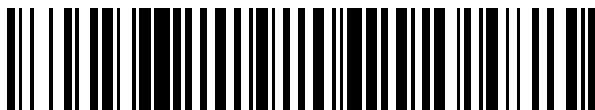


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 924 186**

(51) Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07H 21/00** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61K 31/7084** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2018 PCT/IB2018/050498**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2018 WO18138685**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2018 E 18703858 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022 EP 3573718**

---

### (54) Título: **Dinucleótidos cílicos como agonistas de STING**

(30) Prioridad:

**27.01.2017 US 201762451301 P  
27.01.2017 US 201762451351 P  
03.02.2017 US 201762454135 P**

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

**05.10.2022**

(73) Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)  
800/850 Ridgeview Drive  
Horsham, PA 19044, US**

(72) Inventor/es:

**EMANUEL, STUART;  
RICKTER, MARK;  
CONNOLLY, PETER J.;  
EDWARDS, JAMES PATRICK;  
WANG, GUANGYI;  
THATIKONDA, SANTHOSH KUMAR;  
BEIGELMAN, LEONID;  
ZHONG, MINGHONG;  
BIGNAN, GILLES;  
SCHEPENS, WIM;  
VIELLEVOYE, MARCEL y  
THURING, JOHANNES WILHELMUS JOHN  
FITZGERALD**

(74) Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 924 186 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Dinucleótidos cíclicos como agonistas de STING

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nº 62/451.301 presentada el 27 de enero de 2017; la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 62/454.135, presentada el 3 de febrero de 2017; y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 62/451.351, presentada el 27 de enero de 2017.

## 10 CAMPO DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula 2 que es agonista de STING (estimulador de genes de interferón), útil para el tratamiento de trastornos que se ven afectados por la modulación de la proteína STING. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, y al uso de tales compuestos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de varias enfermedades, síndromes y trastornos. Más particularmente, la presente invención se refiere a tal compuesto o composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento varias infecciones, enfermedades, síndromes y trastornos que incluyen, pero no se limitan a, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma, y terapia antiviral.

## 20 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

25 STING (estimulador de genes de interferón), también conocido como TMEM173, MITA, MPYS y EMS, es un receptor transmembrana localizado dentro de la célula y un sensor clave de los ácidos nucleicos citosólicos (Zhong B, et al. "The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation". *Immunity*. 2008. vol. 29: 538-550). Estudios recientes han revelado la biología de STING y su papel en la movilización de una respuesta inmunitaria innata que da como resultado una actividad antitumoral robusta en modelos de ratón. La activación de la vía STING da como resultado la producción de interferones Tipo I (principalmente IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) inducida a través de la vía IRF3 (factor regulador de interferón 3). Se piensa que la activación de IRF3 está mediada por TBK1 que recluta y fosforila a IRF3 formando así un homodímero de IRF3 capaz de introducirse en el núcleo para transcribir interferón tipo I y otros genes (Liu S, et al. "Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation" *Science*. 2015: 2630-2637). TBK1 30 también activa el potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de la vía de las células B activadas que lleva la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1a, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , etc.), a través del factor de transcripción oncogénico NF- $\kappa$ B. Además, STING activa STAT6 (transductor de señal y activador de la transcripción 6) para inducir (tipo Th2), aumentar (IL-12) o disminuir (IL-10) la producción de varias citoquinas, incluyendo las quimiocinas CCL2, CCL20 y CCL26 (Chen H, et al. "Activation of STAT6 by STING Is Critical for Antiviral Innate 35 Immunity" *Cell*. 2011, vol.14: 433-446). También se ha informado que la fosforilación directa de STING en Ser366 después de la activación se produce a través de TBK1 o ULK1 (Corrales, L. et al "Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity" *Cell Reports*, 2015, vol.11: 1-13; Konno, H. et al. "Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate 40 immune signaling" *Cell*, 2013, vol. 155: 688-698).

