi adicionado à mistura de reação e agitado durante outras 6 h. A mistura de reação foi extinta com solução de cloreto de amónio aquoso saturado e, em seguida, dividida em partições entre acetato de etilo e água. O extrato orgânico combinado foi seco em sulfato de sódio anidro e concentrado para dar um resíduo castanho claro. A cromatografia em coluna do

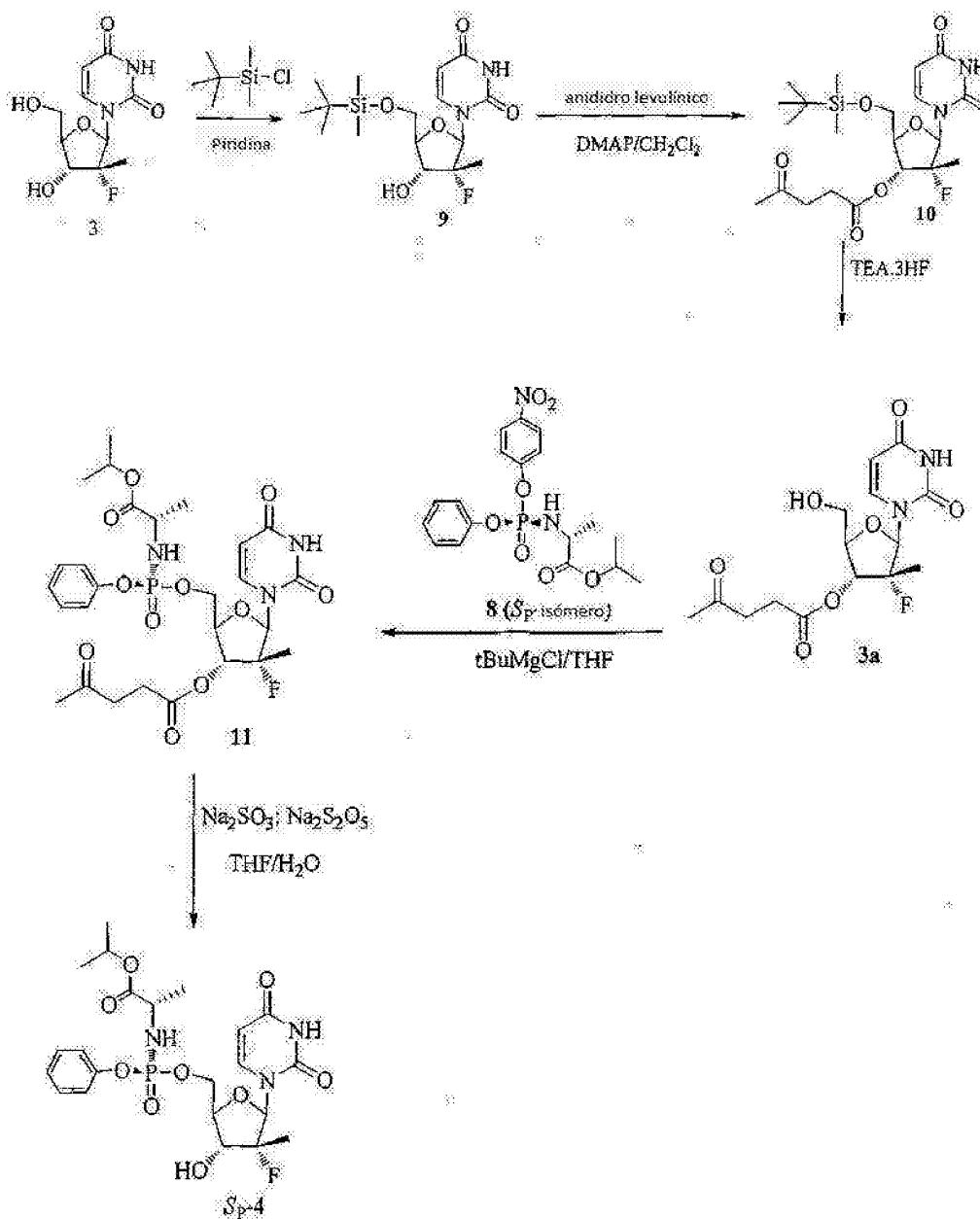
produto bruto usando gradiente de 0-5 % de metanol/diclorometano deu S<sub>P</sub>-4 (22 mg, 15 % de rendimento), 3'-fosforamidato (5, S<sub>P</sub>-isómero, 11,5 mg, 16 % de rendimento) e bis fosforamidato (6, S<sub>P</sub>, S<sub>P</sub>-isómero, 12,6 mg).

**Referência Exemplo 14. Preparação de Rp-4 (260 mg-escala):** a uma solução agitada de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-Fluoro-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (260 mg, 1 mmol) em THF seco (6 ml) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (1,23 ml, 2,1 mmol, 2,1 equiv) à temperatura ambiente ao longo de um período de 5 min. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (R) -(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (8, R<sub>P</sub>-isómero) em THF (3 ml) foi adicionada gota a gota ao longo de um período de 3 min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 96 h e, em seguida, extinta com NH<sub>4</sub>Cl saturado aquoso (10 ml). A mistura foi dividida em partições entre acetato de etilo (50 ml) e água (2 x 20 ml). O extrato orgânico combinado foi seco em sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado sob pressão reduzida para dar um resíduo amarelo pálido (490 mg). O resíduo foi submetido a cromatografia usando gradiente de 0-5 % de metanol/diclorometano para dar o produto como um sólido branco (160 mg, 30 % de rendimento).

A preparação de S<sub>P</sub>-4 ou R<sub>P</sub>-4 pode também ser alcançada por meio da reação de 3 3'-protegido com o reagente apropriado C ou C' ou uma mistura que contém C e C', como ilustrado nos seguintes exemplos.

#### Referência

**Exemplo 15. Preparação de S<sub>P</sub>-4 com 3a como um Intermediário Sintético**



### Referência

#### Exemplo 15-1. Síntese de 5'-O-terc-ButildimetilsNil-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (9):

A uma solução agitada de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina (3, 81,1 g, 312 mmol) em piridina seca (750 ml) foi adicionada gota a gota uma solução de TBDMSCl (103,19 g, 685,6 mmol) em piridina seca (500 ml) ao longo de um período de 45 min à temperatura ambiente. A reação

foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 24 h. Metanol (85 ml) foi adicionado à mistura de reação e foi deixado a agitar durante 10 min e, em seguida, os solventes foram retirados por destilação sob pressão reduzida. Água quente (45 °C) (1 L) foi adicionada à massa de reação e a mistura extraída com acetato de etilo (2 x 500 ml), lavada com água (1 x 500 ml). A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro. Acetato de etilo foi retirado por destilação e o resíduo obtido foi co-evaporado com tolueno (2 x 500 ml) para dar bruto 9 como uma espuma branca. Rendimento = 116,9 g (quantitativo).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  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 (l, s, 1H), 11,1 (s, 1H).

#### Referência

#### **Exemplo 15-2. Síntese de 5'-O-(terc-Butildimetsilsilil)-3'-O-levulinil-2'-deoxi-2'-fluoro 2'-C-metil-uridina (10):**

A uma solução agitada de nucleórido 9 (116,9 g, 312,1 mmol) em DCM (1 L) foi adicionado DMAP (30,5 g, 249,7 mmol) e esta foi deixada a agitar a TA durante 20 min. Uma solução de anidrido levulinico (133,6 g, 642,3 mmol) em DCM (200 ml) foi adicionada à mistura e deixada a agitar durante 24 h. A TLC da mistura indicou que a reação estava completa. Água fria (500 ml) foi adicionada e a mistura agitada durante 20 min. As camadas foram separadas e a camada orgânica foi lavada com solução de bicarbonato de sódio sat. (2 x 250 ml), seca em sulfato de sódio anidro e, em seguida, o solvente foi destilado sob pressão reduzida para dar um óleo amarelo. Rendimento bruto: 197,6 g (135 %). O material foi usado como tal na seguinte etapa.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  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, 1 H,  $J$  = 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 (l, s, 1H).

#### **Referência**

#### **Exemplo 15-3. Síntese de 3'-O-levulinil-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridina (3a):**

O material bruto 10 (197,6 g, ~312,1 mmol) foi dissolvido em DCM (1 L) ao qual foi adicionado TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) e deixado a agitar durante a noite à temperatura ambiente. A TLC da mistura indicou cerca de 50 % de conclusão de reação. Outro equivalente de TEA.3HF (50,3 g, 312,1 mmol) foi adicionado e a mistura de reação foi deixada a agitar durante 6 h. A TLC neste momento indicou cerca de 10 % de material de partida não reagido. Outros 0,25 eq de TEA.3HF (12,5 g, 78,0 mmol) foram adicionados e a mistura de reação foi deixada a agitar durante a noite. A mistura de reação foi concentrada até a secura para dar um óleo amarelo. O material bruto de todos os lotes foi purificado por meio de cromatografia em coluna em sílica gel (0-2 % de MeOH em DCM) para dar 124,1 g de 3'-levulinato como uma espuma branca sólida (rendimento de 90 % purificado ao longo de três etapas de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina).  $^1\text{H}$  RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1,55 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 20$  Hz), 2,36 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,8-3,03 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,91-3,96 (dd, 1H,  $\text{CH}''$ ), 4,2-4,25 (m, 1H,  $\text{CH}'$ ), 4,34 (dd, 1H,  $\text{CH}$ ,  $J = 8$  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).

#### **Referência**

#### **Exemplo 15-4. Síntese estereosseletiva de éster (S)-isopropílico do 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]-fenoxifosforilamino}-propiónico (11):**

A uma solução do nucleósido (3a, 1,00 mmol, 358 mg) em 5 ml de THF anidro que foi arrefecida até 0 °C foi adicionado tBuMgCl (1,7 M em THF, 2 eq) e deixando-se

aquecer até a temperatura ambiente e agitado durante meia hora. A esta mistura foi adicionado o reagente (cerca de 97 % de pureza quiral) éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (S)-(4-nitro-fenoxy)-fenoxi-fosforilamino] propiónico (8, S<sub>P</sub>-isómero) (408 mg, 1,00 mmol, 1,00 eq.) num lote e deixando-se agitar a ta. Após 16 h, havia ~30 % de material de partida restante. A mistura de reação foi extinta com 10 ml de solução de NH<sub>4</sub>Cl saturado, e a fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3 x25 ml). A camada orgânica combinada foi lavada com salmoura e seca em sulfato de sódio anidro e evaporada até a secura para dar uma espuma amarela pálida (500 mg). Esta foi purificada por meio de cromatografia em sílica gel usando 2-5 % de metanol em cloreto de metileno para dar o produto como uma espuma branca (275 mg) de cerca de 97 % de pureza quiral P e material de partida não reagido (162 mg). Com base no material de partida consumido, o rendimento foi 76 %. <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz): 3,7 ppm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,22 (dd, 6H, J = 6,4 Hz), 1,37 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,63-2,9 (m, 4H), 4,0 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,2-4,33 (m, 1H), 4,57 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,96-5,00 (sept, 1H), 5,2 (dd, 1H, J = 9 Hz), 5,42 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,19 (d, 1H, J = 18 Hz), 7,15-7,35 (m, 5H), 7,5 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 8,2 (l, s, 1H).

### Referência

**Exemplo 15-5. Síntese de éster (S)-isopropílico do ácido (S)-2-{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-2-ilmetoxi]-fenoxi-fosforilamino}-propiónico (Sp-4)**

Uma solução de sulfito de sódio foi preparada por meio da adição de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1,51 g) e Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (0,57 g) em água (25 ml). A uma solução do levulinato (11, 250 mg, 0,40 mmol) em THF anidro (2,5 ml) foi adicionado 1,0 ml da solução de sulfito de sódio. Esta foi deixada a agitar à temperatura

ambiente durante 4 h. A mistura de reação foi deitada em água (15 ml) e extraída com acetato de etilo (3x25 ml) seca e evaporada para dar quantitativamente um produto sólido branco com cerca de 97 % de pureza quiral P que se correspondia às propriedades físicas e espetrais de S<sub>P</sub>-4 produzido diretamente a partir do nucleósido não protegido.

### **Referência**

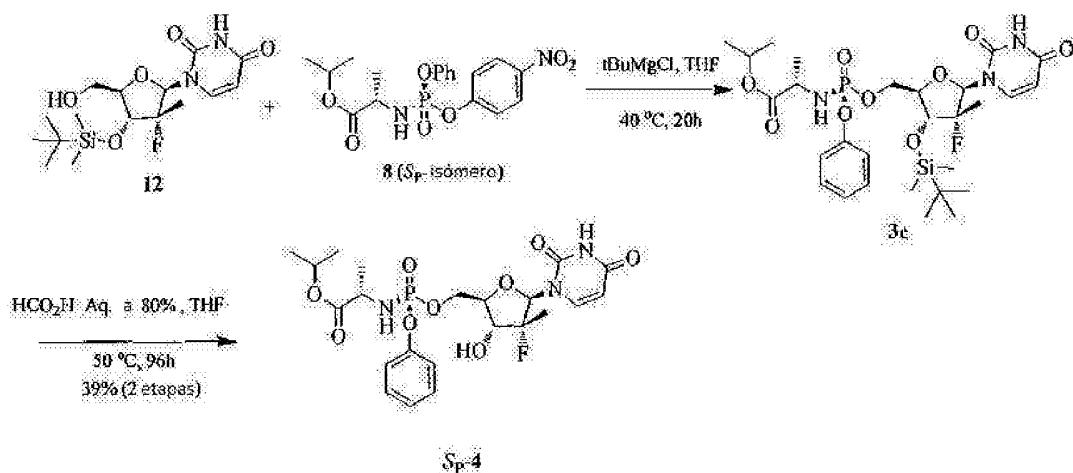
#### **Exemplo 16. Procedimento alternativo para preparar S<sub>P</sub>-4 a partir de 3a.**

A uma solução agitada de éster (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-fluoro-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ílico do ácido 4-oxo-pentanoico (3a, 210 mg, 0,59 mmol) em THF seco (1,5 ml) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (1,07 ml, 1,82 mmol) à temperatura ambiente ao longo de um período de 2 min. Inicialmente, um precipitado branco foi observado e após 10 min a mistura de reação tornou-se uma solução amarela escura. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxi-fosforilamino]-propiónico (8 (S<sub>P</sub>-isómero), 382 mg, 0,94 mmol) em THF (1,5 ml) foi adicionada gota a gota ao longo de um período de 3 min. A mistura foi aquecida a 40 °C durante 5 h em cujo tempo TLC e <sup>1</sup>H RMN indicou menos que 2 % de material de partida não reagido. A reação foi extinta com cloreto de amónio aquoso saturado e, em seguida, dividida em partições entre acetato de etilo e água. A camada orgânica combinada foi lavada com 10 % solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso (3 x 10 ml), seguido de água. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrado para dar resíduo de cor castanho (410 mg). O produto bruto foi dissolvido em tetrahidrofurano (1,0 ml) e, em seguida, foi adicionada uma solução aquosa da mistura de sulfito de sódio (37 mg, 0,295 mmol) e metabisulfito de sódio (224 mg, 1,18 mmol) em 1 ml de água. A mistura foi aquecida a 45 °C durante 20 h em qual estágio somente cerca

de 10 % de conversão foi observado por meio de TLC, por este motivo o sulfito de sódio adicional (74 mg) e metabisulfito de sódio (448 mg) foi adicionado e o aquecimento foi continuado durante 52 h adicionais. Neste tempo, uma conversão de cerca de 40 % foi observada por meio de TLC. A mistura de reação foi dividida em partições entre água e acetato de etilo. A camada orgânica combinada foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada para dar um resíduo castanho (210 mg). A cromatografia em coluna do resíduo usando gradiente de 0-5 % de MeOH/DCM deu material de partida não reagido (89 mg) e Sp-4 (57 mg, 18 % de rendimento, 24 % com base em material de partida recuperado).

### Referência

#### **Exemplo 17. Preparação de Sp-4 com 3c como um Intermediário Sintético**



### Referência

#### **Exemplo 17-1. Preparação de 1-[ (2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimetilsilaniloxi)-3-fluoro-5-hidroximetil-3- metiltetrahidrofurano-2-ill]-1H-pirimidina-2,4-diona, 12.**

A uma solução de 3 (10,0 g, 38,43 mmol) em piridina (50 ml) foram adicionados diclorometano (50 ml). A solução foi arrefecida até 0 °C. À solução foi adicionado cloreto de 4,4'-dimetoxitritílio (14,32 g, 42,27 mmol) e a solução

foi agitada a 0 °C durante 5 h. Metanol (5 ml) foi adicionado para extinguir a reação. A solução foi concentrada até a secura sob pressão reduzida e o resíduo foi dividido em partições entre acetato de etilo (500 ml) e água (50 ml). A solução orgânica foi lavada com salmoura (50 ml) e seca (sulfato de sódio, 4 g). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em diclorometano (100 ml). À solução foram adicionados imidazol (7,83 g, 115 mmol) e cloreto de t-butildimetilsililo (8,68 g, 57,6 mmol). A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 16 h. Metanol foi adicionado para extinguir a reação (5 ml) e o solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dividido em partições entre acetato de etilo (500 ml) e água (50 ml). A solução orgânica foi seca (sulfato de sódio, 4 g) e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia em coluna (10-40 % de EtOAc em Hexano) para dar produto intermediário 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS. Este é por sua vez foi tratado com 1 % de ácido trifluoroacético em diclorometano (200 ml). A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. Água (20 ml) foi adicionada e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante outra 1 h. Metanol (5 ml) foi lentamente adicionado e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante outra 1 h. Hidróxido de amónio foi adicionado para ajustar o pH da solução a 7. A solução orgânica foi separada, seca (sulfato de sódio, 4 g) e evaporada até a secura sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia em sílica gel em coluna (1-5 % de metanol em diclorometano) para dar 12 como um sólido branco 7,5 g em 50 % de rendimento ao longo das três etapas. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d6) δ (ppm) 11,48 (s 1, 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'um, H-4'), 3,58 (d 1, 1H, H-5'b), 1,27 (d, 3 H, 2-CH<sub>3</sub>), 0,89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,12 (s, 6H,

$\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ .

### Referência

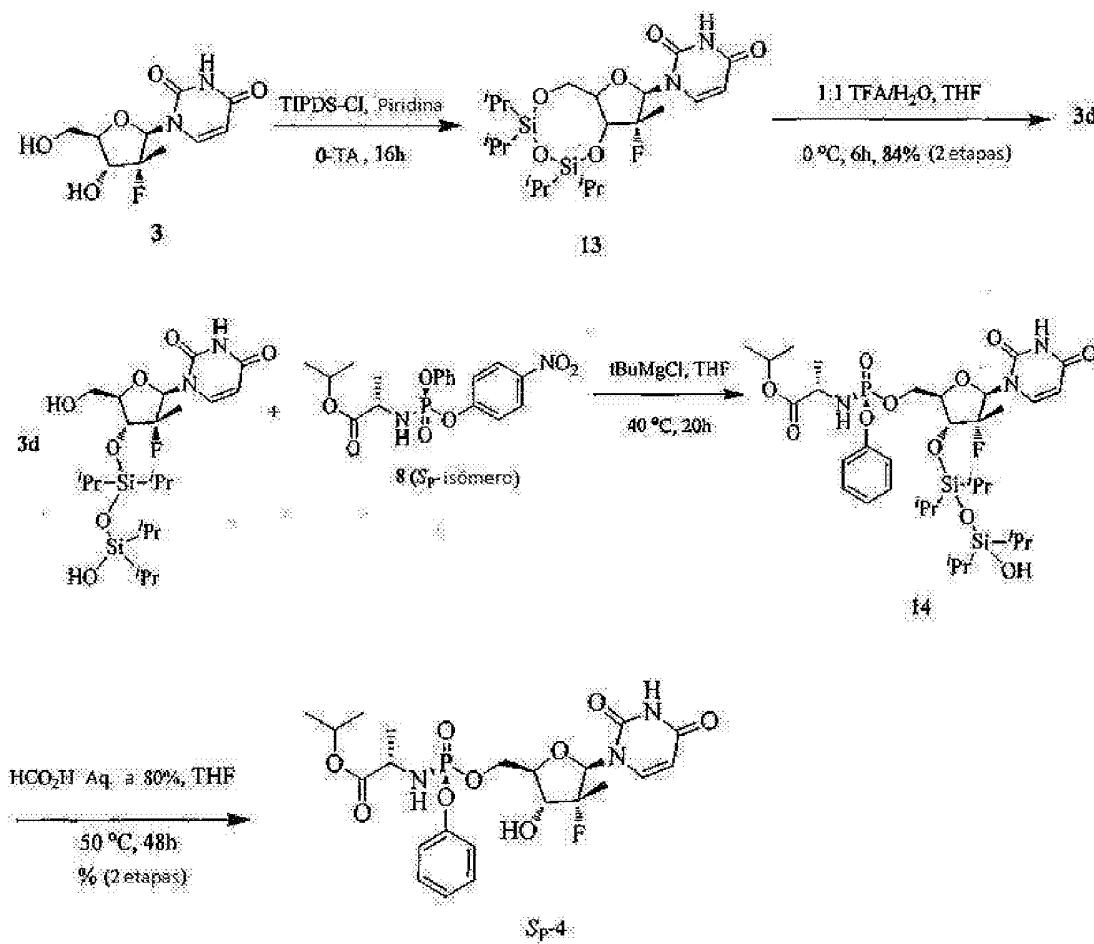
**Exemplo 17-2. Preparação de Sp-4 usando 1-[ (2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimethylsilaNiloxi)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidrofuran-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona (3c).**

A uma solução agitada de 1-[ (2R,3R,4R,5R)-4-(terc-butildimethylsilaNiloxi)-3-fluoro-5-hidroximetil-3-metiltetrahidro-furan-2-il]-1H-pirimidina-2,4-diona (12,374 mg, 1 mmol) em THF seco (3 ml) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (1,8 ml, 3,1 mmol)) à temperatura ambiente ao longo de um período de 2 min. Inicialmente, um precipitado branco foi observado e após 10 min a mistura de reação tornou-se uma solução amarela escura limpa. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)- 2-[ (S)-(4-nitrofenoxi)-fenoxifosforilamino]-propiónico (8, Sp-isómero, 653 mg, 1,6 mmol) em THF (2,5 ml) foi adicionada gota a gota ao longo de um período de 3 min. A mistura foi aquecida a 40 °C durante 20 h em cujo tempo TLC e <sup>1</sup>H RMN indicou menos que 5 % de material de partida não reagido. A mistura de reação foi extinta com cloreto de amónio aquoso saturado e, em seguida, dividida em partições entre acetato de etilo e água. A camada orgânica foi lavada com solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso a 10 % (3 x 10 ml), seguido de água (20 ml). A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada para dar um resíduo castanho que contém 3c (850 mg). O produto bruto foi dissolvido em tetrahidrofuran (2 ml) e foi adicionado 0,8 ml de ácido fórmico aquoso a 80 % à temperatura ambiente. A mistura de reação foi aquecida a 50 °C durante 96 h. Uma conversão de cerca de 70 % foi observada por meio de TLC. A mistura de reação foi deitada em bicarbonato de sódio aquoso saturado frio e, em seguida, dividida em partições entre acetato de etilo e água. A camada orgânica combinada foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada para dar resíduo castanho (220 mg). A

cromatografia em coluna do resíduo usando gradiente de 0-5 % de MeOH/DCM deu material de partida não reagido (21 mg) e S<sub>P</sub>-4 (77 mg, 35 % de rendimento, 39 % de rendimento com base em material de partida recuperado).