45 El ligando natural que se une y activa STING guanosina monofosfato-adenosina monofosfato (2',3')cíclico (2',3'-cGAMP) y la enzima responsable de su síntesis (cGAS, también conocida como C6orf150 o MB21D1) han sido 50 elucidados proporcionando una oportunidad para modular esta vía. cGAMP es un ligando de alta afinidad para STING producido en células de mamíferos que sirve como segundo mensajero endógeno para activar la vía STING. Es un dinucleótido cíclico con un enlace 2',3' único producido por cGAS en presencia de ADN exógeno de cadena doble (por ejemplo, el liberado por bacterias, virus o protozoos invasores) o de ADN propio en mamíferos (Wu et al., 2013; Sun, L. et al. "Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway" *Science*, 2013, vol. 339: 786-791; Bhat N and Fitzgerald KA. "Recognition of Cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors". *Eur J Immunol*. 2014 Mar; 44(3):634-40). La activación de STING también puede 55 producirse a través de la unión de dinucleótidos cíclicos exógenos (3',3) (c-di-GMP, c-di-AMP y 3'3'-cGAMP) que son liberados por bacterias invasoras (Zhang X, et al. "Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING" *Molecular Cell*, 2013, vol. 51: 226-235; Danilchanka, O and Mekalanos, JJ. "Cyclic Dinucleotides and the Innate Immune Response" *Cell*. 2013. vol. 154: 962-970).

60 La activación de la vía STING desencadena una respuesta inmunitaria que da como resultado la generación de células T asesinas específicas que pueden encoger los tumores y proporcionar una inmunidad duradera para que no vuelvan a aparecer. La sorprendente actividad antitumoral obtenida con los agonistas de STING en modelos preclínicos ha generado un alto nivel de entusiasmo por este objetivo y los compuestos de molécula pequeña que pueden modular la vía de STING tienen potencial tanto para tratar el cáncer como reducir las 65 enfermedades autoinmunes.

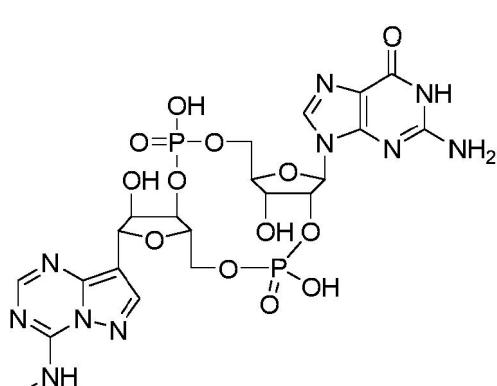
5 La activación de la vía STING también contribuye a una respuesta antiviral. La pérdida de respuesta funcional, ya sea a nivel celular o del organismo, demuestra una incapacidad para controlar la carga viral en ausencia de STING. La activación de la vía STING desencadena una respuesta inmunitaria que da como resultado citoquinas antivirales y proinflamatorias que combaten el virus y movilizan los brazos innatos y adaptativos del sistema inmunitario. En última instancia, se desarrolla una inmunidad duradera contra el virus patógeno. La sorprendente actividad antiviral obtenida con los agonistas de STING en modelos preclínicos ha generado un alto nivel de entusiasmo por este objetivo y los compuestos de molécula pequeña que pueden modular la vía de STING tienen potencial para tratar infecciones virales crónicas, como la hepatitis B.

10 10 La infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) es un importante problema de salud mundial que afecta a más del 5% de la población mundial (más de 350 millones de personas en todo el mundo y 1,25 millones de individuos en los Estados Unidos). A pesar de la disponibilidad de ciertas vacunas y terapias contra el VHB, la carga 15 de la infección crónica por VHB continúa siendo un importante problema médico mundial no resuelto debido a las opciones de tratamiento subóptimas y las tasas sostenidas de nuevas infecciones en la mayor parte del mundo en desarrollo. Los tratamientos actuales se limitan a sólo dos clases de agentes: interferón alfa y análogos de 20 nucleósidos que actúan como inhibidores de la polimerasa viral. Sin embargo, ninguna de estas terapias ofrece una cura para la enfermedad, y la resistencia a los fármacos, la baja eficacia y los problemas de tolerabilidad limitan su impacto. Las bajas tasas de curación del VHB se atribuyen, por lo menos en parte, al hecho de que es difícil lograr la 25 supresión completa de la producción del virus con un único agente antiviral. Sin embargo, la supresión persistente del ADN del VHB retrasa la progresión de la enfermedad hepática y ayuda a prevenir el carcinoma hepatocelular. Los objetivos de la terapia actuales para los pacientes infectados por el VHB están dirigidos a reducir el ADN del VHB en suero a niveles bajos o indetectables y, en última instancia, a reducir o prevenir el desarrollo de cirrosis y 30 carcinoma hepatocelular. Hay, por tanto, una necesidad en la técnica de agentes terapéuticos que puedan aumentar la supresión de la producción de virus y que puedan tratar, mejorar o prevenir la infección por VHB. La administración de dichos agentes terapéuticos a un paciente infectado por el VHB, ya sea como monoterapia o en combinación con otros tratamientos contra el VHB o tratamientos complementarios, puede llevar a una carga viral 35 significativamente reducida, un pronóstico mejorado, una progresión disminuida de la enfermedad y unas tasas de seroconversión mejoradas.

30 Los potenciales beneficios terapéuticos de mejorar tanto la inmunidad innata como la adaptativa hacen de STING un objetivo terapéutico atractivo que demuestra una actividad impresionante por sí mismo y que también puede combinarse con otras inmunoterapias. Los agonistas de STING se han divulgado, por ejemplo en la WO 2014/179335, WO 2014/189806, WO 2015/077354, WO 2015/185565, WO 2016/120305, WO 2014/189805 y en otros lugares.

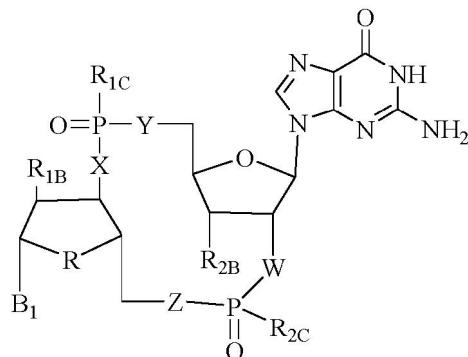
#### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

40 La presente invención proporciona el compuesto:



55 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60 La presente divulgación también proporciona compuestos de Fórmula (I)



en donde

20 R es CH<sub>2</sub> u O;

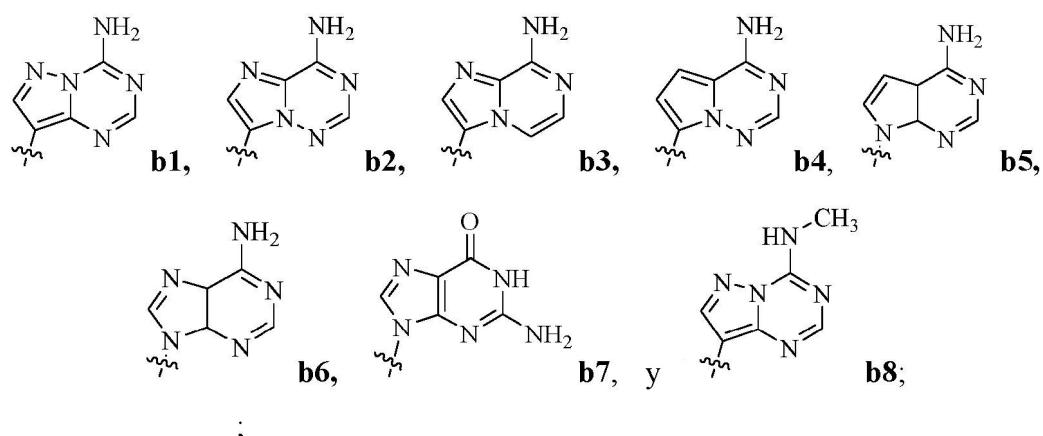
R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;

R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;

R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;

R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;

B<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste de anillos b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7 y b8



45 W es -O- o -NH-;

X es -O- o -NH-;

Y es -CH<sub>2</sub>- , -O- o -NH-;

Z es -CH<sub>2</sub>- , -O- o -NH-;

de tal manera que solo uno de X e Y es NH, y solo uno de W y Z es NH, en cualquier caso;