### Referência

#### Exemplo 18. Preparação de S<sub>P</sub>-4 com 3d como um Intermediário Sintético



### Referência

#### Exemplo 18-1. Preparação de 3d

A uma solução agitada de 3 em piridina (20 ml) a 0 °C foi adicionado TIPDS-Cl gota a gota ao longo de um período de 15 min. A mistura foi lentamente deixada que se aquecesse até a temperatura ambiente em cuja temperatura foi agitada durante 16 h. A piridina foi evaporada e o resíduo foi co-evaporado com tolueno (50 ml). O resíduo foi

então triturado com hexanos e o precipitado branco foi retirado por filtração usando uma almofada de Celite. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para dar um sólido espumoso (12,97 g). O produto bruto (13) foi redissolvido em tetrahidrofuran (75 ml) e foi adicionada uma solução aquosa de TFA (75 ml, 1:1 TFA/água) a 0 °C ao longo de um período de 20 min. A mistura foi agitada nesta temperatura durante 6 h. A TLC indicou ~5 % de material de partida. A mistura de reação foi extinta com NaHCO<sub>3</sub> saturado aquoso até pH 8 e, em seguida, extraída com acetato de etilo. O extrato orgânico combinado foi lavado com água, seco e concentrado para dar um sólido cristalino branco. Trituração adicional do sólido com hexanos (30 ml) deu um sólido branco que foi filtrado e seco sob alto vácuo para dar 3d (10,1 g, 84 % de rendimento ao longo de 2 etapas). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,83 (s 1, 1H), 7,94 (d 1, J = 6,0 Hz, 1H), 6,10 (d 1, J = 18,4 Hz, 1H), 5,71 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 4,43 (s 1, 1H), 4,36 (dd, J = 22,6, 9,0 Hz, 1H), 4,27 (s 1, 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).

### **Referência**

#### **Exemplo 18-2. Preparação de S<sub>P</sub>-4**

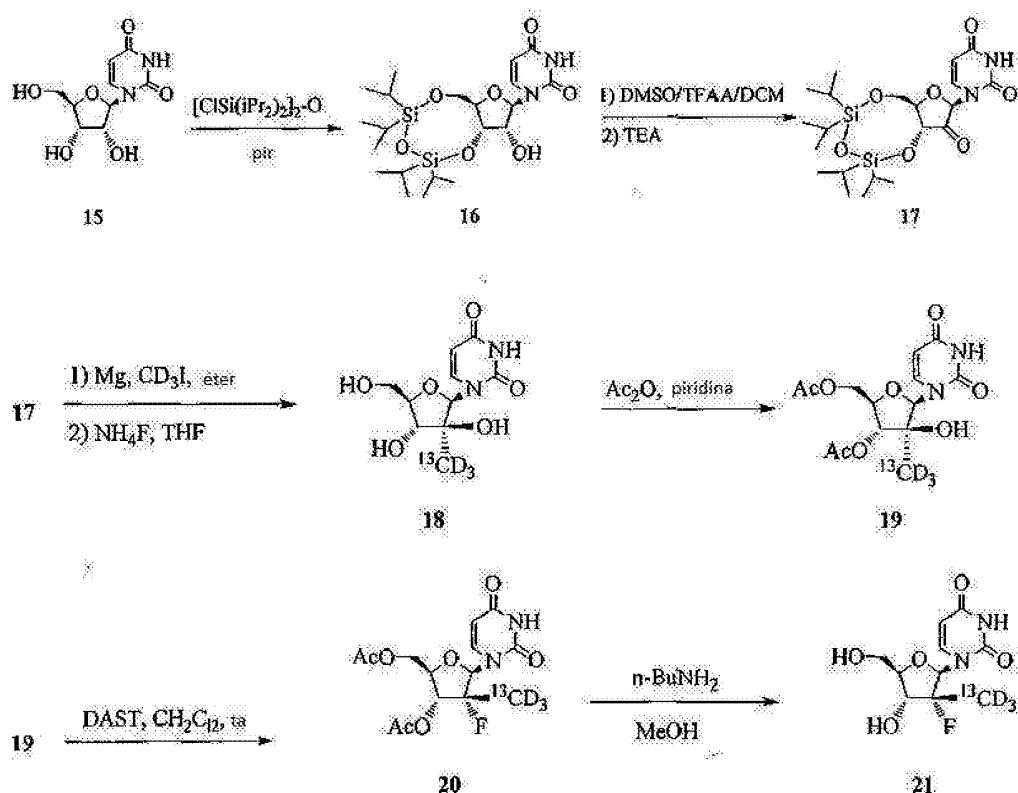
A uma solução agitada de 3d (520 mg, 1 mmol) em THF seco (5 ml) foi adicionada uma solução a 1,7 M de cloreto de terc-butilmagnésio (1,8 ml, 3,1 mmol, 3,1 equiv)) à temperatura ambiente ao longo de um período de 15 min. Após 30 min, uma solução de éster isopropílico do ácido (S)-2-[ (S)-(4-nitro-fenoxy)-fenoxifosforilamino] propiónico (8, S<sub>P</sub>-isómero, 653 mg, 1,6 mmol) em THF (1 ml) foi adicionada gota a gota ao longo de um período de 3 min. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 60 h. <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P RMN da amostra bruta indicou mistura de diastereómeros em cerca de 1:0,76. A mistura de reação foi extinta com NH<sub>4</sub>Cl saturado aquoso (20 ml). A mistura foi dividida em

partições entre acetato de etilo (150 ml) e sequencialmente,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aquoso a 10 % ( $3 \times 20$  ml) e água (20 ml). O extrato orgânico combinado foi seco em sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado sob pressão reduzida para dar um resíduo amarelo pálido (14, 878 mg).

O composto acima, 14, foi redissolvido em tetrahidrofurano (3 ml) e, em seguida, foi adicionado ácido fórmico aquoso a 80 %. A mistura foi aquecida a 55 °C durante 20 h. A mistura de reação foi arrefecida até 0 °C, e, em seguida, extinta com bicarbonato de sódio saturado aquoso (pH 7,0). A mistura de reação foi então dividida em partições entre acetato de etilo e água. A camada orgânica combinada foi seca em sulfato de sódio e concentrada para dar 560 mg do resíduo. O resíduo foi submetido a cromatografia usando gradiente de 0-5 % de metanol/diclorometano para dar material de partida não reagido (14, 242 mg) e S<sub>P</sub>-4 (80 mg, 15 % de rendimento) como um sólido branco.

#### **Referência**

#### **Exemplo 19. Preparação de S<sub>P</sub>-4 Isotopicamente Marcado**



### Referência

**Exemplo 19-1. Preparação de 1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-hidroxi-2,2,4,4-tetraisopropiltetrahidro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisiloxin-8-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, 16**

Uridina (15, 100,0 g, 409,5 mmol) foi co-evaporada até a secura com piridina anidra (600 ml) e ressuspensa em piridina anidra (700 ml). A esta suspensão fina agitada foi adicionado 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (135,7 g, 482,5 mmol) ao longo de 60 min à temperatura ambiente. Após agitação a suspensão fina durante 17 h à temperatura ambiente, a reação foi extinta por meio da adição de metanol (20 ml) e, em seguida, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dividido em partições entre acetato de etilo (1,5 L) e água (2 L). A camada orgânica foi lavada adicionalmente com 5 % de ácido clorídrico (2 x 1 L), salmoura (500 ml), seca em sulfato de sódio sólido

(50 g), filtrada e concentrada sob pressão reduzida ao produto bruto, cerca de 250 g. O resíduo foi submetido a uma coluna de filtração usando sílica gel (1,75 kg) e um gradiente de acetato de etilo em hexanos 20-65 %. As frações de produto puro como julgado por uma TLC homogénea ( $R_f$  0,55 em 1:1 hexanos-acetato de etilo) foram combinadas e concentradas sob pressão reduzida e secas (40 °C, 0,2 mm Hg, 24 h) para proporcionar 145,5 g (76 %) de 16 como uma espuma branca sólido. Uma fração adicional (35 g) de ligeiramente impura 16 foi também colhida.  $^1H$  RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 11,35 (s, 1H, NH), 7,66 (d, 1H,  $J$  = 7,6 Hz, H-6), 5,57 (d, 1H,  $J$  = 4,8 Hz, 2'-OH), 5,50-5,49 (m, 2H, 1'-H e H-5), 4,14-4,18 (m, 3H, 2', 3', 4'-H), 3,97-3,87 (m, 2H, 5'-Ha e Hb), 1,02-0,95 (m, 28H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **Referência**

**Exemplo 19-2. Preparação de 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-tetraisopropil-9-oxotetrahidro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilicin-8-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, 17**

A um balão redondo de três tubulações seco foram adicionados DCM anidro (600 ml) e DMSO (30,82 g, 394,5 mmol). A solução foi arrefecida até -78 °C num banho de gelo seco/acetona sob uma atmosfera de azoto. Anidrido trifluoroacético (puro, 77,7 g, 369,8 mmol) foi adicionado via uma seringa ao longo de 40 min e propiciou uma mistura opaca. À mistura uma solução de derivado de uridina 16 em DCM (600 ml) foi adicionada gota a gota ao longo de 75 min a -78 °C via um funil de adição. A mistura heterogénea foi agitada durante 2 h a -78~65 °C e, em seguida, trietilamina anidra (92 ml) foi adicionada via uma seringa rapidamente para formar uma solução amarela clara limpa. Após 1 h a temperatura baixa, a reação foi completada como mostrado por meio de TLC (30 % de EtOAc em hexanos). O banho de arrefecimento foi removido e a mistura de reação foi aquecida lentamente até a temperatura ambiente ao longo

de 1 h. A reação foi extinta por meio da adição de NH<sub>4</sub>Cl sat. (180 ml). Água (200 ml) foi adicionada e camada orgânica foi separada. A camada aquosa foi extraída de novo com DCM (300 ml). A camada orgânica combinada foi lavada com água (3x 400 ml), salmoura (150 ml), e seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A remoção de solvente propiciou um resíduo castanho pegajoso.

O resíduo de óleo bruto ( continha traço de DCM) foi armazenado durante a noite no congelador. Após este período durante a noite, algum sólido cristalino foi observado no óleo. O óleo foi dissolvido em 500 ml de hexanos à temperatura ambiente. A solução foi armazenada no congelador durante 24 horas e mais sólido foi formado. O sólido foi colhido via filtração e enxaguado com 10 % de DCM frio em hexanos (1 L) para remover a maior parte da cor laranja. O sólido (17) foi seco sob vácuo durante 2 h e, em seguida, ar seco durante 24 h. O sólido pesava 21 g após secagem a 50 °C sob vácuo. O filtrado foi concentrado e o resíduo foi purificado via cromatografia em coluna (10-70 % de acetato de etilo em hexanos) para proporcionar uns 37 g adicionais (rendimento combinado de 97 %) de 17 como um sólido laranja claro.

### **Referência**

**Exemplo 19-3. Preparação de 1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)-3-<sup>13</sup>C-perdeuteriotetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona, 18**

Magnésio (3,53 g, 147 mmol), lavado com ácido clorídrico aquoso a 5 % e seco (50 °C, 0,2 mm Hg, 24 h), foi colocado num balão de fundo redondo de duas tubulações equipado com um agitador magnético e um condensador. O balão foi preenchido com gás argônio e, em seguida, éter anidro (80 ml) foi adicionado. Ao magnésio em éter foi adicionado lentamente iodeto de metilo perdeuterio- <sup>13</sup>C (15,06 g, 110,3 mmol), que gerou uma reação exotérmica. Após a mistura de reação ter sido arrefecida, o

sobrenadante foi transferido a uma solução de composto seco 17 (50 °C, 0,2 mm Hg, 15 h) (10,0 g, 20,63 mmol) em THF anidro (1 L) a -50 °C ao longo de 20 min. A temperatura foi deixada que se elevasse até -40 °C e a mistura foi agitada de entre -40 até -25 °C durante 4 h. Após a conclusão da reação, a mistura foi diluída com EtOAc (1 L) a -50 °C e, em seguida, salmoura (300 ml) foi adicionada lentamente. A camada orgânica foi separada e, em seguida, lavada com solução de cloreto de amónio saturado (300 ml x 2) e seca com sulfato de sódio. Após filtração e concentração sob pressão reduzida, o resíduo foi dissolvido em MeOH (250 ml). Fluoreto de amónio (12 g) e TBAF (400 mg) foram adicionados. A mistura resultante foi agitada a 90 °C durante 7 h e, em seguida, concentrada com sílica gel (20 g) sob pressão reduzida. Após secagem minuciosa a vácuo, o resíduo obtido foi purificado por meio de cromatografia flash em sílica gel em coluna (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1:20 a 1:10) para dar o composto 18 (5 g, 46 %) como um sólido branco.  
<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 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").

#### **Referência**

**Exemplo 19-4. Preparação de acetato de ((2R,3R,4S,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidm-1(2H)-il)-4-hidroxi-4-<sup>13</sup>C-perdeuteriotiltetrahidrofuran-2-il) metilo, 19**

A uma solução de composto 18 (5,00 g, 19,1 mmol) em piridina anidra (100 ml) foi adicionado anidrido acético (3 ml) à temperatura ambiente. A mistura resultante foi agitada a temperatura ambiente durante 15 h, diluída com EtOAc (250 ml), lavada com água (50 ml x 3), e seca com sulfato de sódio. Após filtração e concentração, o resíduo foi purificado por meio de cromatografia flash em coluna

(MeOH 0 a 5 % em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar o composto 19 (4,0 g, 68 %) como um sólido cinza.

### **Referência**

**Exemplo 19-5. Preparação de acetato de ((2R,3R,4R,5R)-3-acetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-4-<sup>13</sup>C-perdeuteriometiltetrahidrofuran-2-il) metilo, 20**

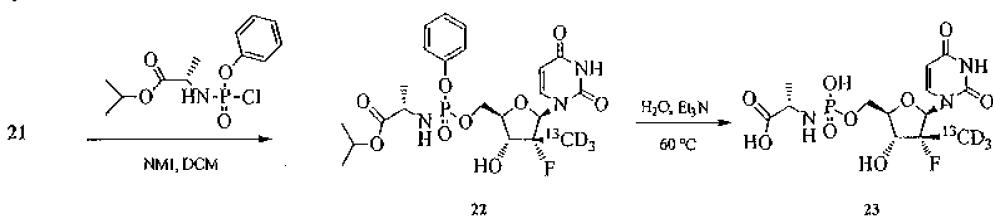
A uma solução de composto 19 (2,33 g, 6,73 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (60 ml) foi adicionado DAST (1,33 ml, 10,1 mmol) a -78 °C lentamente. A mistura resultante foi agitada durante 30 min após ser exposta à temperatura ambiente. Uma escala de duas reações de 2,33 g e uma escala de uma reação de 1,00 g foram conduzidas exatamente do mesmo modo. Todas as quatro misturas de reação foram combinadas, diluídas com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 ml), e lavadas com água com gelo (100 ml x 2) e, em seguida, solução de NaHCO<sub>3</sub> aquoso frio (100 ml x 2). Após a secagem, filtração, e concentração, o resíduo foi purificado por meio de cromatografia flash em sílica gel em coluna (EtOAc 0 % a 50 % em hexanos, o composto saiu ao redor de 48 %) para dar o composto 20 (2,0 g, 24 % a partir do total 7,99 g de composto 19) como um sólido branco. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,27 (s, 1H, NH), 7,55 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-6), 6,17 (d, 1H, J = 18,8 Hz, H-1'), 5,78 (dd, 1H, J = 1,2, 8,4 Hz, H-5), 5,12 (dd, 1H, J = 9,6, 21,6 Hz, H-3'), 4,40-4,31 (m, 3H, H-4', 5', 5''), 2,19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### **Referência**

**Exemplo 19-6. Preparação de 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-<sup>13</sup>C-perdeuteriometil-tetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H-diona, 21**

A uma solução de composto 20 (2 g, 5,74 mmol) em metanol (20 ml) foi adicionado n-butilamina (6 ml). A mistura resultante foi agitada a ta durante 15 h e concentrada com sílica gel a vácuo. O resíduo obtido foi purificado por meio de cromatografia flash em sílica gel em

coluna (MeOH 0 a 10 % em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar o composto 21 (1,3 g, 85 %) como um sólido branco. <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD) 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.



### Referência

**Exemplo 19-7. Preparação de 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-<sup>13</sup>C-perdeuteriometiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilammo)propanoato de (S)-isopropilo, 22**

A uma solução do nucleósido não protegido 21 (207 mg, 0,783 mmol) e *N*-metilimidazol (0,4 ml, 5 mmol) em THF (4 ml) foi adicionado o fosforocloridato pré-elaborado em THF (1,0 M, 2,35 ml, 2,35 mmol) a 0 °C gota a gota. A reação foi lentamente aquecida até a temperatura ambiente ao longo de 1 h e, em seguida, água (1 ml) e EtOAc (5 ml) foram adicionados. A solução orgânica foi lavada com citrato de sódio sat. aq. mono básico (2 x 2 ml), NaHCO<sub>3</sub> sat. aq. (1 x 2 ml), seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada sob pressão reduzida. O material bruto foi purificado por meio de sílica cromatografia em coluna usando 0 a 5 % <sup>i</sup>Pr OH em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluentes para dar o fosforamidato, 22 (216 mg, 52 %, mistura 1:1 de P-diastereómeros) como um sólido branco: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,54 (s, 1H), 7,56 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,40-7,35 (m, 2H), 7,23-7,18 (m, 3 H), 6,14-5,96 (m, 2H), 5,89 (dd, *J* = 5,6, 25,6 Hz, 1H), 5,55 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,85 (dq, *J* = 1,6, 6,0 Hz, 1H), 4,44-4,32 (m, 1H),

4,25 (m, 1H), 4,06-3,98 (m, 1H), 3,86-3,70 (m, 2H), 1,30-1,08 (m, 9H);  $^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  4,90, 4,77; LRMS (ESI) [M + H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub><sup>13</sup>CH<sub>27</sub>D<sub>3</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>9</sub>P 534,5, encontrado 534,4.

#### Referência

**Exemplo 19-8. Preparação de ácido (2S)-2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-<sup>13</sup>C-perdeuteriotiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(hidroxi)fosforil)amino)propanoico, 23**

Fosforamidato 22 (147 mg, 0,276 mmol) foi suspenso em trietilamina (2 ml) e água (0,5 ml), e aquecido a 60 °C durante 30 h. Então os componentes voláteis foram evaporados sob pressão reduzida. O material bruto foi purificado por meio de cromatografia em coluna de sílica gel por meio da eluição com 50-70 % de <sup>i</sup>Pr OH em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e então, 0 a 20 % de NH<sub>4</sub>OH em <sup>i</sup>Pr OH para dar 23 como um sólido branco (95 mg, 83 %):  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  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);  $^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8,12; LRMS (ESI) [M + H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>12</sub><sup>13</sup>CH<sub>17</sub>D<sub>3</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>9</sub>P 416,3, encontrado 416,4.

#### Propriedades de Amostras de R<sub>P</sub>-4, 4, e S<sub>P</sub>-4

As amostras de R<sub>P</sub>-4, 4, e S<sub>P</sub>-4 foram analisadas por meio de difração de pó de raios X (XRPD), espetrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), espetroscopia infravermelho de transformada de Fourier (FT-IR), calorimetria de varrimento diferencial (DSC), análise gravimétrica térmica (TGA), adsorção de vapor gravimétrica (GVS), solubilidade aquosa termodinâmica, e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

#### Referência

**Exemplo 20. Difração de pó de raios X**

As amostras de R<sub>P</sub>-4, 4, e S<sub>P</sub>-4 foram analisadas por meio de difração de pó de raios X (XRPD) sob o seguinte regime.

#### a. Bruker AXS/Siemens D5000

Os padrões de difração de pó de raios X foram colhidos num difratómetro Siemens D5000 usando radiação Cu K $\alpha$  (40 kV, 40 mA), goniómetro  $\theta$ - $\theta$ , divergência de V20 e fendas de recebimento, um monocromador secundário de grafite e um contador de cintilação. O desempenho do instrumento é verificado usando um padrão Corundum certificado (NIST 1976). O software usado para a colheita de dados foi Diffrac Plus XRPD Commander v2.3.1 e os dados foram analisados e apresentados usando Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 ou v 13.0.0.2.

#### Condições ambientais

As amostras executadas sob condições ambientais foram preparadas como espécimes de placa plana usando pó como recebido. Aproximadamente 35 mg da amostra foram suavemente embalados numa cavidade cortada em obreia de silício de fundo zero polida (510). A amostra foi girada no seu próprio plano durante a análise. Os pormenores da colheita de dados são: intervalo angular: 2 a 42°20; tamanho de etapa: 0,05°20; e tempo de colheita: 4 s.etapa<sup>-1</sup>.

#### **b. Bruker AXS C2 GADDS**

Os padrões de difração de pó de raios X foram colhidos num difratómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiação Cu K $\alpha$  (40 kV, 40 mA), fase XYZ automatizada, microscópio de vídeo laser para posicionamento de auto-amostra e um detetor de área bidimensional HiStar. Óptica de raios X consiste num único espelho multicamada Göbel acoplado com um colimador de orifício de 0,3 mm.

A divergência dos feixes, ou seja, o tamanho efetivo do feixe de raios X na amostra, foi de aproximadamente 4 mm. Um modo de varrimento contínuo  $\theta$ - $\theta$  foi utilizado com uma distância de amostra - detetor de 20 cm que dá um intervalo efetivo de 2 $\theta$  de 3,2°-29,7°. Tipicamente, a amostra será exposta ao feixe de raios X durante 120 segundos. O software usado para a colheita de dados foi GADDS para WNT 4.1.16 e os dados foram analisados e

apresentados utilizando Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 ou v 13.0.0.2.

#### Condições ambientais

As amostras executadas sob condições ambientais foram preparadas como espécimes de placas planas usando pó como recebido sem moagem. Aproximadamente 1-2 mg de amostra foram ligeiramente pressionadas sobre uma lâmina de vidro para obter uma superfície plana.

#### Difração de pó de raios X (XRPD)

**4** foi encontrado por XRPD como sendo amorfo (veja-se Fig. 1). A análise de alta resolução de XRPD de R<sub>P</sub>-4 preparado de acordo com o Exemplo 3 confirmou um sólido cristalino que exibe um padrão de pó diferente a esse do S<sub>P</sub>-4 (preparado de acordo com o Exemplo 4, Método 4), que foi também confirmado como sendo um sólido cristalino. Os resultados de XRPD para R<sub>P</sub>-4 e S<sub>P</sub>-4 são mostrados no Quadro 1 com todos os picos exibindo uma intensidade de ≤5 % (R<sub>P</sub>-4) e ≤3 % (S<sub>P</sub>-4) excluído.

**Quadro 1. Dados de XRPD para R<sub>P</sub>-4 e S<sub>P</sub>-4.**

Dados de XRPD para R <sub>P</sub> -4		Dados de XRPD para S <sub>P</sub> -4	
Ângulo 2-Teta °	% de intensidade	Ângulo 2-Teta °	% de intensidade
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
29,450	6,8	27,339	3,7
29,735	9,4	27,646	3,5
31,372	8,2	28,066	3,1
31,967	10,9	29,050	3,0
32,295	6,4	29,541	3,6
33,001	11,4	30,178	3,8
33,774	11,8	31,648	3,1
34,385	6,6	32,721	3,5
34,734	6,5	33,154	3,0
35,600	7,3	33,923	3,5
35,965	13,1	34,341	3,1
36,409	14,7	35,465	3,5
36,880	7,0	36,923	3,1
37,509	5,9	37,760	3,4
37,870	6,0	38,404	3,3
38,313	5,8	40,416	3,1
38,943	8,4		
40,093	6,6		

40,511	7,8
41,429	6,5

---

Uma amostra de S<sub>P</sub>-4 foi moída com um pilão e almofariz, e, em seguida, sucessivamente passada através de crivos de 500 e 250 µm para produzir a amostra como um pó fino. Esta amostra foi reanalisada por meio de XRPD de alta resolução, confirmando que nenhuma alteração de forma ocorreu.

**Exemplo 21. Estudos de cristalização para S<sub>P</sub>-4.**

S<sub>P</sub>-4 cristalino exibe polimorfismo. Assim, um aspetto refere-se a S<sub>P</sub>-4 cristalino e suas formas polimórficas individuais. S<sub>P</sub>-4 pode existir em pelo menos cinco formas polimórficas, designadas como Formas 1-5. Além disso, S<sub>P</sub>-4 amorfo pode também ser preparado. Uma cristalização típica trata de dissolver cerca de 100 mg de S<sub>P</sub>-4 num volume apropriado de solvente de cristalização (acetonitrilo (5 vol), clorofórmio (5 vol), acetato de n-butilo (7 vol), diclorometano (50 vol), anisol (7 vol), e 1:1 MTBE/heptano (50 vol)) e, em seguida, permitindo a evaporação da solução a 5 °C. Várias formas cristalinas foram obtidas, mas cada forma, após filtração e/ou secagem, propiciou a Forma 1.

As Formas 1, 2 e 3 são uma forma não-solvatada, 1:1 solvato DCM e 1:1 solvato clorofórmio, respectivamente, como foi confirmado por meio de análise de raios X de cristal único e XRPD. As Formas 4 e 5 foram obtidas a partir de cristalização de S<sub>P</sub>-4 das soluções de acetonitrilo e anisol, respectivamente. Dados suficientes não podem ser recolhidos para determinar se as Formas 4 e 5 são não solvatadas, hidratadas ou solvatadas uma vez que cristais únicos de qualidade suficiente não foram obtidos. As Formas 4 e 5 transformam-se na Forma 1 na filtração. Duas formas cristalinas adicionais são obtidas após cristalização de S<sub>P</sub>-4 a partir de acetato de n-butilo ("BuAc) e uma solução que contém metil-'butil éter (MTBE) e heptano; após

filtração ambas as formas cristalinas convertem-se na Forma 1. As Formas 2 e 3 também se transformam na Forma 1 em isolamento. A Forma 1 é uma forma não-solvatada, que exibe uma endotermia de fusão larga com uma temperatura inicial de 94,3 °C e  $\Delta H_{fus}$  de 24,0 kJ mol<sup>-1</sup>. Um padrão adicional de XRPD de Forma 1 de S<sub>P</sub>-4 é representado na **Figura 4**.

### **Referência**

#### **Exemplo 21-1. S<sub>P</sub>-4 Forma 1**

Uma lista de picos da Forma 1 de S<sub>P</sub>-4 é apresentada no **Quadro 2**.

<b>Ângulo</b>	<b>% de intensidade</b>
<b>2-Teta °</b>	<b>%</b>
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
27,2	3,2
27,5	2,2
28,1	2,9
30,0	3,2

### Referência

#### Exemplo 21-2. Forma 2 de S<sub>P-4</sub>

Um padrão de XRPD da Forma 2 de S<sub>P-4</sub> é representado na **Figura 5.**

Uma lista de picos da Forma 2 de S<sub>P-4</sub> é apresentada no **Quadro 3.**

Ângulo 2-Teta°	% de intensidade
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

### Referência

#### Exemplo 21-3. Forma 3 de Sp-4

Um padrão de XRPD da Forma 3 de Sp-4 é representado na **Figura 6.**

Uma lista de picos da Forma 3 de Sp-4 é apresentada no **Quadro 4.**

Ângulo 2-Teta °	% de intensidade %
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

**Referência****Exemplo 21-4. Forma 4 de S<sub>P</sub>-5**

Um padrão de XRPD da Forma 4 de S<sub>P</sub>-4 é representado na **Figura 7.**

Uma lista de picos da Forma 4 de S<sub>P</sub>-4 é apresentada no **Quadro 5.**

<b>Ângulo</b>	<b>% de intensidade</b>
<b>2-Teta °</b>	<b>%</b>
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

**Referência****Exemplo 21-5. Forma 5 de S<sub>P</sub>-4**

Um padrão de XRPD da Forma 5 de S<sub>P</sub>-4 é representado na **Figura 8.**

Uma lista de picos da Forma 5 de S<sub>P</sub>-4 é apresentada no **Quadro 6.**

<b>Ângulo</b>	<b>% de intensidade</b>
<b>2-Teta °</b>	<b>%</b>
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

**Exemplo de Referência 21-6. S<sub>P</sub>-4 (Amorfo)**

Um padrão de XRPD para S<sub>P</sub>-4 amorfo é representado na **Figura 9.**

**Referência****Exemplo 22. Cristalografia de raios X de Cristal Único de S<sub>P</sub>-4 e seus solvatos****Referência****Exemplo 22-1. Cristalografia de raios X de Cristal Único de S<sub>P</sub>-4 (Forma 1)**

A Figura 10 mostra uma estrutura cristalina de raios X para a Forma 1 de S<sub>P</sub>-4. Neste documento, a figura mostra uma vista de moléculas de Forma 1 da estrutura de cristal que mostra o esquema de numeração utilizado. Elipsóides de deslocamento atómico anisotrópico para os átomos de não hidrogénio são mostrados no nível de probabilidade de 50 %. Os átomos de hidrogénio são mostrados com um raio arbitrariamente pequeno.

A solução de estrutura foi obtida por meio dos métodos diretos, refinamento de mínimos quadrados de matriz total em  $F^2$  com ponderação  $w^{-1} = \sigma^2(F_o)^2 + (0,0592P)^2 + (0,6950P)$ ,

onde  $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ , parâmetros de deslocamento anisotrópico, correção de absorção empírica usando harmônica esférica, implementada em algoritmo de escalamento SCALE3 ABSPACK.  $wR^2 = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,0871$  final para todos os dados,  $R_1 = 0,0329$  convencional em valores de  $F$  de 7090 reflexões com  $F_o > 4\sigma(F_o)$ ,  $S = 1,016$  para todos os dados e 870 parâmetros.  $\Delta/\sigma(\text{máx})$  final 0,001,  $\Delta/\sigma(\text{média})$ , 0,000. Mapa de diferença final entre +0,534 e -0,36 e  $\text{\AA}^{-3}$ .

**Quadro 7.** Parâmetros de Cristal Único da Forma 1

Fórmula molecular	<chem>C22H29F1N3O9P1</chem>				
Peso molecular	529,45				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo de espaço	$P2_1$	$a$	20,0898 (5) $\text{\AA}$ ,	$\alpha$	90°,
		$b$	6,10290 (10) $\text{\AA}$ ,	$\beta$	112,290 (3) °,
		$c$	23,0138 (6) $\text{\AA}$ ,	$\gamma$	90°
V	2610,79 (10) $\text{\AA}^3$				
Z	4				
$D_c$	1,347 g. $\text{cm}^{-3}$				
$u$	1,475 mm $^{-1}$				
Fonte, X	Cu K $\alpha$ , 1,54178 $\text{\AA}$				
$F(000)$	1112				
T	100 (1) K				
Cristal	Placa incolor, 0,12 x 0,09 x 0,03 mm				
Dados truncados para	0,80 $\text{\AA}$				
$\theta_{\text{máx}}$	74,48°				
Plenitude	99,4 %				
Reflexões	14854				
Reflexões únicas	7513				
$R_{\text{int}}$	0,0217				

### Referência

#### Exemplo 22-2. Cristalografia de raios X de Cristal Único de Sp-4 (Forma 2)

A Figura 11 mostra uma estrutura cristalina de raios X para a Forma 2 de Sp-4. Neste documento, esta figura mostra uma vista de moléculas da Forma 2 da estrutura de cristal que mostra o esquema de numeração utilizado. Os heteroátomos foram resolvidos isotropicamente devido a dados muito fracos. Os átomos de hidrogénio não são mostrados.

A solução de estrutura foi obtida por meio dos métodos diretos, refinamento de mínimos quadrados de matriz total em  $F^2$  com ponderação  $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0975P)^2 + (10,6969P)$ , onde  $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ , parâmetros de deslocamento anisotrópico, correção de absorção empírica usando harmônica esférica, implementada em algoritmo de escalamento SCALE3 ABSPACK.  $wR^2 = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum [w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,1883$  final para todos os dados,  $R_1 = 0,0741$  convencional em valores de  $F$  de 2525 reflexões com  $F_o > 4a(F_o)$ ,  $S = 1,05$  para todos os dados e 158 parâmetros.  $\Delta/\sigma(\text{máx})$  final 0,000,  $\Delta/\sigma(\text{média})$ , 0,000. Mapa de diferença final entre + 1,388 e -0,967 e  $\text{\AA}^{-3}$ .

**Quadro 8. Parâmetros de Cristal Único da Forma 2**

Fórmula molecular	$C_{23}H_{31}Cl_2FN_3O_9P$				
Peso molecular	614,38				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo de espaço	$P2_1$	$a$	12,8315 (3) $\text{\AA}$ ,	$\alpha$	90°,
		$b$	6,14530 (10) $\text{\AA}$ ,	$\beta$	91,752 (2)°,
		$c$	17,6250 (4) $\text{\AA}$ ,	$\gamma$	90°
V	1389,14(5) $\text{\AA}^3$				
Z	2				
$D_c$	1,469 g. $\text{cm}^{-3}$				

$\mu$	3,196 mm <sup>-1</sup>
Fonte, $\lambda$	Cu-K, 1,54178 Å
$F(000)$	640
$T$	293(2) K
Dados truncados para	0,80 Å
$\Theta_{\text{máx}}$	62,23°
Plenitude	91,1 %
Reflexões	3528
Reflexões únicas	2562
$R_{\text{int}}$	0,0227

### Referência

#### Exemplo 22-3. Cristalografia de raios X de Cristal Único de S<sub>P</sub>-4 (Forma 2)

A Figura 12 representa uma Estrutura de Cristal de Raios X (ORTEP - anisotrópico) S<sub>P</sub>-4 (Forma 2). Uma estrutura de cristal do solvato cloreto de metileno de S<sub>P</sub>-4 (Forma 2), C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>PO<sub>9</sub>FCl<sub>2</sub>, produz um grupo de espaço monoclinico P2, (ausências sistemáticas 0k0: k=ímpar) com a=12,8822(14) Å, b=6,1690(7) Å, c=17,733(2) Å, β=92,045(3)°, V=1408,4(3) Å<sup>3</sup>, Z=2 e d<sub>calc</sub>=1,449 g/cm<sup>3</sup>. Os dados de intensidade de raios X foram colhidos num detetor de área Rigaku Mercury CCD que utiliza radiação de Mo-K $\alpha$  monocromada com grafite ( $\lambda$ =0,71073 Å) numa temperatura de 143K. A indexação preliminar foi realizada a partir de uma série de doze imagens de rotação de 0,5° com exposições de 30 segundos. Um total de 648 imagens de rotação foi colhido com uma distância do cristal em relação ao detetor de 35 mm, um ângulo de giro 2θ de -12°, larguras de rotação de 0,5° e exposições de 30 segundos: varrimento N° 1 foi um varrimento φ de 315° a 525° em ω = 10° e χ = 20°; varrimento N° 2 foi um varrimento ω de -20° a 5° em χ = -90° e φ = 315°; varrimento N° 3 foi um varrimento ω de -20° a 4° em χ = -90° e φ = 135°; varrimento N° 4 foi um varrimento ω de -20° a 5° em χ = -90° e φ = 225°;

varrimento N° 5 foi um varrimento ω de -20° a 20° em  $\chi = -90^\circ$  e  $\phi = 45^\circ$ . As imagens de rotação foram processadas usando CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), produzindo uma lista de valores que não se fizeram a média de  $F^2$  e  $\sigma(F^2)$  que foram então passados ao pacote de programa CrystalStructure (CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigalcu/MSC (2002)) para processamento posterior e solução de estrutura num computador Dell Pentium III. Um total de 7707 reflexões foi medido ao longo dos intervalos  $5,48 \leq 2\theta \leq 50,04^\circ$ ,  $-14 \leq h \leq 15$ ,  $-7 \leq k \leq 6$ ,  $-19 \leq l \leq 21$  produzindo 4253 reflexões únicas ( $R_{int} = 0,0180$ ). Os dados de intensidade foram corrigidos para Lorentz e efeitos de polarização e para absorção usando REQAB (transmissão mínima e máxima 0,824, 1,000).

A estrutura foi resolvida por meio dos métodos diretos (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). J. Appl. Cryst., 32, 115-119). O refinamento foi por meio de mínimos quadrados de matriz total com base em  $F^2$  usando SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst., A64, 112-122). Todas as reflexões foram usadas durante o refinamento. O esquema de ponderação usado foi  $w=1/[\sigma^2(F_s^2)+0,0472P^2+0,4960P]$  onde  $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ . Os átomos de não hidrogénio foram refinados anisotropicamente e os átomos de hidrogénio foram refinados usando um modelo de "equitação". O refinamento convergiu a  $R_1 = 0,0328$  e  $wR_2=0,0817$  para 4046 reflexões para as quais  $F > 4\sigma(F)$  e  $R_1=0,0348$ ,  $wR_2=0,0838$  e  $GOF = 1,056$  para todas as 4253 reflexões não zero únicas e 358 variáveis  $\sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_c|$ ;  $wR_2 = \{(\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2))^2\}^{1/2}$ ;  $GOF = \{(\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n-p))\}^{1/2}$ ; onde  $n =$  o número de reflexões e  $p =$  o número de parâmetros refinado). O  $\Delta/\sigma$  máximo no ciclo final de mínimos quadrados foi 0,000 e os dois picos mais proeminentes na diferença final de Fourier foram +0,312 e -

0,389 e/Å<sup>3</sup>. O parâmetro de estrutura absoluta de Flack refinado até -0,06(6) assim corroborando à estereoquímica do composto do título.

O Quadro 1 lista informação de célula, parâmetros de colheita de dados, e dados de refinamento. Parâmetros térmicos isotrópicos equivalentes e posicionais finais são dados no Quadro 2. Parâmetros térmicos anisotrópicos estão no Quadro 3. A representação ("ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations". C.K. Johnson (1976) ORNL-5138.) da molécula com probabilidade de 30 % de elipsóides térmicos mostrada.

**Quadro 9. Sumário de Determinação da Estrutura do Composto**

**S<sub>p</sub>-4CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.**

Fórmula:	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> PO <sub>9</sub> FCl <sub>2</sub>
Peso da fórmula:	614,38
Classe de cristal:	monoclínico
Grupo de espaço:	P2 <sub>1</sub> , (#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 <sup>3</sup>
μ	3,48 cm <sup>-1</sup>
tamanho de cristal, mm	0,42 x 0,12 x 0,10
D <sub>calc</sub>	1,449 g/cm <sup>3</sup>
F(000)	640
Radiação:	Mo-K <sub>α</sub> (λ=0,71073 Å)
intervalo 2θ	5,48 - 50,04 °
hkl colhido:	-14 ≤ h ≤ 15; -7 ≤ k ≤ 6; -19 ≤ l ≤ 21
Nº de reflexões medidas:	7707
Nº de reflexões únicas:	4253 (R <sub>int</sub> =0,0180)
Nº de reflexões observadas	4046 (F>4σ)

Nº de reflexões usadas no refinamento	4253
Nº de parâmetros	358
índices de R ( $F > 4\sigma$ )	$R_1 = 0,0328$
	$wR_2 = 0,0817$
índices de R (todos os dados)	$R_1 = 0,0348$
	$wR_2 = 0,0838$
GOF:	1,056
Picos de Diferença Final, e/Å <sup>3</sup>	+0,312, -0,389

### Referência

#### Exemplo 22-4. Cristalografia de raios X de Cristal Único de S<sub>P-4</sub> (Forma 3)

A Figura 13 mostra uma estrutura cristalina de raios X para a Forma 3 de S<sub>P-4</sub>. Neste documento, esta figura mostra uma vista de moléculas da Forma 3 da estrutura de cristal que mostra o esquema de numeração utilizado. Os elipsóides de deslocamento atómico anisotrópico para os átomos de não hidrogénio são mostrados no nível de probabilidade de 50 %. Os átomos de hidrogénio são mostrados com um raio arbitrariamente pequeno.

A solução de estrutura foi obtida por meio dos métodos diretos, refinamento de mínimos quadrados de matriz total em  $F^2$  com ponderação  $w^1 = \sigma^2(F_o^2) + (0,0512P)^2 + (0,6810P)$ , onde  $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ , parâmetros de deslocamento anisotrópico, correção de absorção empírica usando harmónica esférica, implementada em algoritmo de escalamento SCALE3 ABSPACK.  $wR^2 = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum [w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,0796$  final para todos os dados,  $R_1 = 0,0294$  convencional em valores de F de 2486 reflexões com  $F_o > 4\sigma(F_o)$ ,  $S = 1,068$  para todos os dados e 377 parâmetros.  $\Delta/\sigma(\text{máx})$  final 0,001,  $\Delta/\sigma(\text{média})$ , 0,000. Mapa de diferença final entre +0,211 e -0,334 e Å<sup>-3</sup>.

**Quadro 10. Parâmetros de Cristal Único da Forma 3**

Fórmula molecular	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>1</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> P <sub>1</sub>				
Peso molecular	648,82				
Sistema de cristal	Monoclínico				
Grupo de espaço	<i>P</i> 21	<i>a</i>	12,9257 (4) Å,	$\alpha$	90°,
		<i>b</i>	6,18080 (10) Å,	$\beta$	96,399 (2) °,
		<i>c</i>	18,0134 (4) Å,	$\gamma$	90°
V	1430,15 (6) Å <sup>3</sup>				
Z	2				
<i>D<sub>c</sub></i>	1,507 g.cm <sup>-1</sup>				
$\mu$	3,977 mm <sup>-1</sup>				
Fonte, $\lambda$	Cu K $\alpha$ , 1,54178Å				
<i>F</i> (000)	672				
<i>T</i>	100(1) K				
Cristal	Agulha incolor, 0,22 x 0,03 x 0,02 mm				
Dados truncados para	0,80 Å				
$\Theta_{\text{máx}}$	74,41°				
Plenitude	69,1 %				
Reflexões	3062				
Reflexões únicas	2607				
<i>R</i> <sub>int</sub>	0,0198				

**Referência****Exemplo 23. Estabilidade a temperaturas elevadas e humidade relativa**

Uma amostra de R<sub>p</sub>-4 foi armazenada numa câmara de humidade a 40 °C e 75 % de humidade relativa durante uma semana, e a amostra foi reanalisada por meio de XRPD. O padrão de pó obtido para R<sub>p</sub>-4 não mostrou nenhuma alteração substancial durante o curso da experiência, o que significa

que nenhuma alteração na forma sólida foi observada. Isto deveria ser contrastado com uma amostra de 4, que deliquesceu dentro de cerca de 16 horas após armazenamento a 40 °C e 75 % de humidade relativa. De facto, uma ilustração da natureza deliquescente de 4 é ilustrada por meio do seguinte. Uma amostra de 4 foi passada através de um crivo de 250 µm, em seguida, as amostras foram armazenadas a 40 °C / 75 % de HR e 25 °C / 53 % de humidade relativa e observações visuais foram tomadas em intervalos regulares. Os resultados são dados no Quadro 4.

**Quadro 11. Estabilidade de 4 a humidade relativa elevada.**

Condições	$t = 1,5 \text{ h}$	$t = 4,5 \text{ h}$	$t = 6,5 \text{ h}$	$t = 8,5 \text{ h}$	$t = 73 \text{ h}$
40 °C / 75 % de HR	Deliqescênci-	-	-	-	
25 °C / 53 % de HR	Nenhuma deliquescênci-	Sólido pegajoso	Deliqescênci-	Deliqescênci-	
		parcial	quase completa		

Após armazenamento a 40 °C e 75 % de humidade relativa uma amostra de S<sub>P</sub>-4 deliquesceu dentro de 16 horas. Por exemplo, uma amostra de S<sub>P</sub>-4 foi moída com um pilão e almofariz, e, em seguida, sucessivamente passada através de crivos de 500 e 250 µm para produzir a amostra como um pó fino. As amostras deste material foram armazenadas a 40 °C e 75 % de humidade relativa e 25 °C e 53 % de HR e observações visuais foram tomadas em intervalos regulares. Os resultados são dados no Quadro 5.

**Quadro 12. Estabilidade de S<sub>P</sub>-4 a humidade relativa elevada.**

Condições	$t = 1,5 \text{ h}$	$t = 4,5 \text{ h}$	$t = 104 \text{ h}$
40 °C / 75 % de HR	Nenhuma deliquescênci-	Deliqescênci-	
25 °C / 53 % de HR	Nenhuma deliquescênci-	Nenhuma deliquescênci-	Nenhuma deliquescênci-

A análise de XRPD da amostra após armazenamento a 25 °C e 53 % de HR durante 104 horas não mostrou nenhuma alteração significativa nos difratogramas produzidos indicando que nenhuma alteração de forma tinha ocorrido.

### **Referência**

#### **Exemplo 24. Transformada de Fourier - Espetrometria de Infravermelho (FT-IR)**

Os dados foram colhidos num Perkin-Elmer Spectrum One equipado com um acessório de amostras de Refletância Total Atenuada (RTA) universal. Os dados foram colhidos e analisados usando o software Spectrum v5.0.1.

O espetro IR obtido para 4, RP-4, e SP-4 são mostrados nas Figs. 5-7, respectivamente. Os picos selecionados, em números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) são indicados a seguir:

- 4: ~1680, ~1454, ~1376, ~1205, ~1092, ~1023 (Fig. 14);
- RP-4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (Fig. 15); e
- SP-4 (Forma 1): ~1743, ~1713, ~1688, ~1454, ~1378, ~1208, ~1082 (Fig. 16).

#### **Exemplo 25. Calorimetria de varrimento diferencial (DSC)**

##### **Análise Termogravimétrica (TGA)**

Os dados de DSC foram colhidos num TA Instruments Q2000 equipado com um auto-amostrador de 50 posições. A calibração para capacidade térmica foi levada a cabo usando safira e a calibração para energia e temperatura foi levada a cabo usando índio certificado.

A DSC de temperatura modulada foi levada a cabo tipicamente 0,8-1,2 mg de cada amostra, num recipiente de alumínio com pequenos orifícios, usando uma taxa de aquecimento subjacente de 2 °C.min<sup>-1</sup> e parâmetros de modulação de temperatura de ± 0,2 °C.min<sup>-1</sup> e 40 segundos. Uma purga de azoto seco a 50 ml.min<sup>-1</sup> foi mantida na amostra.