50 y de tal manera que cuando R es CH<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> se selecciona de b6 o b7, entonces R<sub>2B</sub> es distinto de fluoro o hidroxi;

además, siempre que un compuesto de Fórmula (I) sea distinto de un compuesto en el que R, W, X, Y y Z son

cada uno O; R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi; B<sub>1</sub> es b1; y R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi;

o un enantiómero, diastereómero o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos uno de un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

60 También se divultan procesos para preparar una composición farmacéutica que comprende, consiste de y/o consiste esencialmente de mezclar un compuesto de Fórmula (I) y un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones de la invención la composición es una forma de dosificación oral sólida.

En realizaciones de la invención la composición es un jarabe, un elixir o una suspensión.

65 La presente invención proporciona además el compuesto o las composiciones de la presente invención

para su uso en el tratamiento de una enfermedad, síndrome o afección, en donde dicha enfermedad, síndrome o afección es cáncer o una infección viral. En realizaciones específicas de la invención la enfermedad, síndrome o afección es cáncer.

5 En realizaciones de la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y fibrosarcoma.

En realizaciones específicas de la invención la enfermedad, síndrome o afección es una infección viral.

10 En realizaciones de la invención, la infección viral es hepatitis B.

La divulgación proporciona métodos para tratar o mejorar una infección viral, enfermedad, síndrome o afección en un sujeto, incluyendo un mamífero y/o un humano, usando un compuesto de Fórmula (I).

15 La divulgación proporciona además métodos para tratar o mejorar una infección viral, enfermedad, síndrome o afección en un sujeto, incluyendo un mamífero y/o un humano en donde la infección viral, enfermedad, síndrome o afección se ve afectada por el agonismo de STING, seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B, usando un compuesto de Fórmula (I).

20 La divulgación proporciona además métodos para tratar o mejorar una infección viral, enfermedad, síndrome o afección en un sujeto, incluyendo un mamífero y/o un humano, seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B, usando un compuesto de Fórmula (I).

25 La divulgación también está dirigida al uso de cualquiera de los compuestos descritos en la presente en la preparación de un medicamento en donde el medicamento se prepara para tratar una infección viral, enfermedad, síndrome o afección que se ve afectada por el agonismo de STING, seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B, en un sujeto con necesidad de ello.

30 La divulgación también está dirigida al uso de cualquiera de los compuestos descritos en la presente en la preparación de un medicamento en donde el medicamento se prepara para tratar una infección viral, enfermedad, síndrome o afección seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B, en un sujeto con necesidad de ello.

35 La divulgación también está dirigida a la preparación de derivados de dinucleótidos cíclicos sustituidos que actúan como agonistas selectivos de STING.

40 Ejemplos de la divulgación son métodos para tratar una infección viral, enfermedad, síndrome o afección modulada por STING seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B, que comprenden administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos anteriormente.

45 Ejemplos de la divulgación son métodos para tratar una infección viral, enfermedad, síndrome o afección seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B, que comprenden administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos anteriormente.

50 En otra realización, la divulgación está dirigida a un compuesto de Fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una infección viral, enfermedad, síndrome o afección afectada por el agonismo de STING seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B.

55 En otra realización, la divulgación está dirigida a una composición que comprende un compuesto de Fórmula (I) para el tratamiento de una infección viral, enfermedad, síndrome o afección seleccionada del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B. La invención está definida por las reivindicaciones. Las divulgaciones adicionales se proporciona con propósitos de información.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

60 Con referencia a los sustituyentes, el término "independientemente" se refiere a la situación en la que cuando es posible más de un sustituyente, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes entre sí.

5 El término "alquilo", ya sea usado solo o como parte de un grupo sustituyente, se refiere a cadenas de carbono lineales y ramificadas que tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Por lo tanto, los números designados de átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1-8</sub>) se refieren independientemente al número de átomos de carbono en una fracción de alquilo o a la porción alquilo de un sustituyente que contiene alquilo superior. En grupos sustituyentes con múltiples grupos alquilo como (alquilo C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>amino-, los grupos alquilo C<sub>1-6</sub> del dialquilamino pueden ser iguales o diferentes.