O software de controlo do instrumento foi Advantage for Q Series v2.8.0.392 e Thermal Advantage v4.8.3 e os

dados foram analisados usando Universal Analysis v4.3A.

Os dados de DSC foram colhidos num Mettler DSC 823e equipado com um auto-amostrador de 34 posições. O instrumento foi calibrado para energia e temperatura usando índio certificado. Tipicamente 0,8-1,2 mg de cada amostra, num recipiente de alumínio com pequenos orifícios, foi aquecido a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  de 25  $^{\circ}\text{C}$  a 250  $^{\circ}\text{C}$ . Uma purga de azoto a  $50\text{ ml}.\text{min}^{-1}$  foi mantida na amostra. O software de análise de dados e controlo do instrumento foi STARe v9.20.

Os dados de TGA foram colhidos num Mettler TGA/SDTA 851e equipado com um auto-amostrador de 34 posições. O instrumento teve a temperatura calibrada usando índio certificado. Tipicamente 8-12 mg de cada amostra foram carregados num cadiño de alumínio pré-pesado e foi aquecido a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  de temperatura ambiente a 350  $^{\circ}\text{C}$ . Uma purga de azoto a  $50\text{ ml}.\text{min}^{-1}$  foi mantida na amostra. O software de análise de dados e controlo do instrumento foi STARe v9.20.

A análise de DSC de 4 mostrou uma endoterma ampla única com um início de 58,7  $^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H\ 14\ \text{J}.\text{g}^{-1}$ ) confirmada como sendo devido a relaxamento molecular durante a transição de vidro por meio de análise de DSC modulada posterior (Fig. 17). A análise de TGA de 4 não mostrou nenhuma perda de peso antes da decomposição acima de 240  $^{\circ}\text{C}$ , confirmando que o material era não solvatado. Como a análise de XRPD de 4 confirmou o material como sendo amorfo, a análise de DSC modulada foi tomada numa tentativa de calcular a temperatura de transição de vidro, que foi encontrada como sendo 57  $^{\circ}\text{C}$ .

A análise de DSC mostrou uma endoterma aguda única com um início de 136,2  $^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H\ 76\ \text{J}.\text{g}^{-1}$ ) confirmada como sendo um material fundido por meio de microscopia de estágio quente. Veja-se a Fig. 18. A análise de TGA de R<sub>P</sub>-4 não mostrou nenhuma perda de peso antes da decomposição acima de 240  $^{\circ}\text{C}$ , confirmando que o material era não solvatado.

A análise de DSC de S<sub>P</sub>-4 mostrou uma endoterma ampla única com um início de 93,9 °C (AH 43 J.g<sup>-1</sup>) confirmou um material fundido por meio de microscopia de estágio quente. Veja-se a Fig. 19. A análise de TGA de S<sub>P</sub>-4 não mostrou nenhuma perda de peso antes da decomposição acima de 240 °C, confirmando que o material era não solvatado.

### **Referência**

#### **Exemplo 26. Sorção Gravimétrica de Vapor (GVS)**

##### *SMS GVS Intrínseca*

Isotermas de sorção foram obtidas usando um analisador sorção de humidade SMS DVS Intrínseca, controlado por software de Suíte de Análise de SMS. A temperatura da amostra foi mantida a 25 °C pelos controlos do instrumento. A humidade foi controlada por correntes de mistura de azoto seco e húmido, com uma taxa de fluxo total de 200 ml.min<sup>-1</sup>. A humidade relativa foi medida por uma sonda Rotrónica calibrada (intervalo dinâmico de 1,0-100 % de HR), localizada próxima à amostra. A alteração de peso, (relaxamento de massa) da amostra como uma função de % de HR foi constantemente monitorizada por meio da microbalança (precisão ±0,005 mg).

Tipicamente 5-20 mg de amostra foram colocados numa cesta de malha de aço inoxidável tarada sob condições ambientais. A amostra foi carregada e descarregada a 40 % de HR e 25 °C (condições ambientes típicas). Uma isoterma de sorção de humidade foi realizada como delineado a seguir (2 varrimentos dando 1 ciclo completo). A isoterma padrão foi realizada a 25 °C a 10 % de intervalos de HR ao longo de um intervalo de 0,5-90 % de HR.

**Quadro 13. Parâmetros de Método para Experiências de SMS DVS Intrínseca**

Parâmetros	Valores
Adsorção - Varrimento 1	40 - 90
Dessorção / Adsorção - Varrimento 2	40 - 90
Intervalos (% de HR)	10

Número de Varrimentos	2
Taxa de fluxo (ml.min <sup>-1</sup> )	200
Temperatura (°C)	25
Estabilidade (°C.mn <sup>-1</sup> )	0,2
Tempo de Sorção (horas)	limite de tempo de 6 horas

A amostra foi recuperada após conclusão da isoterma e reanalisada por meio de XRPD.

A análise de GVS mostrou R<sub>P-4</sub> como sendo não higroscópico que exibe absorção reversível de aproximadamente 0,2 % em peso de água de 0 a 90 % de humidade relativa. A reanálise da amostra por meio de XRPD após a experiência de GVS não mostrou nenhuma alteração em forma.

Uma amostra de S<sub>P-4</sub> foi moída com um pilão e almofariz, e, em seguida, sucessivamente passada através de crivos de 500 e 250 µm para produzir a amostra como um pó fino que foi então analisado usando um método de ciclo único modificado. A amostra foi tomada de 40 % de HR (aproximadamente ambiente) a 60 % de HR, em vez de 90 % para o método padrão, e, em seguida, submetida a ciclo de 0 % e de volta a 40 % de HR. Esta análise mostrou S<sub>P-4</sub> como sendo não higroscópico a 60 % de HR, com absorção reversível de ~0,2 % em peso de água de 0 a 60 % de HR.

### **Referência**

#### **Exemplo 27. Solubilidade Aquosa Termodinâmica**

A solubilidade aquosa foi determinada por meio de suspensão de uma quantidade suficiente de composto em água para dar uma concentração final máxima de  $\geq 10 \text{ mg.ml}^{-1}$  da forma livre parental do composto. A suspensão foi equilibrada a 25 °C durante 24 horas então o pH foi medido. A suspensão foi então filtrada através de um filtro de fibra de vidro C numa placa de 96 poços. O filtrado foi então diluído por um fator de 101. A quantização foi por

meio de HPLC com referência a uma solução padrão de aproximadamente 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> em DMSO. Volumes diferentes do padrão, soluções de amostra diluídas e não diluídas foram injetadas. A solubilidade foi calculada usando as áreas de pico determinadas por integração do pico encontrado no mesmo tempo de retenção que o pico principal na injeção padrão.

**Quadro 14. Parâmetros de Método de HPLC para Medição de Solubilidade**

Tipo de método:	Fase reversa com eluição em gradiente		
Coluna:	Fenomenex Luna, C18 (2) 5 µm 50 x 4,6 mm		
Temperatura da Coluna (°C):	25		
Injeções Padrão (µl):	1,2, 3, 5, 7, 10		
Injeções de Teste (µl):	1,2, 3, 10, 20, 50		
Deteção:	260, 80		
Comprimento de onda, Largura de banda (nm) :			
Taxa de fluxo (ml.min <sup>-1</sup> ):			
Fase A:	0,1 % de TFA em água		
Fase B:	0,085 % de TFA em acetonitrilo		
Horário:	Tempo (min)	% Fase A	% Fase B
	0,0	95	5
	1,0	80	20
	2,3	5	95
	3,3	5	95
	3,5	95	5
	4,4	95	5

A análise foi realizada sob as condições indicadas acima num sistema Agilent HP1100 series equipado com um detetor de arranjo de diodos e usando software ChemStation vB.02.01-SR1.

**Quadro 15. Resultado de solubilidade aquosa para R<sub>P</sub>-4, 4, e S<sub>P</sub>-4.**

ID	depH	Mistura	Solubilidade / mg.ml <sup>-1</sup>	Comentários
<b>Amostra não filtrada</b>				
R <sub>P</sub> -4	7,12		1,58	Suspensão
4	7,03		6,11	Sólido residual
S <sub>P</sub> -4	6,88		5,65	Sólido residual

### Referência

**Exemplo 28. Determinação de Pureza Química por meio de HPLC**

Várias condições de HPLC podem ser usadas para determinar a pureza química dos compostos revelados no presente documento. Um tal exemplo é revelado acima em relação aos estudos de solubilidade aquosa termodinâmica. Outro exemplo é revelado a seguir.

**Condições de HPLC**

**LC:** Módulo de Separações Waters Alliance 2695, Detetor de PDA Waters 2996 e Software Waters Empower 2 (Versão 6.00)

**Coluna:** Fenomenex Luna C18(2); 4,6 x 50 mm; 3 µm

**Taxa de** 1,2 ml/min

**fluxo:**

**Volume de**

**Injeção:** 10 µl

**Fase**

**móvel:**

**Acetato de** Solvente A: 95 % de água com 5 % de metanol e 10 mM pH~5,3

**Amónio;** Solvente B: MeOH com 10 mM de Acetato de Amónio

**Gradiente:** manter a 0 % de B 3 min

0-47 % de B 3-4 min

manter a 47 % de B 4-10 min

47 %-74 % de B 10-11 min

manter a 74 % de B	11-13,5 min
retornar a 0 % de B	13,5-13,6 min
manter a 0 % de B	13,6-15,5 min

Sob estas condições, a pureza de **4**, **R<sub>P</sub>-4**, e **S<sub>P</sub>-4** foi determinada como sendo ~99,6, ~99 %, e ~99,5 %, respectivamente. É indicado que purezas maiores podem ser conseguidas por meio da otimização dos métodos revelados acima.

A inspeção dos Difratogramas de XRPD mostra que os dois diastereoisómeros de cristal único deram claramente padrões de XRPD diferentes. Adicionalmente, havia uma diferença clara no ponto de fusão dos dois diastereoisómeros cristalinos, com R<sub>P</sub>-4 que tem um início consideravelmente mais alto que S<sub>P</sub>-4 (136 °C vs. 94 °C).

#### Referência

#### Exemplo 29. Métodos de Separação Adicionais

A seguinte separação de SFC (condições listadas a seguir) produziu uma separação adequada de uma mistura dos diastereómeros, **R<sub>P</sub>-4** e **S<sub>P</sub>-4**.

Método Preparativo:	Método Analítico:
Chiralpak AS-H (2 x 25 cm) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25 x 0,46 cm)
20 % de metanol/CO <sub>2</sub> (100 bar)	20 % de metanol/CO <sub>2</sub> (100 bar)
50 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
Conc.: 260 mg/30ml metanol, vol. de inj: 1,5 ml	

A seguinte separação de SFC (condições listadas a seguir) produziu uma separação adequada de uma mistura dos diastereómeros, **R<sub>P</sub>-4** e **S<sub>P</sub>-4**.

Método Preparativo:	Método Analítico:
Chiralpak IA(2 x 15 cm) 802091	Chiralpak IA(15 x 0,46 cm)

30 % de isopropanol (0,1 % DEA) /CO <sub>2</sub> , 100 bar	40 % de metanol (DEA) /CO <sub>2</sub> , 100 bar
60 ml/min, 220 nm.	3 ml/min, 220 nm.
vol. de inj: 2 ml, 20 mg/ml metanol	

**Quadro 16. Sumário dos resultados da caracterização de lote de R<sub>P</sub>-4, 4, e S<sub>P</sub>-4.**

Análise	R <sub>P</sub> -4	4	S <sub>P</sub> -4
RMN	de Diastereoisómero	mistura 1:1	de Diastereoisómero
Protão	único	diastereoisómeros único	
XRPD	Cristalino diferente de S <sub>P</sub> - 4	-Amorfo	Cristalino diferente de R <sub>P</sub> - 4
DSC	Endoterma; fusão-136	Endoterma; 59 °C	Endoterma; fusão - 94 °C
TGA	Nenhuma perda de peso, decomposição >240 °C	Nenhuma perda de peso, decomposição >240 °C	Nenhuma perda de peso, decomposição >240 °C
IR	Veja-se acima	Veja-se acima	Veja-se acima
Solubilidade	1,58 Aq (mg.m) <sup>-1</sup>	6,11	5,65
Pureza	de 96,9 %	99,6 %	99,5 %
HPLC			
40 °C / 75 % de HR	Nenhuma alteração de forma	Deliquescência dentro de 1,5 h	Deliquescência dentro de 4,5 h
25 °C / 53 % - de HR	-		Nenhuma alteração de forma
GVS	Não higroscópico até 90 % de HR	-	Não higroscópico até 60 % de HR

### Referência

#### **Exemplo 30. Cristalografia de Raios X de 8 (S<sub>P</sub>-isómero)**

O composto 8 (S<sub>P</sub>-isómero), C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>PO<sub>7</sub>, cristaliza no grupo de espaço monoclinico P2, (ausências sistemáticas 0k0: k=ímpar) com a=5,3312(4) Å, b=15,3388(8) Å,

$c=23,7807(13)\text{\AA}$ ,  $\beta=92,891(3)^\circ$ ,  $V=1942,2(2)\text{\AA}^3$ ,  $Z=4$ , e  $d_{\text{calc}}=1,397 \text{ g/cm}^3$ . Os dados de intensidade de raios X foram colhidos num detetor de área de CCD Bruker APEXII que utiliza radiação de Mo-K $\alpha$  monocromada com grafite ( $\lambda=0,71073 \text{ \AA}$ ) numa temperatura de 100(1)K. As Figuras 20A e 20B mostram moléculas numeradas 1 e 2, respetivamente, da unidade assimétrica.

A indexação preliminar foi realizada a partir de uma série de trinta e seis quadros de rotação de  $0,5^\circ$  com exposições de 30 segundos. Um total de 3608 quadros foi colhido com uma distância do cristal em relação ao detetor de 70,00 mm, larguras de rotação de  $0,5^\circ$  e exposições de 20 segundos:

tipo de varrimento	$2\theta$	$\omega$	$\varphi$	$\chi$	quadros
$\phi$	-35,50	279,40	27,32	48,96	725
$\phi$	24,50	22,31	35,56	69,08	692
$\phi$	-13,00	321,68	247,79	69,08	95
$\phi$	34,50	204,08	28,21	-92,80	293
$\phi$	-30,50	310,60	214,10	54,21	361
$\phi$	32,00	304,67	24,47	50,72	722
$\phi$	-35,50	122,14	316,59	-78,84	720

Os quadros de rotação foram integrados usando SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) produzindo uma lista de valores de  $F^2$  e  $\sigma(F^2)$  que não se fizeram a média que foram então passados ao pacote de programa SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) para processamento posterior e solução de estrutura num computador Dell Pentium 4. Um total de 6909 reflexões foi medido ao longo dos intervalos  $1,58 \leq \theta \leq 25,09^\circ$ ,  $-6 \leq h \leq 6$ ,  $-18 \leq k \leq 18$ ,  $-28 \leq l \leq 28$  produzindo 6909 reflexões únicas ( $R_{\text{int}} = 0,0581$ ). Os dados de intensidade foram corrigidos para Lorentz e efeitos de polarização e para absorção usando SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Alemanha.)

(transmissão mínima e máxima 0,6093, 0,7452).

A estrutura foi resolvida por meio dos métodos diretos (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64, 112-122.)). O refinamento foi por meio de mínimos quadrados de matriz total com base em  $F^2$  usando SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) Acta Cryst. A64, 112-122.). Todas as reflexões foram usadas durante o refinamento. O esquema de ponderação usado foi  $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0000P)^2 + 14,0738P]$  onde  $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ . Os átomos de não hidrogénio foram refinados anisotropicamente e os átomos de hidrogénio foram refinados usando um modelo de equitação. O refinamento convergiu a  $R_1 = 0,0847$  e  $wR_2 = 0,1899$  durante 6173 reflexões observadas para as quais  $F > 4\sigma(F)$  e  $R_1=0,0963$  e  $wR_2=0,1963$  e  $GOF = 1,119$  para todas as 6909 reflexões não zero únicas e 512 variáveis ( $R_1 = \sum ||F_o|| - |F_c|| / \sum |F_o|$ ;  $wR_2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$ ;  $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2}$ ; onde  $n =$  o número de reflexões e  $p =$  o número de parâmetros refinados). O  $\Delta/\sigma$  máximo no ciclo final de mínimos quadrados foi 0,000 e os dois picos mais proeminentes na diferença final de Fourier foram +0,402 e -0,559 e/Å<sup>3</sup>.

**Quadro 17. Sumário de Determinação da Estrutura do Composto 8 (S<sub>p</sub>-isómero)**

Empirical fórmula	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> PO <sub>7</sub>
Peso da fórmula	408,34 .
Temperatura	100(1) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	monoclínico
Grupo de espaço	P21
Constantes de célula:	
a	5,3312(4) Å
b	15,3388(8) Å
c	23,7807(13) Å
β	92,891(3) °
Volume	1942,2(2) Å <sup>3</sup>
Z	4

Densidade (calculado)	1,397 Mg/m <sup>3</sup>
Coeficiente de absorção	0,185 mm <sup>-1</sup>
F(000)	856
Tamanho de cristal	0,40 x 0,10 x 0,08 mm <sup>3</sup>
Intervalo de teta para a colheita de dados	1,58 a 25,09°
Intervalos de índices	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
Reflexões colhidas	6909
Reflexões independentes	6909 [R(int) = 0,0581]
Plenitude a teta =25,09°	99,6 %
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes
Transmissão máx. e min.	0,7452 e 0,6093
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz total em F <sup>2</sup>
Dados / restrições parâmetros	6909 / 1 / 512
Excelência-de-ajuste em F <sup>2</sup>	1,119
Final índices de R finais [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0847, wR2 = 0,1899
índices de R (todos os dados)	R1 = 0,0963, wR2 = 0,1963
Parâmetro de estrutura absoluta	0,1(2)
Pico e orifício de maior dif.	0,402 e -0,559 e.Å <sup>-3</sup>

### Exemplo de Referência 31. Atividade Biológica

As células que contêm replicão foram semeadas em 3.000 células/poço (50 ml) em placas brancas/opacas de 96 poços, ou 1.500 células/poço (25 ml) em placas brancas/opacas de 384 poços. 50 µl de 2X composto foram adicionados na placa

de 96 poços ou 25 µl de 2X composto foram adicionados na placa de 384 poços. As placas foram incubadas a 37 °C numa atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5 % humidificada durante 4 dias. Após incubação, reagente Bright-Glo (50 µl para a placa de 96 poços, ou 25 µl para a placa de 384 poços) foi adicionado para medir o repórter de luciferase de pirilampo para replicação de VHC. A percentagem de inibição foi calculada contra o controlo não fármaco.

Composto Atividade de Replicação de VHC (µM)	
<b>4</b>	0,58
<i>R<sub>P</sub>-4</i>	2,87
<i>S<sub>P</sub>-4</i>	0,13

O R<sub>P</sub>-4 e S<sub>P</sub>-4 demonstraram ter ampla cobertura de genótipo. Por exemplo, ambos mostraram ser ativos contra o vírus da hepatite C, genótipos 1-4.

#### **DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

##### **Documentos de patente referidos na descrição**

- WO 9712033 A, Hagedorn [0010]
- US 20060241064 A [0015] [0108]
- WO 2007095269 A [0015] [0108]
- US 053015 A [0016]
- WO 2008121634 A [0016]
- US 20100016251 A [0016] [0108]
- EP 0524579 A [0094]
- US 20020142050 A [0094]
- US 20040224917 A [0094]
- US 20050048116 A [0094]
- US 20050058710 A [0094]
- US 20060034937 A [0094]
- US 20060057196 A [0094]
- US 20060188570 A [0094]
- US 20070026073 A [0094]
- US 20070059360 A [0094]
- US 20070077295 A [0094]
- US 20070099902 A [0094]
- US 20080014228 A [0094]
- US 6267985 B [0094]
- US 6294192 B [0094]
- US 6383471 B [0094]
- US 6395300 B [0094]
- US 6569463 B [0094]
- US 6635278 B [0094]
- US 6645528 B [0094]

- US 6923988 B [0094]
- US 6932983 B [0094]
- US 7060294 B [0094]
- US 7462608 B [0094]
- US 3994974 A [0095]
- US 5695784 A [0095]
- US 6977257 B [0095]
- US 4797285 A [0099]
- US 5013556 A [0099]
- US 5077056 A [0099]
- US 5077057 A [0099]
- US 5154930 A [0099]
- US 5192549 A [0099]
- US 5213804 A [0099]
- US 5225212 A [0099]
- US 5277914 A [0099]
- US 5316771 A [0099]
- US 5376380 A [0099]
- US 5549910 A [0099]
- US 5567434 A [0099]
- US 5736155 A [0099]
- US 5827533 A [0099]
- US 5882679 A [0099]
- US 5891468 A [0099]
- US 6060080 A [0099]
- US 6132763 A [0099]
- US 6143321 A [0099]
- US 6180134 B [0099]
- US 6200598 B [0099]
- US 6214375 B [0099]
- US 6224903 B [0099]
- US 6296870 B [0099]
- US 6653455 B [0099]
- US 6680068 B [0099]
- US 6726925 B [0099]

- US 7060689 B [0099]
- US 7070801 B [0099]
- US 5145684 A [0099]
- US 5091188 A [0099]
- EP 1881001 A [0108]
- US 2003187018 A [0108]
- US 2005267018 A [0108]
- WO 2003006490 A [0108]
- WO 200364456 A [0108]
- WO 2004094452 A [0108]
- WO 2005028502 A [0108]
- WO 2005037214 A [0108]
- WO 2005095403 A [0108]
- WO 2007014920 A [0108]
- WO 2007014921 A [0108]
- WO 2007014922 A [0108]
- WO 2007014925 A [0108]
- WO 2007014926 A [0108]
- WO 2007015824 A [0108]
- WO 2008010921 A [0108]
- US 2004229840 A [0108]
- US 2005154056 A [0108]
- US 200598125 B [0108]
- US 20060194749 A [0108]
- US 20060293306 A [0108]
- US 2006040890 A [0108]
- US 2006040927 A [0108]
- US 2006166964 A [0108]
- US 2007275947 A [0108]
- US 6784166 B [0108]
- US 20072759300 A [0108]
- WO 2002057287 A [0108]
- WO 2002057425 A [0108]
- WO 2003010141 A [0108]
- WO 2003037895 A [0108]

- WO 2003105770 A [0108]
- WO 2004000858 A [0108]
- WO 2004002940 A [0108]
- WO 2004002944 A [0108]
- WO 2004002977 A [0108]
- WO 2004003138 A [0108]
- WO 2004041201 A [0108]
- WO 2004065367 A [0108]
- WO 2004096210 A [0108]
- WO 2005021568 A [0108]
- WO 2005103045 A [0108]
- WO 2005123087 A [0108]
- WO 2006012078 A [0108]
- WO 2006020082 A [0108]
- WO 2006065335 A [0108]
- WO 2006065590 A [0108]
- WO 2006093801 A [0108]
- WO 200702602 A [0108]
- WO 2007039142 A [0108]
- WO 2007039145 A [0108]
- WO 2007076034 A [0108]
- WO 2007088148 A [0108]
- WO 2007092000 A [0108]
- WO 2005067900 A [0108]
- WO 2007070556 A [0108]
- US 2006276511 A [0108]
- WO 2006035061 A [0108]
- WO 2006100310 A [0108]
- WO 2006120251 A [0108]
- WO 2006120252 A [0108]
- WO 2007093901 A [0108]
- WO 2000006529 A [0108]
- WO 2003101993 A [0108]
- WO 2004009020 A [0108]
- WO 2004014313 A [0108]

- WO 2004014852 A [0108]
- WO 2004035571 A [0108]
- US 05301508 A [0108]
- WO 2006031725 A [0145] [0146]
- US 20060122146 A [0145]
- WO 2008045419 A [0146]
- US 5233031 A [0151]

**Literatura não relacionada com patentes referida na descrição**

- **K. ISHI et al.** *Heptology*, 1999, vol. 29, 1227-1235 [0003]
- **V. LOHMANN et al.** *Virology*, 1998, vol. 249, 108-118 [0003]
- **CALISHER et al.** *J. Gen. Virol*, 1993, vol. 70, 37-43 [0005]
- Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, 931-959 [0005]
- **HALSTEAD, S. B.** *Rev. Infect. Dis.*, 1984, vol. 6, 251-264 [0005]
- **HALSTEAD, S. B.** *Science*, 1988, vol. 239, 476-481 [0005]
- **MONATH, T. P.** *New Eng. J. Med*, 1988, vol. 319 (64), 1-643 [0005]
- **MOENNIG, V. et al.** *Adv. Vir. Res.*, 1992, vol. 41, 53-98 [0006]
- **MEYERS, G. ; THIEL, H.J.** *Advances in Virus Research*, 1996, vol. 47, 53-118 [0006]
- **MOENNIG V. et al.** *Adv. Vir. Res.*, 1992, vol. 41, 53-98 [0006]
- **GORBALENYA et al.** *Nature*, 1988, vol. 333, 22 [0009]
- **BAZAN ; FLETTERICK.** *Virology*, 1989, vol. 171, 637-639 [0009]
- **GORBALENYA et al.** *Nucleic Acid Res.*, 1989, vol. 17,

- 3889-3897 [0009]
- **KOONIN, E.V. ; DOLJA, V.V.** *Crir. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 1993, vol. 28, 375-430 [0009]
  - **WISKERCHEN ; COLLETT.** *Virology*, 1991, vol. 184, 341-350 [0010]
  - **BARTENSCHLAGER et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 3835-3844 [0010]
  - **ECKART et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1993, vol. 192, 399-406 [0010]
  - **GRAKOUI et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 2832-2843 [0010]
  - **GRAKOUI et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 10583-10587 [0010]
  - **HIJIKATA et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 4665-4675 [0010]
  - **TOME et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 4017-4026 [0010]
  - **BARTENSCHLAGER et al.** *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 5045-5055 [0010]
  - **FAILLA et al.** *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 3753-3760 [0010]
  - **XU et al.** *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 53 12-5322 [0010]
  - **KIM et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, vol. 215, 160-166 [0010]
  - **JIN; PETERSON.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, vol. 323, 47-53 [0010]
  - **WARRENER ; COLLETT.** *J. Virol.*, 1995, vol. 69, 1720-1726 [0010]
  - **BEHRENS et al.** *EMBO*, 1996, vol. 15, 12-22 [0010]
  - **LECHMANN et al.** *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 8416-8428 [0010]
  - **YUAN et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1997, vol. 232, 231-235 [0010]
  - **ZHONG et al.** *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 9365-9369

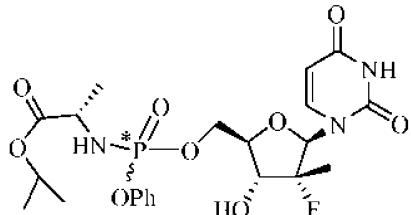
[0010]

- **TAN, S.-L. et al.** *Nature Rev. Drug Discov.*, 2002, vol. 1, 867-881 [0013]
- **WALKER, M.P. et al.** *Exp. Opin. Investigational Drugs*, 2003, vol. 12, 1269-1280 [0013]
- **NI, Z-J. et al.** *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2004, vol. 7, 446-459 [0013]
- **BEAULIEU, P. L. et al.** *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2004, vol. 5, 838-850 [0013]
- **WU, J. et al.** *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2003, vol. 3, 207-219 [0013]
- **GRIFFITH, R.C. et al.** *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 2004, vol. 39, 223-237 [0013]
- **CARROL, S. et al.** *Infectious Disorders-Drug Targets*, 2006, vol. 6, 17-29 [0013]
- **MCGUIGAN, C. et al.** *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 1748-1753 [0015]
- **VALETTE, G. et al.** *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 1981-1990 [0015]
- **BALZARINI, J. et al.** *Proc. National Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 7295-7299 [0015]
- **SIDDIQUI, A. Q. et al.** *J. Med. Chem.*, 1999, vol. 42, 4122-4128 [0015]
- **EISENBERG, E. J. et al.** *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, vol. 20, 1091-1098 [0015]
- **LEE, W.A. et al.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, vol. 49, 1898 [0015]
- Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 1999 [0039]
- **JERRY MARCH.** Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure. John Wiley and Sons Ed, 1992, 351-357 [0042]
- **T.W. GREENE ; P.G. M. WUTS.** Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 1999 [0051] [0052]

- **MCGUIGAN et al.**. *J. Med. Chem.*, 2005, vol. 48, 3504-3515 [0147]
- **MCGUIGAN et al.**. *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49, 7215 [0147]
- **LEHSTEN et al.**. *Org. Process Res. Dev.*, 2002, vol. 6, 819-822 [0147]
- **P.D. HOWES et al.**. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2003, vol. 22 (5-8), 687-689 [0180]
- **ALTO MARE, A. ; M. BURLA ; M. CAMALLI ; G. CASCARANO ; C. GIACOVAZZO ; A. GUAGLIARDI ; A. MOLITERNI ; G. POLIDORI ; R. SPAGNA.**. *J. Appl. Cryst.*, 1999, vol. 32, 115-119 [0257]
- **SHELDRICK, G.M.**. *Acta Cryst.*, 2008, vol. A64, 112-122 [0257] [0290]
- **C.K. JOHNSON.** *ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations*, 1976 [0258]
- **BRUKER.** SAINT. Bruker AXS Inc, 2009 [0289]
- **BRUKER.** SHELXTL. Bruker AXS Inc, 2009 [0289]
- **SHELDRICK, G.M.**. SADABS. University of Gottingen, 2007 [0289]

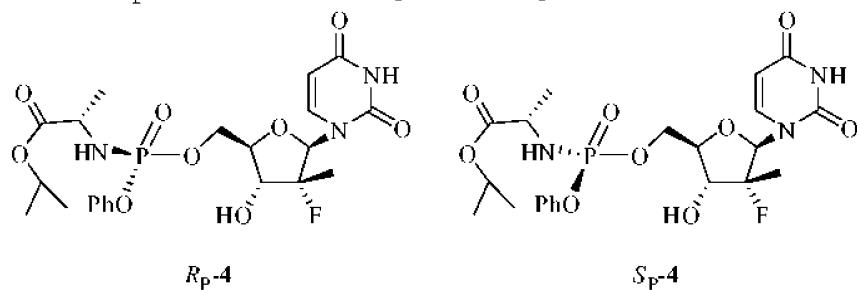
## REIVINDICAÇÕES

1. Um processo para preparar um composto representado pela fórmula 4, ou um diastereómero à base de fósforo do mesmo:



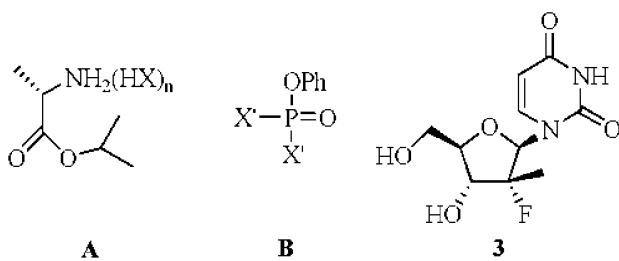
**4**

em que  $P^*$  representa um átomo de fósforo quiral,  
e em que o dito diastereómero à base de fósforo é  
representado pela fórmula  $R_P\text{-}4$  ou  $S_P\text{-}4$ :



que comprehende:

- a) fazer reagir um isopropil-alanato, **A**, um di- $X'$ -fenilfosfato, **B**, 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina, **3**, e uma base para obter uma primeira mistura que comprehende 4, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo;



em que  $X$  é uma base de conjugado de um ácido,  $n$  é 0 ou 1, e  $X'$  é um halogénio

- b) fazer reagir a primeira mistura com um composto de proteção para obter uma segunda mistura que

compreende **4**, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo, em que o composto de proteção é selecionado a partir de um composto de proteção de t-butildimetilsilílico e um composto de proteção de dimetoxitrifenilmétilo; e

c) submeter opcionalmente a segunda mistura a cristalização, cromatografia, ou extração com a finalidade de obter **4**, ou o diastereómero à base de fósforo do mesmo.

2. O processo de acordo com a reivindicação 1, em que X é cloreto e n é 1.

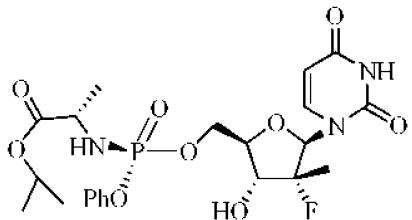
3. O processo de acordo com a reivindicação 2, em que A é anidro.

4. O processo de acordo com a reivindicação 1, em que a base é N-metilimidazol.

5. O processo de acordo com a reivindicação 1, em que a razão molar de A-a-B-a-3 é 1,6-a-1,3-a-1.

6. O processo de acordo com a reivindicação 1, em que o composto de proteção é cloreto de t-butildimetilsilílico.

7. O processo de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é R<sub>P</sub>-**4**:



R<sub>P</sub>-**4**

8. O processo de acordo com a reivindicação 7, em que X é cloreto e n é 1.

9. O processo de acordo com a reivindicação 7, em que A é anidro.

10. O processo de acordo com a reivindicação 7, em que a base é N-metilimidazol.

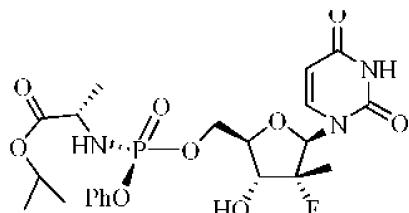
11. O processo de acordo com a reivindicação 7, em que a razão molar de A-a-B-a-3 é 1,6-a-1,3-a-1.

12. O processo de acordo com a reivindicação 7, em que o composto de proteção é cloreto de t-butildimetsilsílico.

13. O processo de acordo com a reivindicação 7, em que o R<sub>P</sub>-**4** é cristalino, que compreende ainda:

- d) dissolver ou suspender a segunda mistura ou o R<sub>P</sub>-**4** purificado num solvente;
- e) opcionalmente seguido de semeadura com R<sub>P</sub>-**4** cristalino; e
- f) adicionar antissolvente suficiente para obter R<sub>P</sub>-**4** cristalino.

14. O processo de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é S<sub>P</sub>-**4**:



S<sub>P</sub>-**4**

15. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que X é cloreto e n é 1.

16. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que A é anidro.

17. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que a base é N-metilimidazol.

18. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que a razão molar de A-a-B-a-3 é 1,6-a-1,3-a-1.

19. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que o composto de proteção é cloreto de t-butildimetsilsílico.

20. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que o S<sub>P</sub>-4 é cristalino, que compreende ainda:

- d) dissolver ou suspender a segunda mistura ou o S<sub>P</sub>-4 purificado num solvente seguido de semeadura com S<sub>P</sub>-4 cristalino à temperatura ambiente;
- e) colher um primeiro sólido, cuja maioria compreende S<sub>P</sub>-4;
- f) dissolver ou suspender o primeiro sólido num solvente na sua temperatura de refluxo; e
- g) arrefecer ou adicionar um antissolvente para obter um segundo sólido.

21. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que o S<sub>P</sub>-4 é cristalino, que compreende ainda:

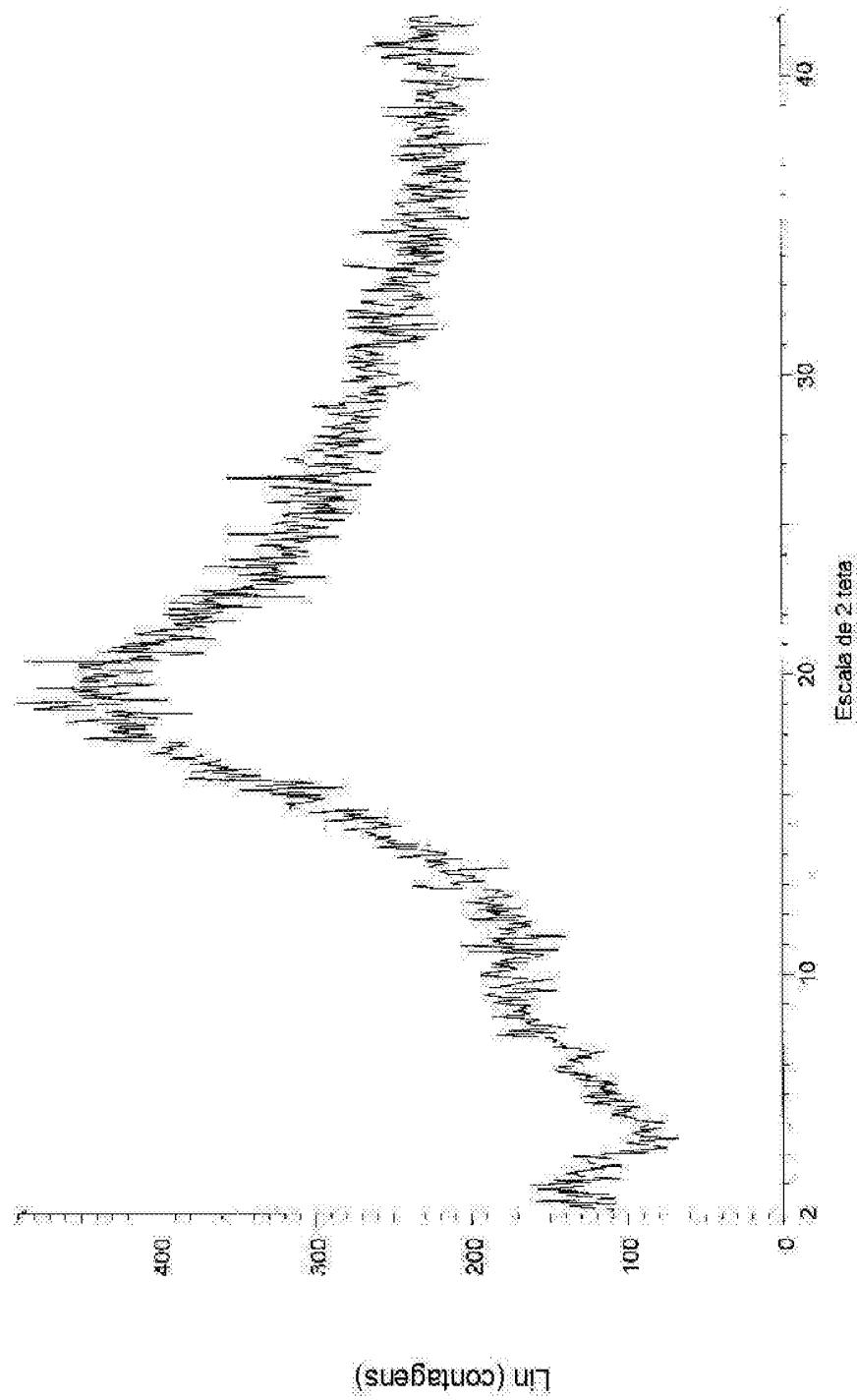
- d) dissolver ou suspender a segunda mistura ou o S<sub>P</sub>-4 purificado num primeiro solvente seguido de adição de um antissolvente de modo a obter uma primeira composição em que o solvente residual/antissolvente é removido por meio de decantação para obter um resíduo;
- e) tratar o resíduo com uma solução que contém o primeiro solvente e antissolvente para produzir uma segunda composição pelo qual após reduzir a pressão propicia um primeiro sólido;

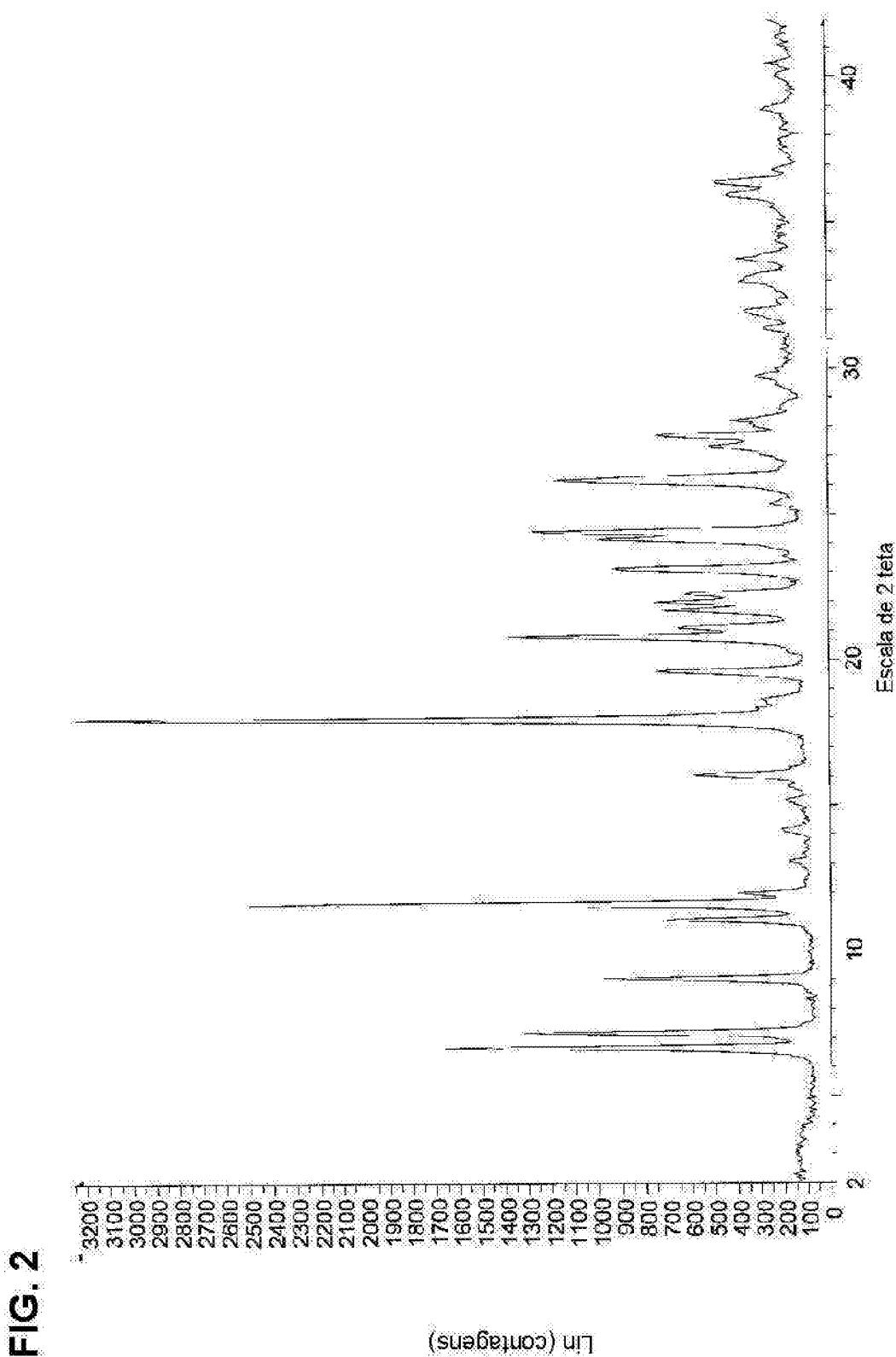
- f) dissolver ou suspender o primeiro sólido usando um segundo solvente de modo a obter uma terceira composição;
- g) adicionar cristais de semente de S<sub>P</sub>-4 à terceira composição;
- h) colher um segundo sólido;
- i) dissolver ou suspender o segundo sólido num terceiro solvente, opcionalmente aquecido até a temperatura de refluxo do terceiro solvente para obter uma quarta composição, e, se for necessário, e
- j) arrefecer a quarta composição para obter um terceiro sólido que compreende S<sub>P</sub>-4 que é colhido por meio de filtração.

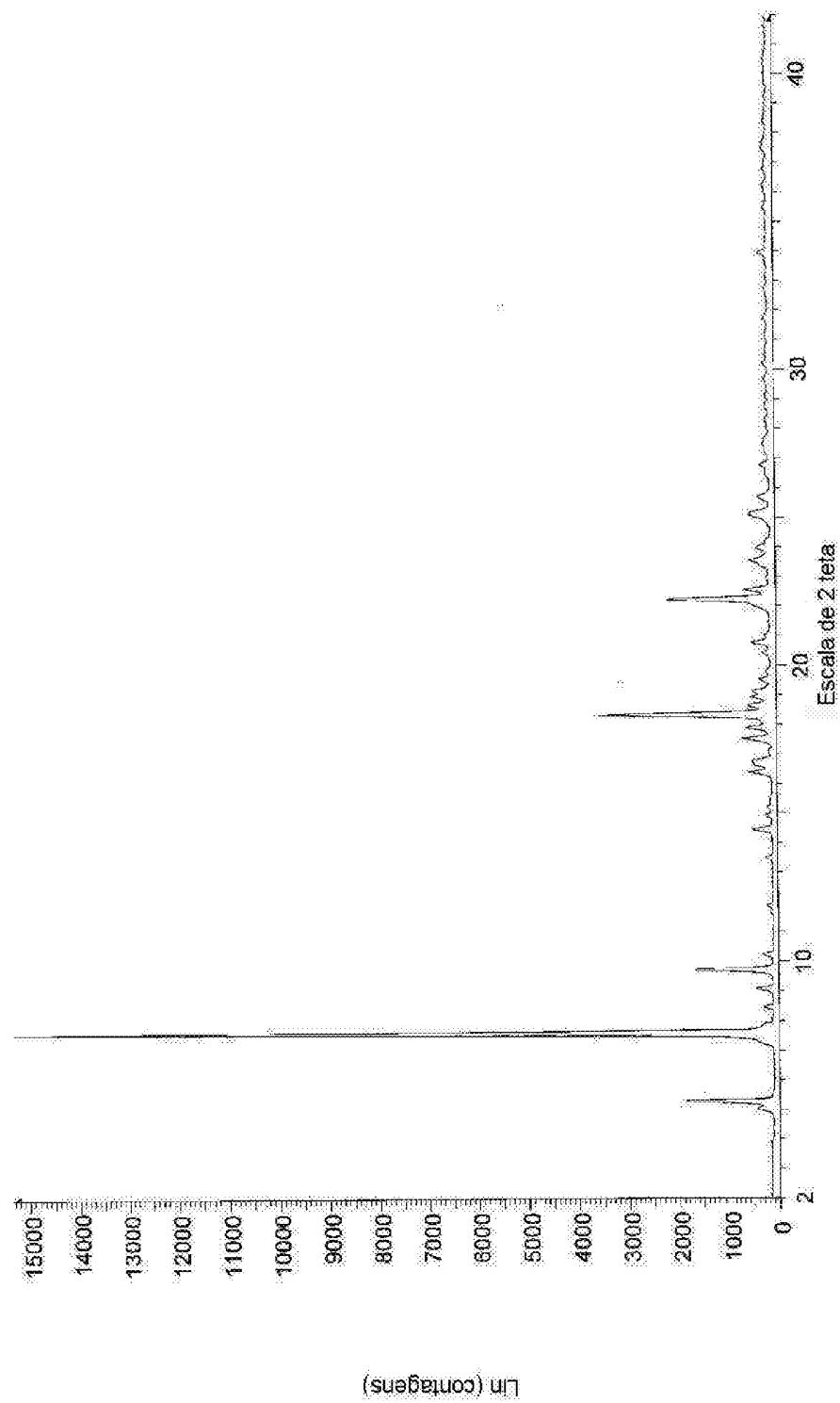
22. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que o S<sub>P</sub>-4 é cristalino, que compreende ainda:

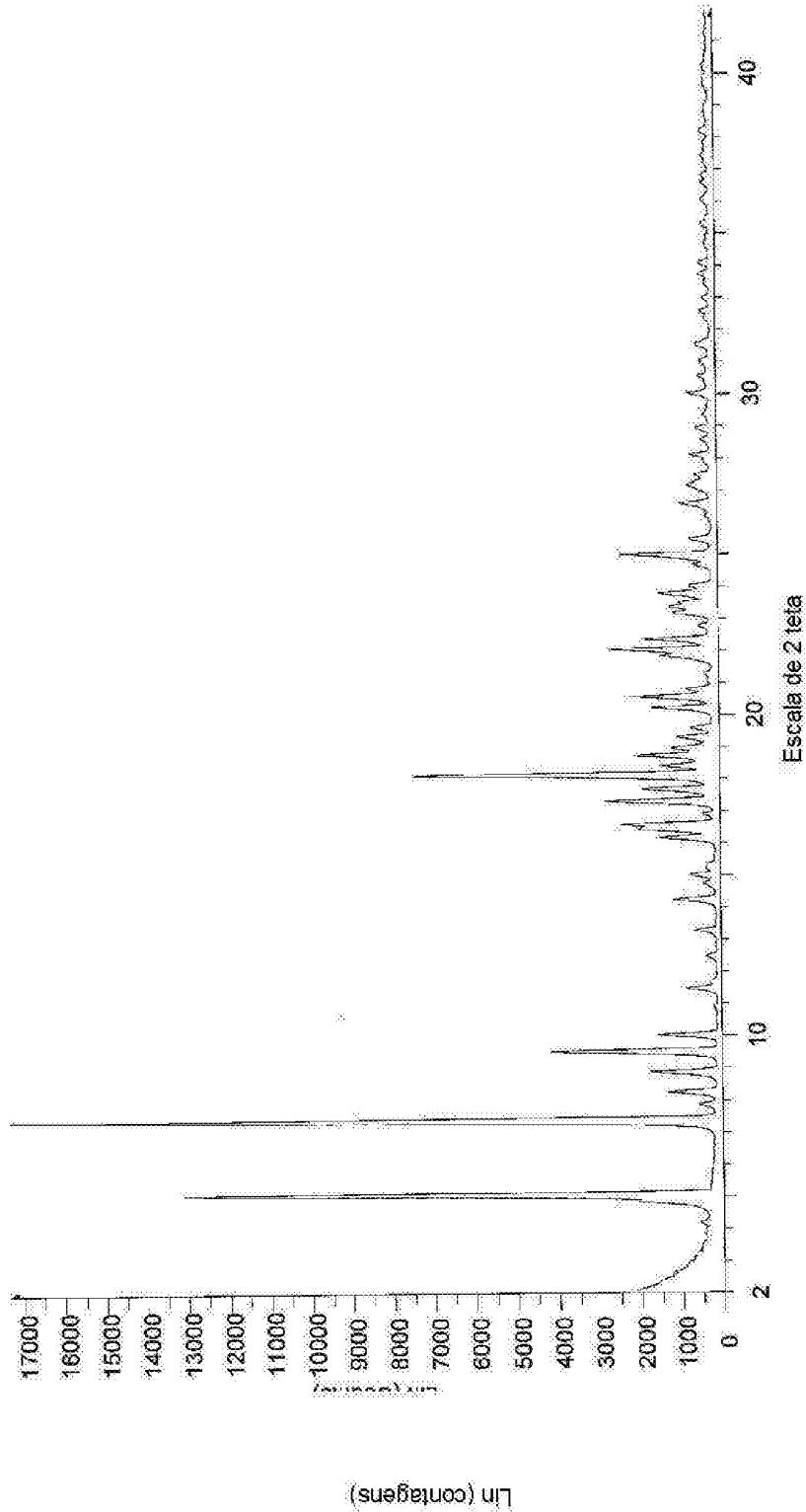
- d) adicionar sílica gel à segunda mistura ou à terceira mistura seguido de evaporação de solvente para propiciar uma pasta seca;
- e) agitar a pasta seca numa primeira combinação de solvente/antissolvente para obter uma primeira pasta húmida;
- f) decantar a primeira combinação de solvente/antissolvente da primeira pasta húmida para obter uma segunda pasta húmida e uma primeira composição;
- g) adicionar à segunda pasta húmida uma segunda combinação de solvente/antissolvente seguido de agitação;
- h) decantar a segunda combinação de solvente/antissolvente da segunda pasta húmida para obter uma terceira pasta húmida e uma segunda composição
- i) repetir opcionalmente as etapas g)-h) na terceira pasta húmida ou pastas húmidas adicionais;

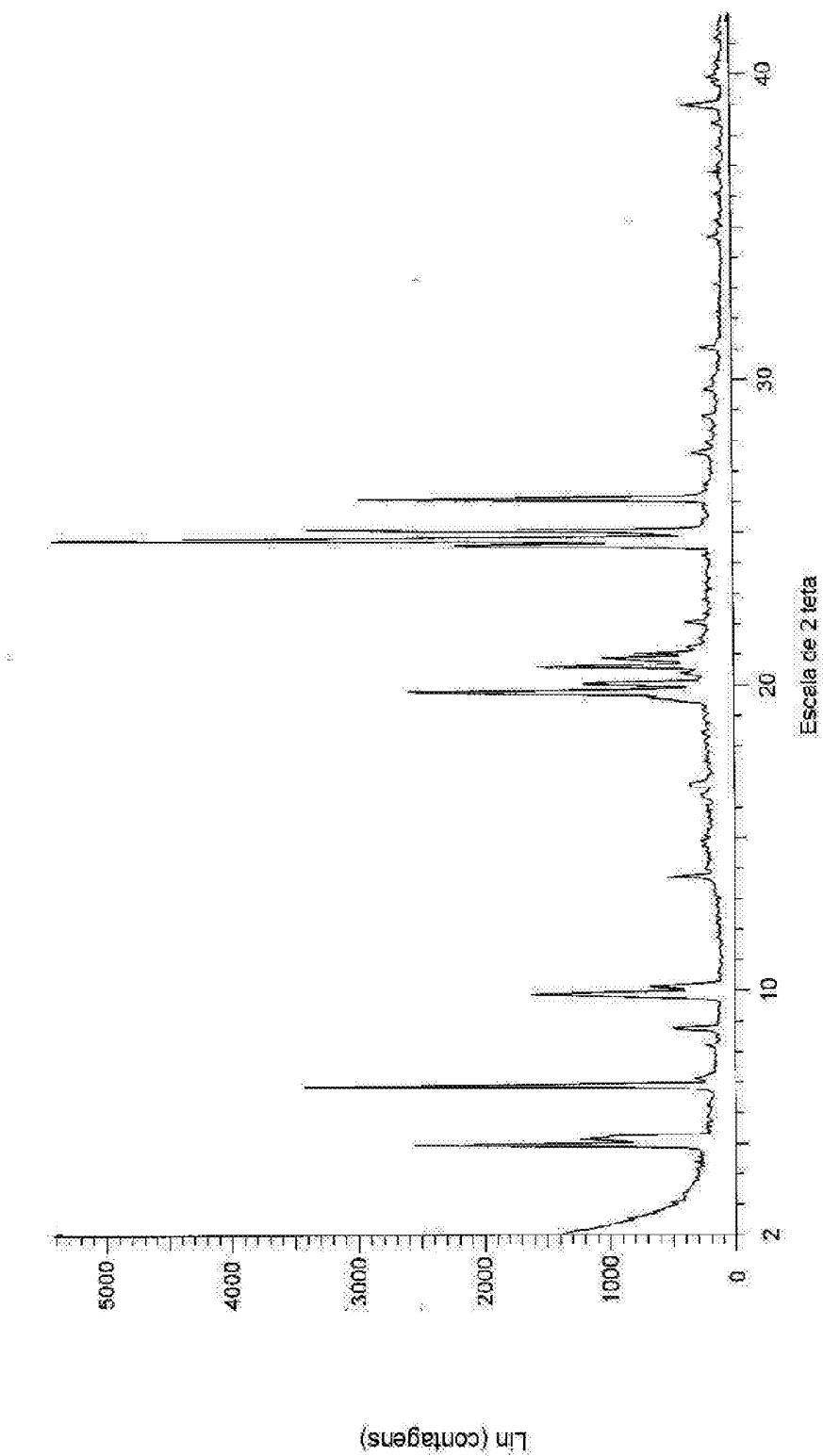
- j) evaporar o solvente da segunda composição, e opcionalmente qualquer composição adicional obtida a partir da etapa opcional i) para obter um primeiro sólido;
- k) dissolver ou suspender o primeiro sólido numa solução que contém um terceiro solvente e opcionalmente um quarto solvente para obter uma terceira composição;
- l) adicionar opcionalmente cristais de semente de **S<sub>P</sub>-4** à terceira composição;
- m) obter a partir da terceira composição um segundo sólido que compreende **S<sub>P</sub>-4**; e
- n) recristalizar opcionalmente o segundo sólido usando um terceiro solvente para obter um terceiro sólido que compreende **S<sub>P</sub>-4**.

**FIG. 1**

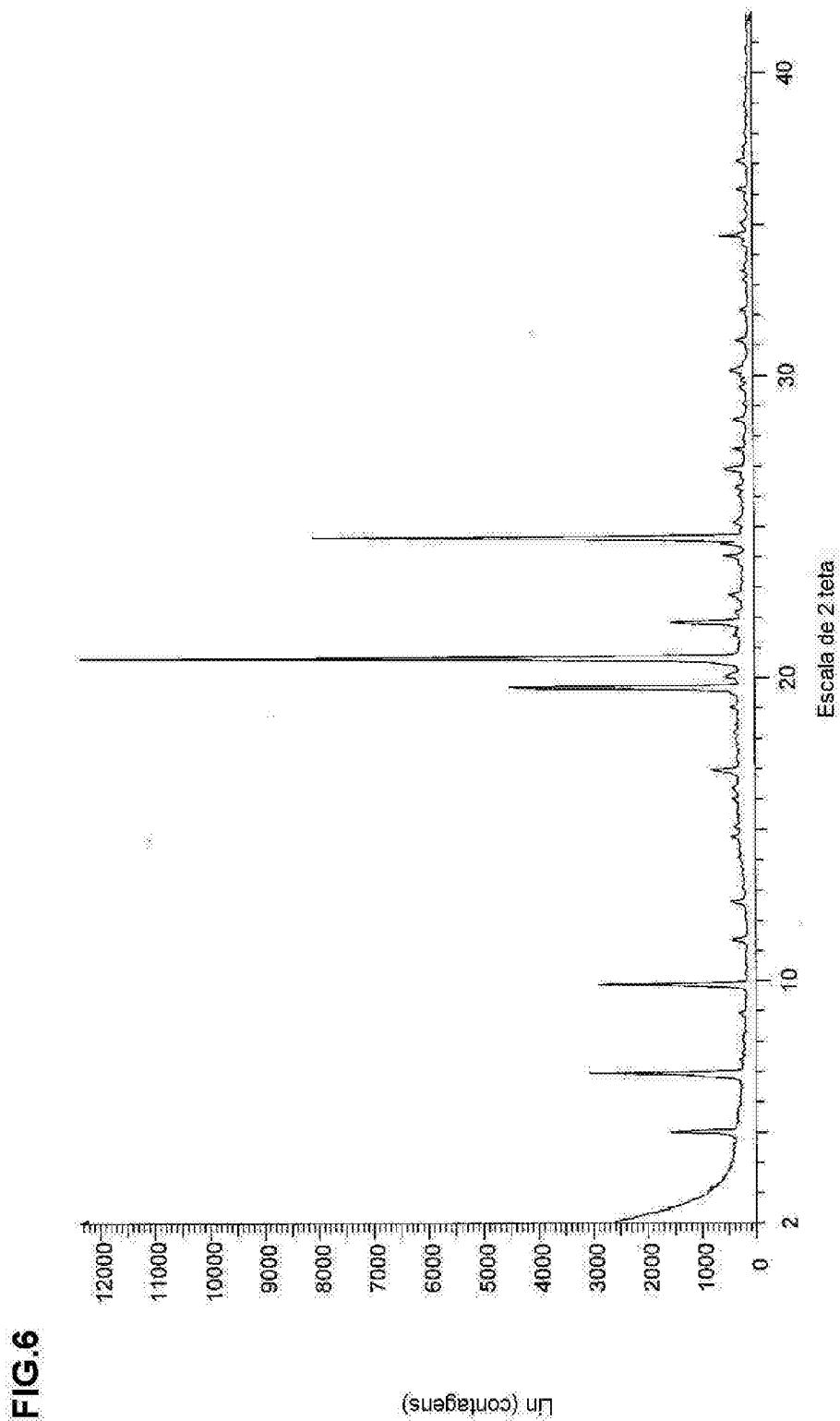




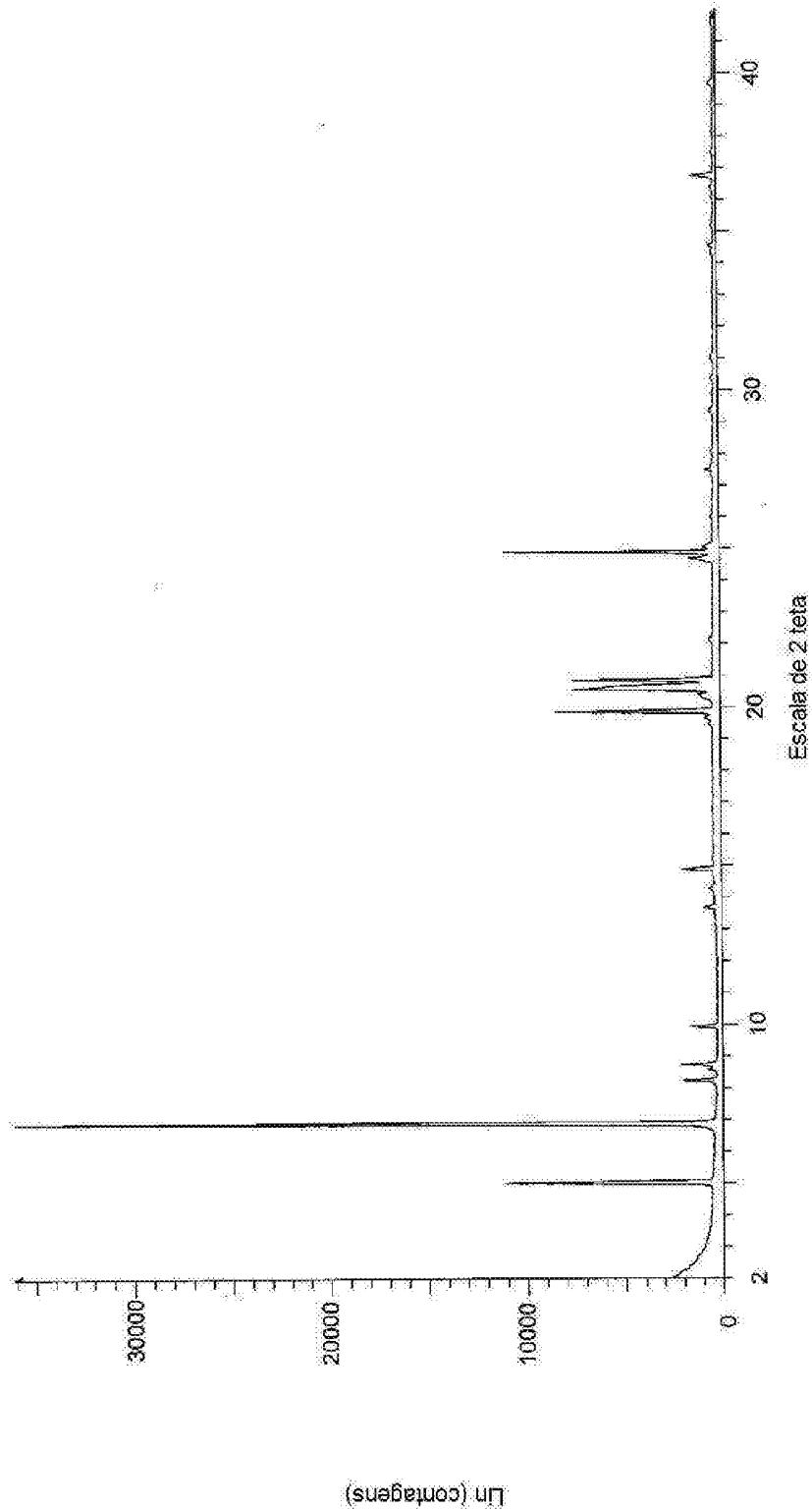


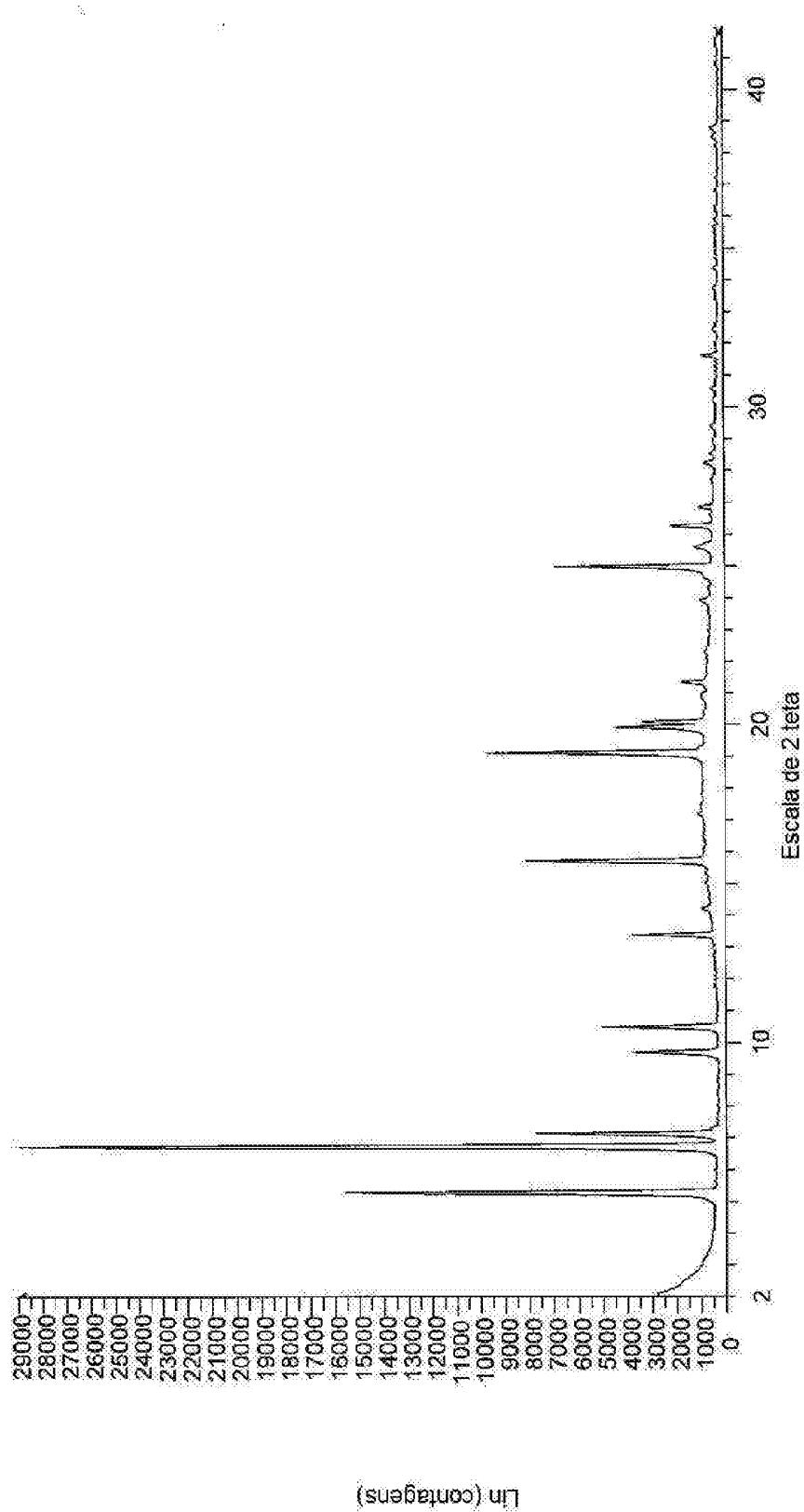


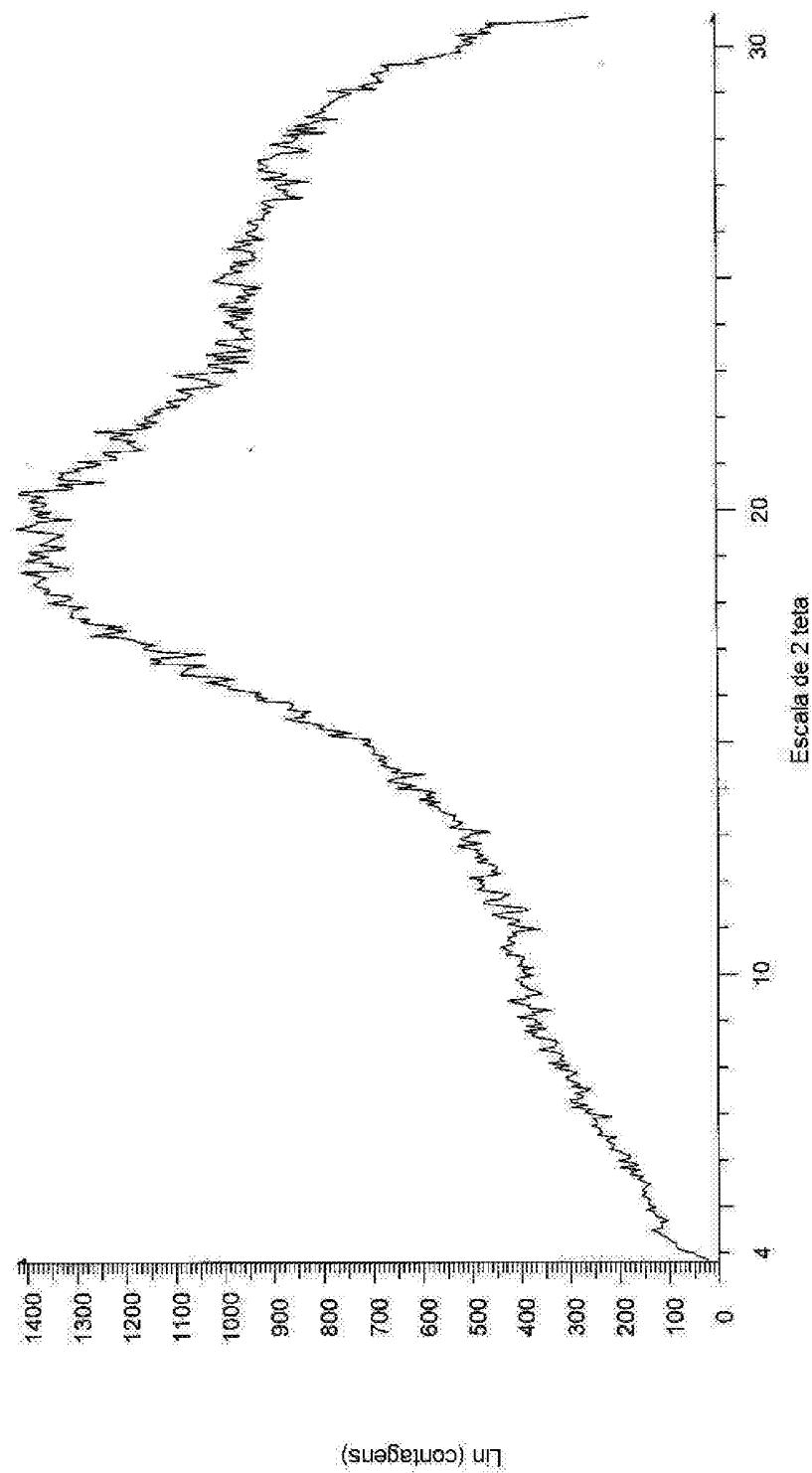
**FIG.5**

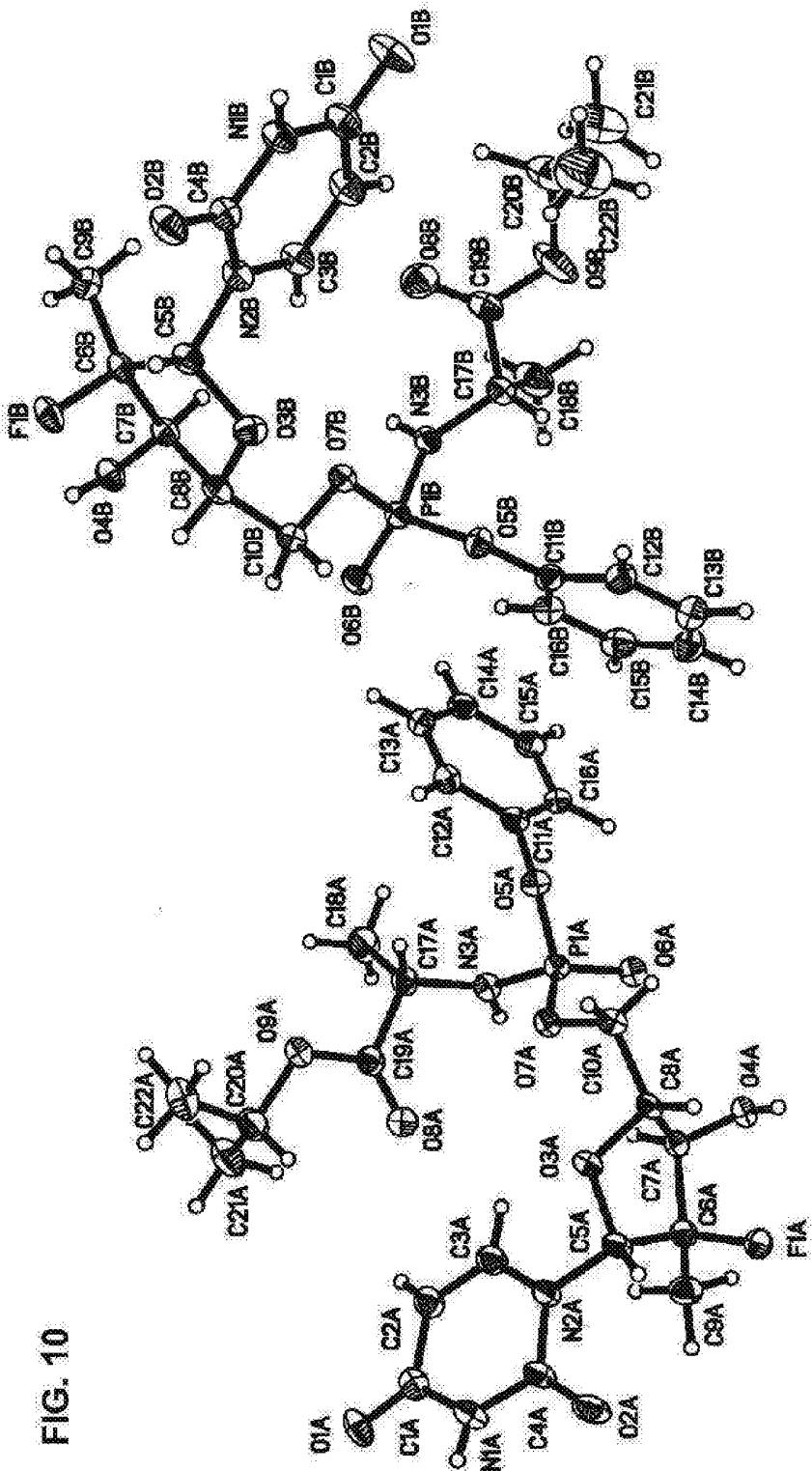


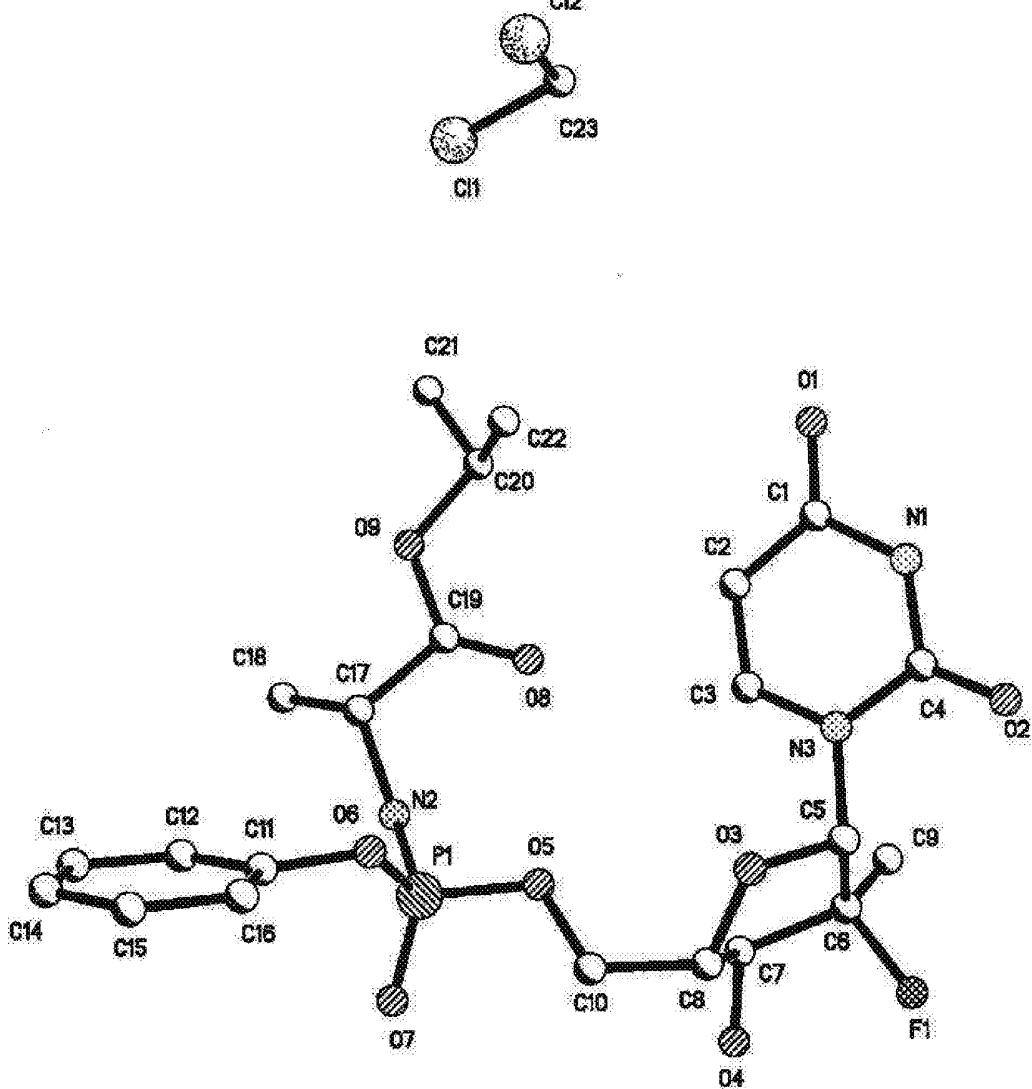
**FIG. 6**



**FIG. 8**

**FIG.9**



**FIG. 11**

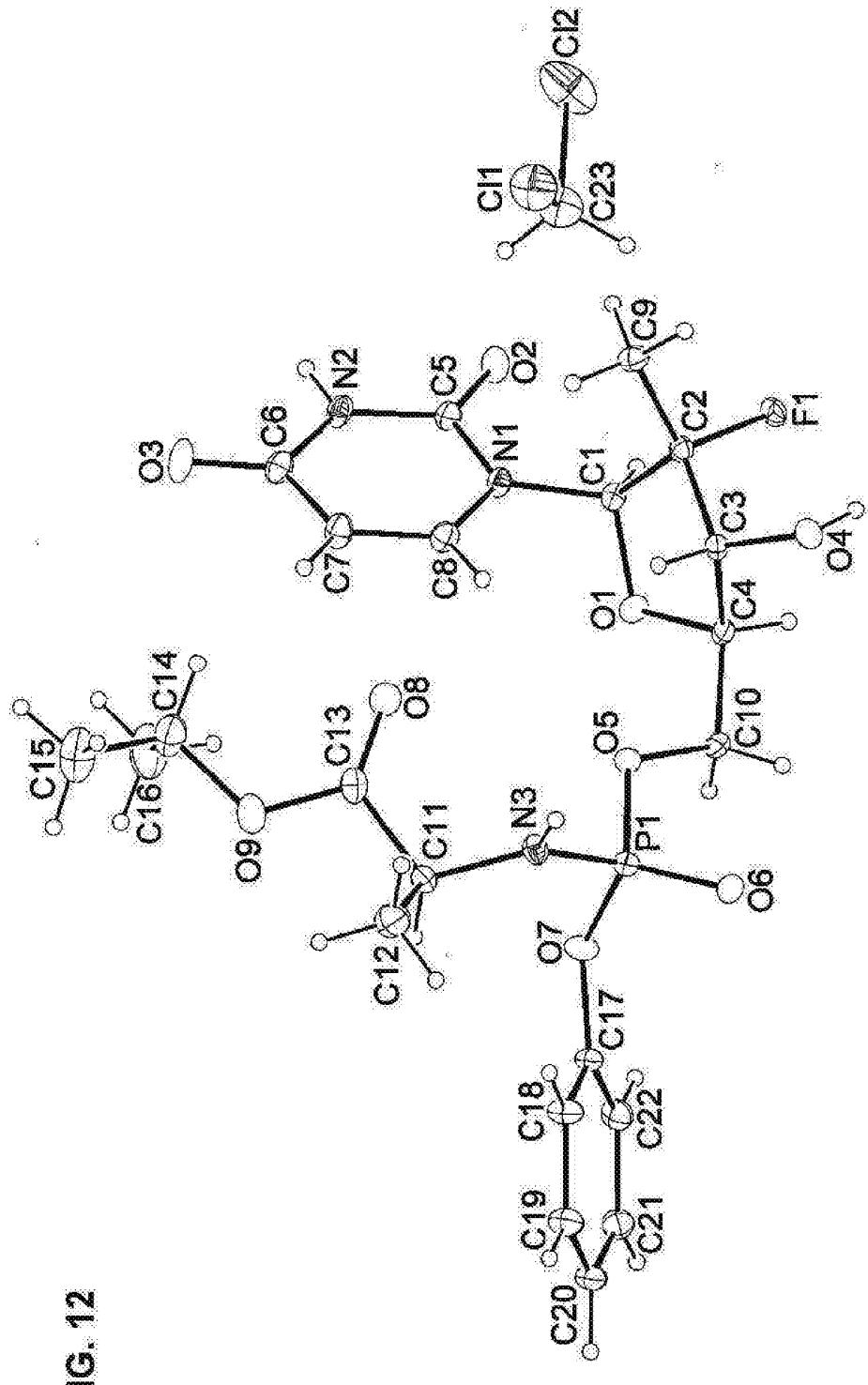


FIG. 12

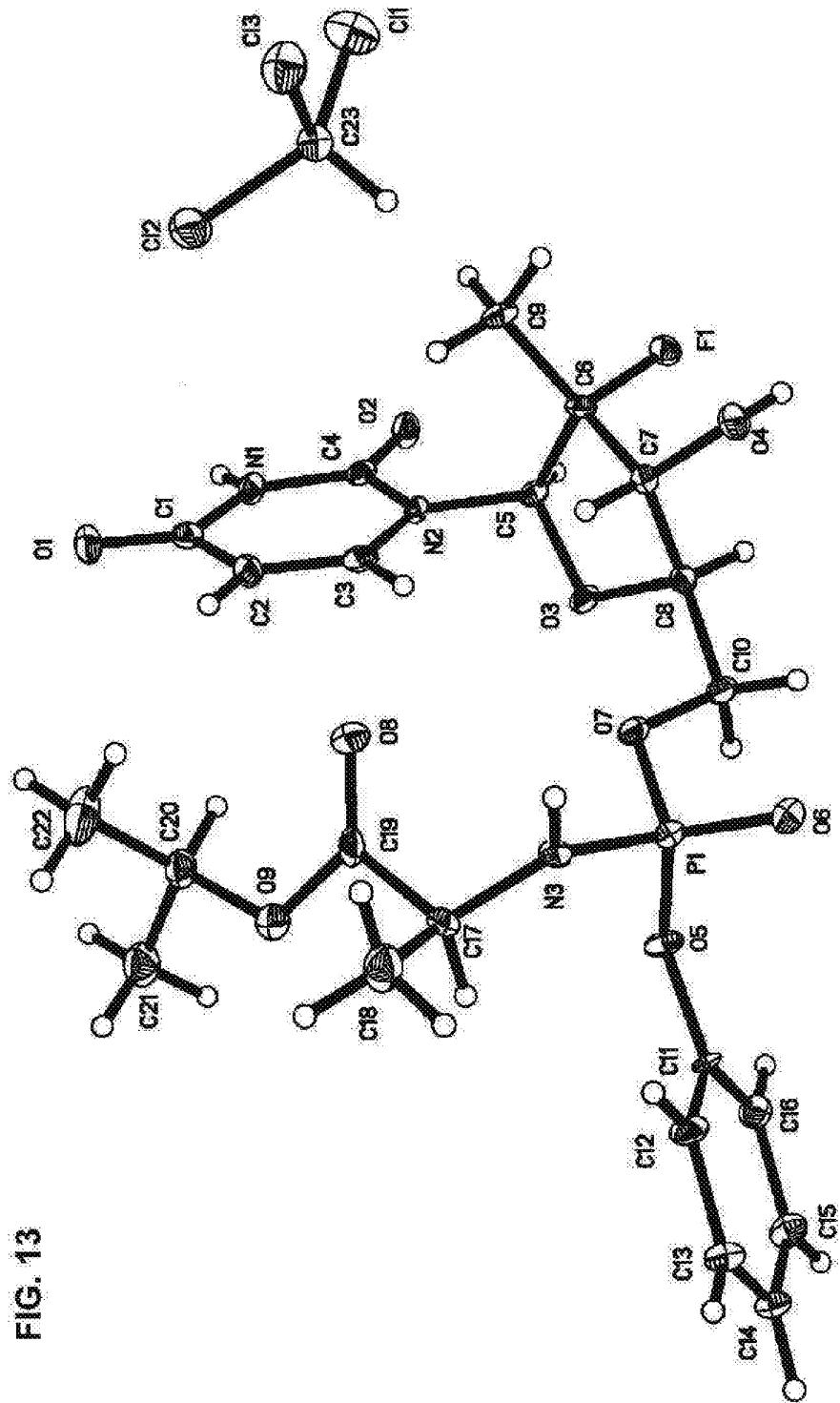
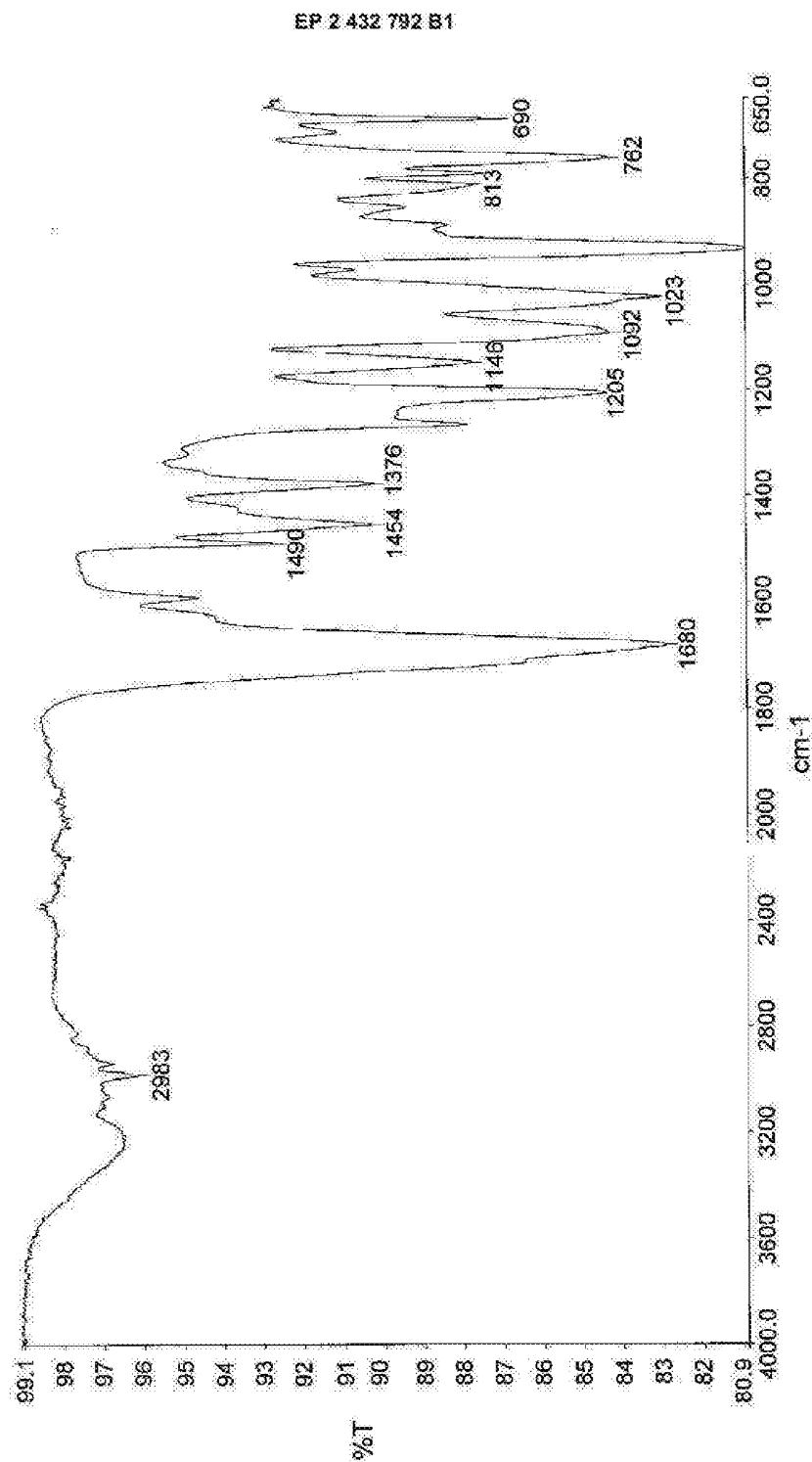
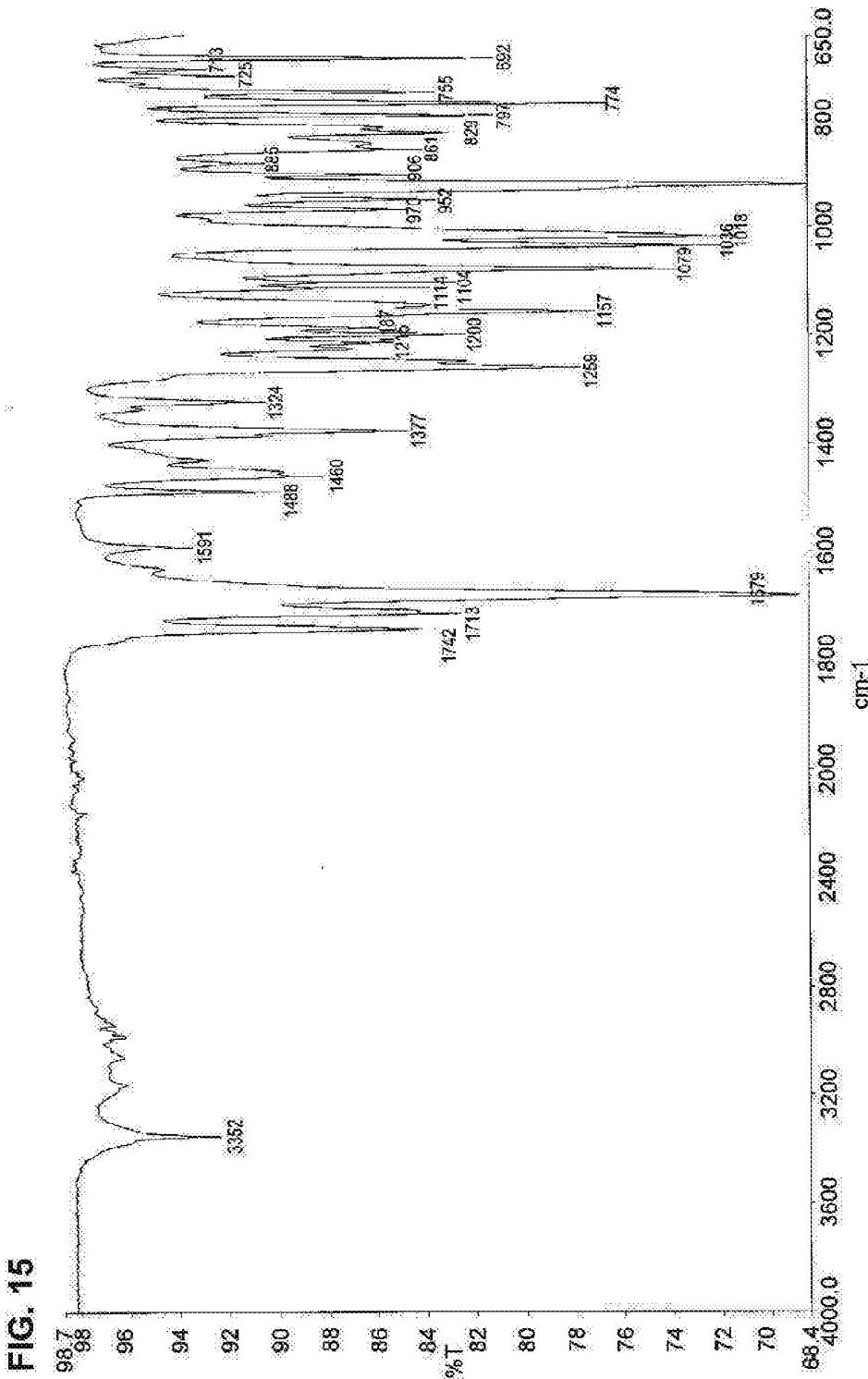
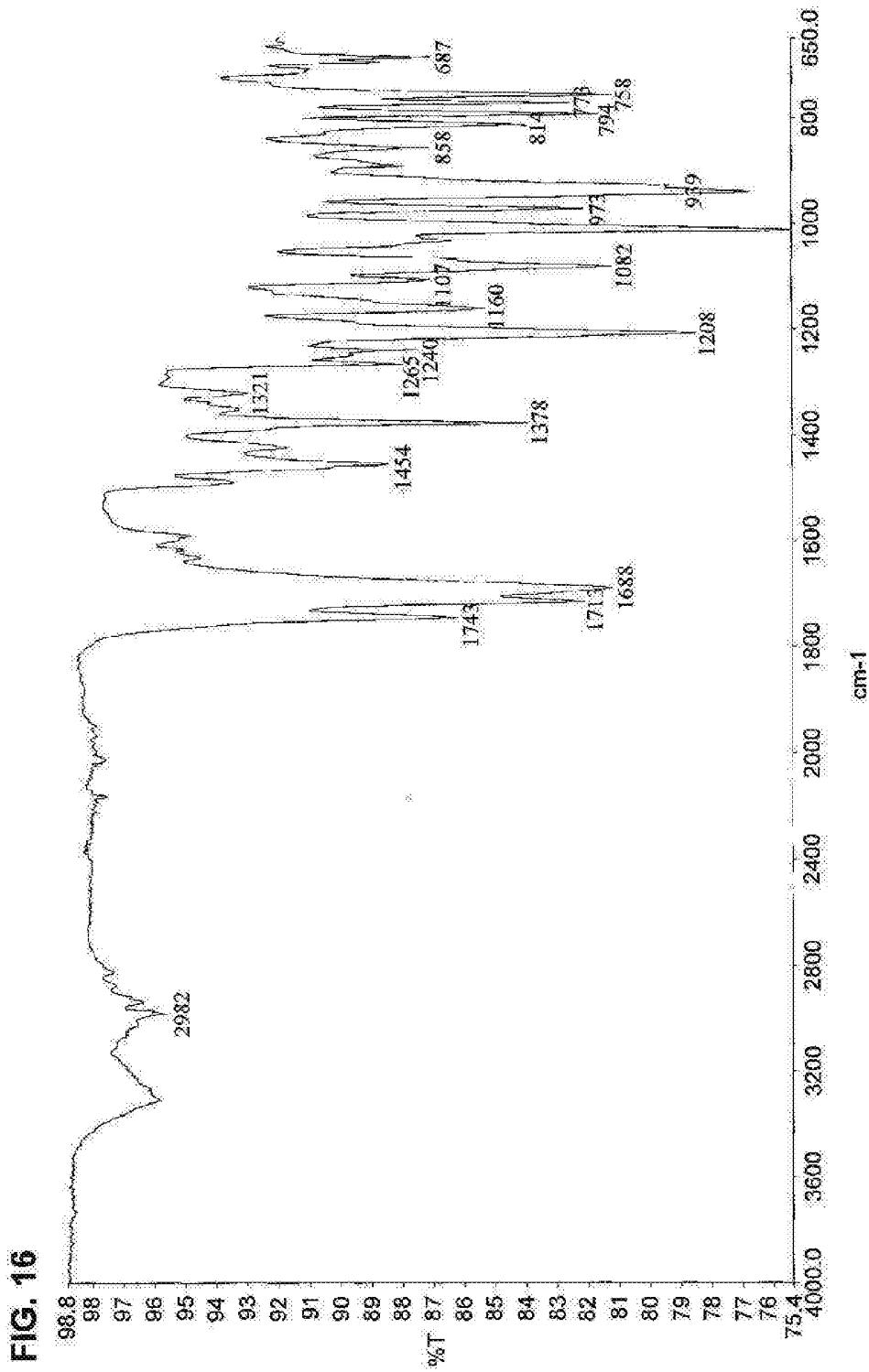


FIG. 13

**FIG. 14.**





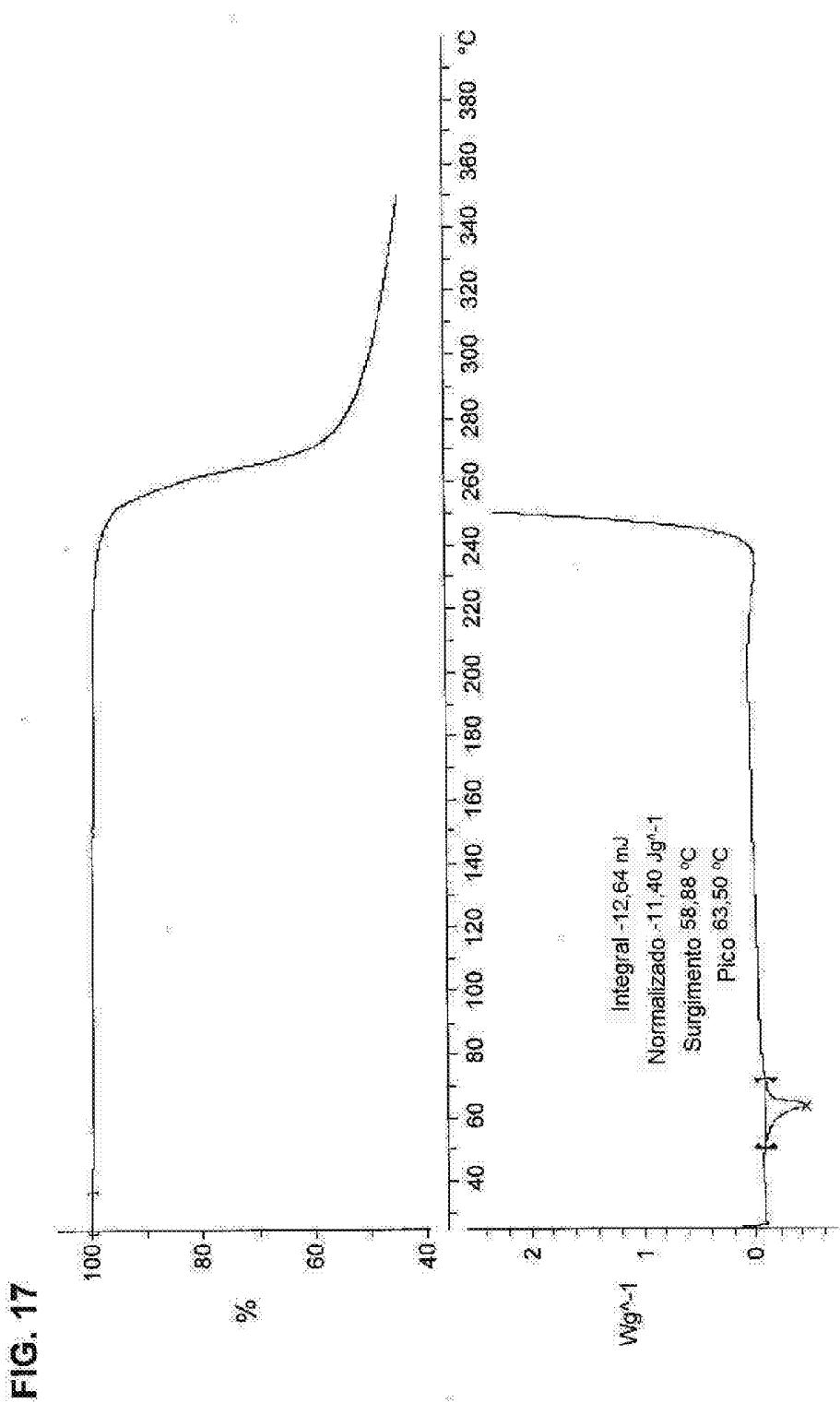
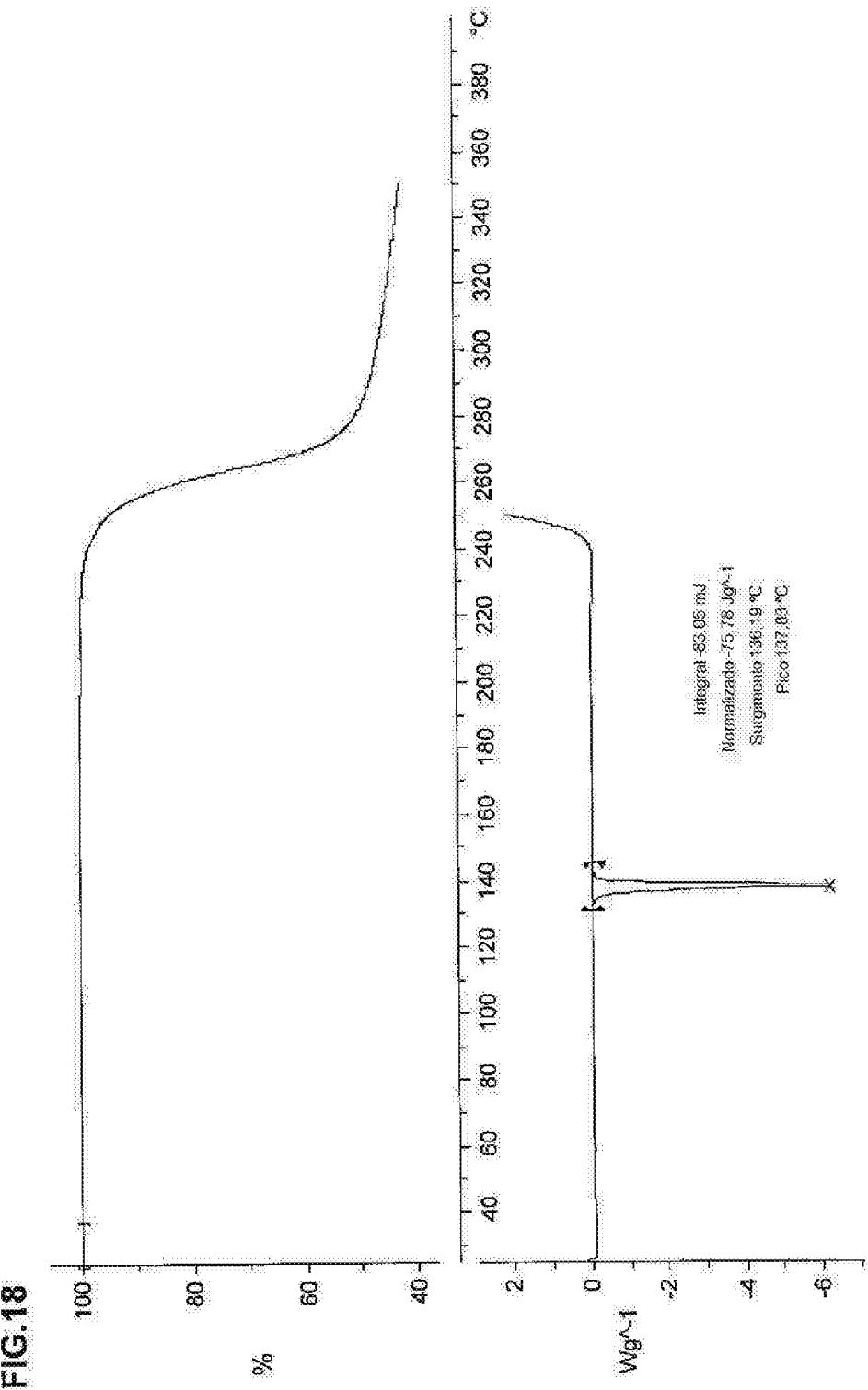
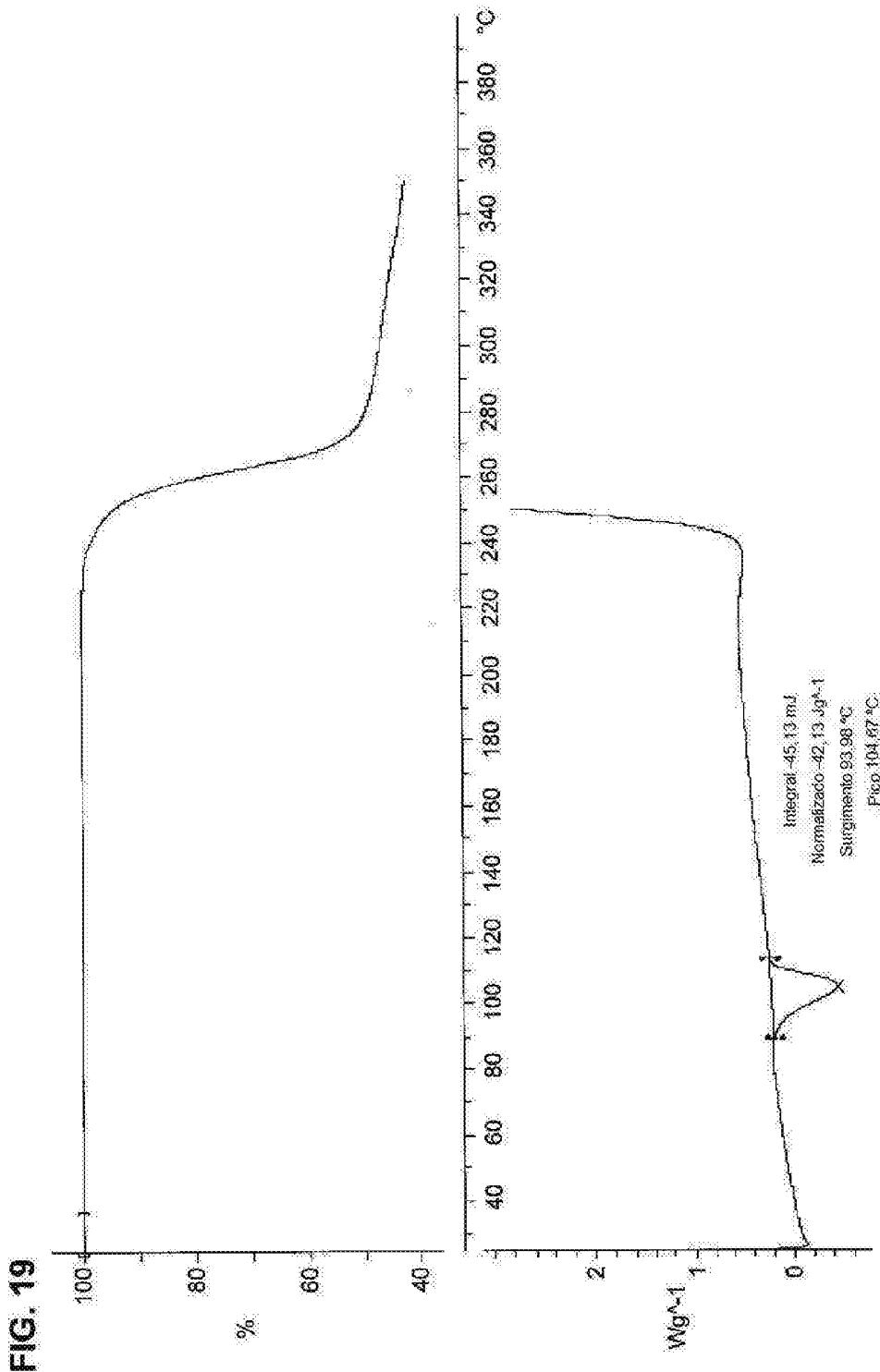


FIG. 17





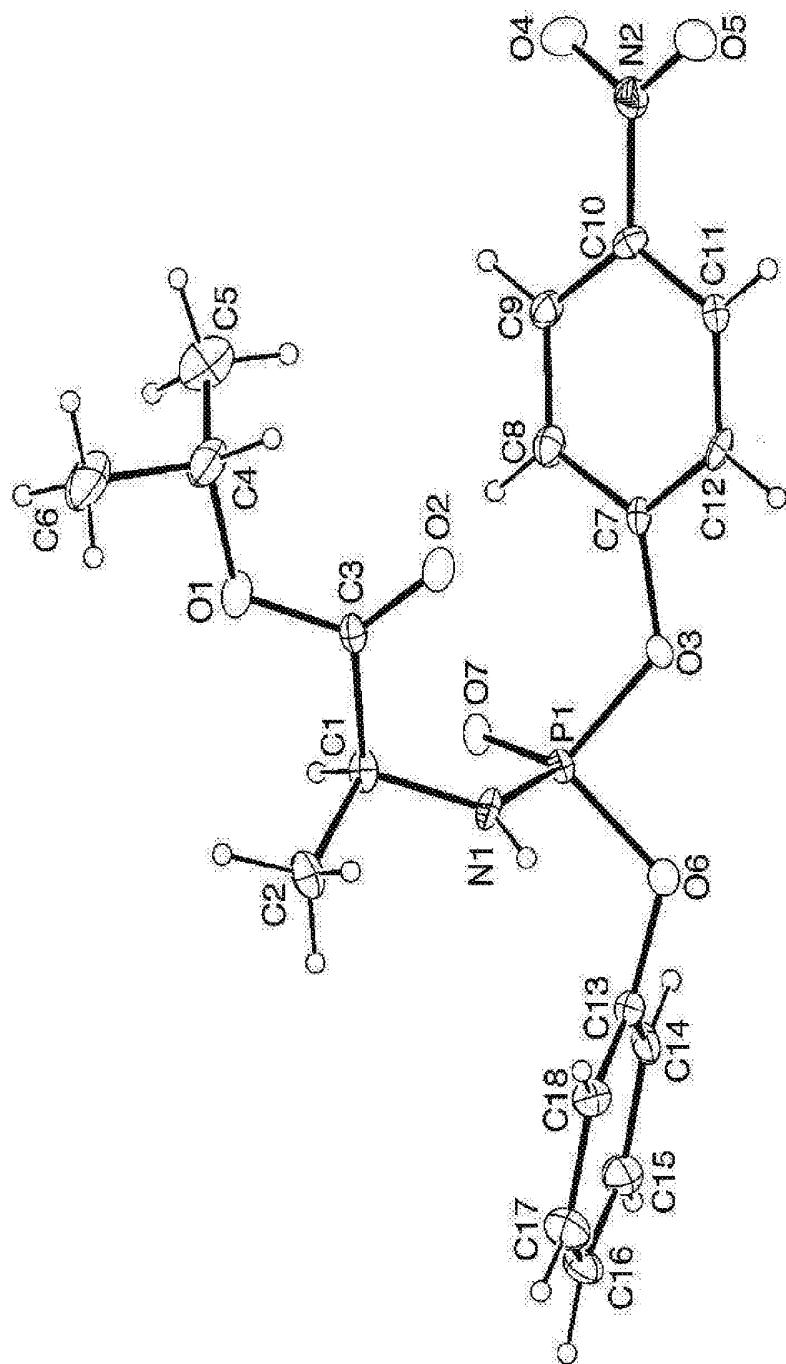


FIG. 20A

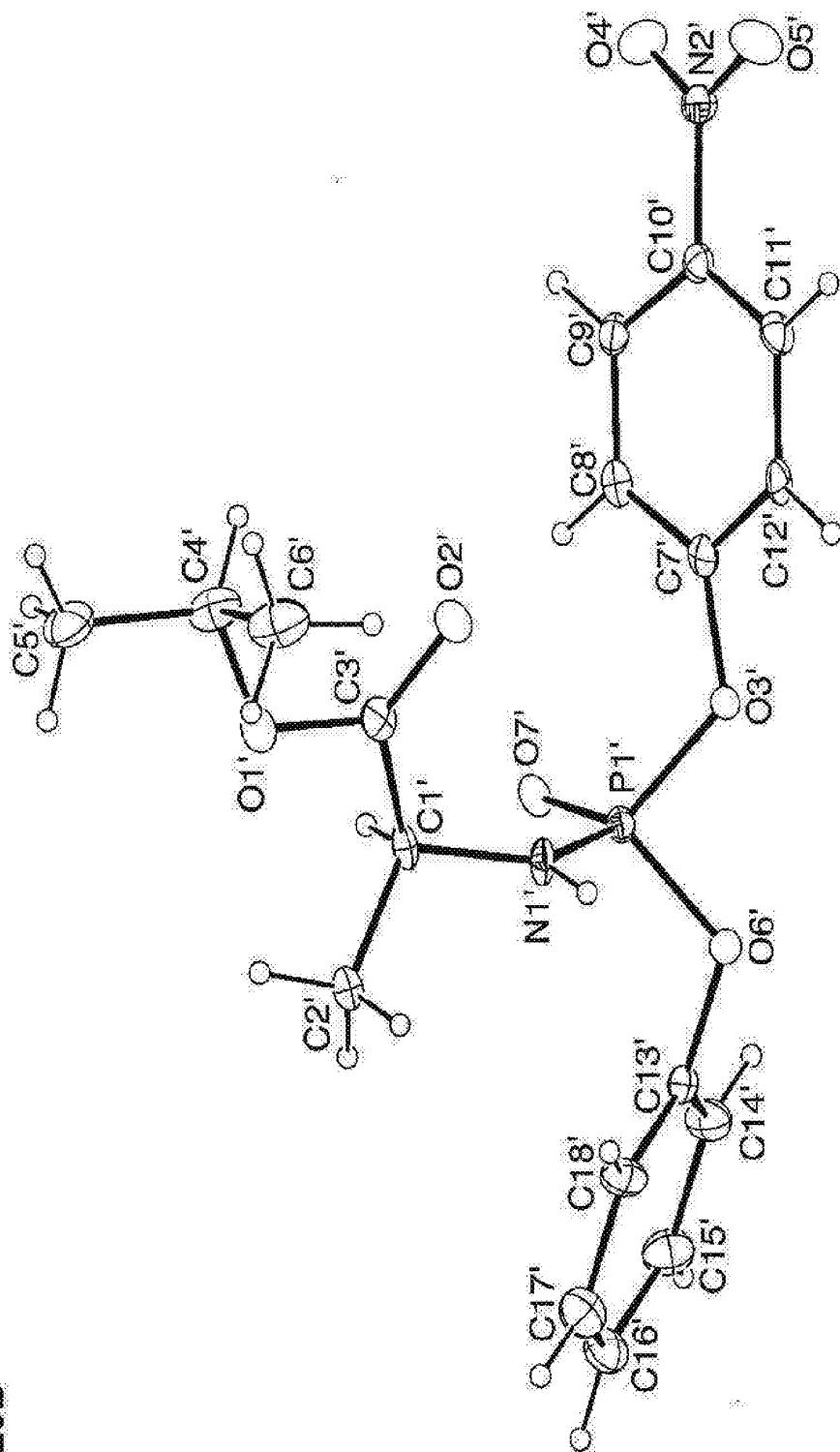


FIG. 20B