10 El término "alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo, en donde el término "alquilo" es como se ha definido anteriormente.

15 Los términos "alquenilo" y "alquinilo" se refieren a cadenas de carbono lineales y ramificadas que tienen de 2 a 8 átomos de carbono, en donde una cadena de alquenilo contiene por lo menos un enlace doble y una cadena de alquinilo contiene por lo menos un enlace triple.

15 El término "cicloalquilo" se refiere a anillos hidrocarbonados monocíclicos o policíclicos, saturados o parcialmente saturados, de 3 a 14 átomos de carbono. Los ejemplos de tales anillos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y adamantilo.

20 El término "heterociclico" se refiere a un sistema de anillos monocíclico o bicíclico no aromático que tiene de 3 a 10 miembros en el anillo que incluyen por lo menos 1 átomo de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O y S. Incluido dentro del término heterociclico está un anillo cíclico no aromático de 5 a 7 miembros en el que de 1 a 2 miembros son N, o un anillo cíclico no aromático de 5 a 7 miembros en el que 0, 1 o 2 miembros son N y hasta 2 miembros son O o S y por lo menos uno el miembro debe ser N, O o S; en donde, opcionalmente, el anillo contiene de 0 a 1 enlaces insaturados, y, opcionalmente, cuando el anillo tiene de 6 o 7 miembros, contiene hasta 2 enlaces insaturados. Los miembros del anillo de átomos de carbono que forman un anillo de heterociclo pueden estar completamente saturados o parcialmente saturados. El término "heterociclico" también incluye dos grupos heterocicloalquilo monocíclicos de 5 miembros unidos para formar un anillo bicíclico. Tales grupos no se consideran completamente aromáticos y no se refieren como grupos heteroarilo. Cuando un heterociclo es bicíclico, ambos anillos del heterociclo son no aromáticos y por lo menos uno de los anillos contiene un miembro del anillo de heteroátomo. Los ejemplos de grupos heterociclo incluyen, pero no se limitan a, pirrolinilo (incluyendo 2H-pirrol, 2-pirrolinilo o 3-pirrolinilo), pirrolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo y piperazinilo. A menos que se indique lo contrario, el heterociclo está unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable.

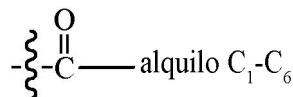
35 El término "arilo" se refiere a un anillo monocíclico o bicíclico aromático insaturado de 6 a 10 miembros de carbono. Los ejemplos de anillos arilo incluyen fenilo y naftalenilo. El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillos aromático monocíclico o bicíclico aromático que tiene de 5 a 10 miembros en el anillo y que contiene átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste de N, O y S. 40 Incluidos dentro del término heteroarilo están los anillos aromáticos de 5 o 6 miembros en los que el anillo consiste de átomos de carbono y tiene por lo menos un miembro de heteroátomo. Los heteroátomos adecuados incluyen nitrógeno, oxígeno y azufre. En el caso de anillos de 5 miembros, el anillo de heteroarilo contiene preferiblemente un miembro de nitrógeno, oxígeno o azufre y, además, hasta 3 nitrógenos adicionales. En el caso de anillos de 6 miembros, el anillo de heteroarilo contiene preferiblemente de 1 a 3 átomos de nitrógeno. Para el caso en el que el anillo de 6 miembros tiene 3 nitrógenos, como máximo 2 átomos de nitrógeno son adyacentes. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen furilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolilo, isoindolilo, benzofurilo, benzotienilo, indolazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzoisoxazolilo, benzotiadiazolilo, benzotriazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo y quinazolinilo. A menos que se indique lo contrario, el heteroarilo está unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable.

50 El término "halógeno" o "halo" se refiere a átomos de flúor, cloro, bromo y yodo.

55 Siempre que el término "alquilo" o "arilo" o cualquiera de sus prefijos raíz aparezca en el nombre de un sustituyente (por ejemplo, arilalquilo, alquilamino), debe interpretarse que el nombre incluye las limitaciones dadas anteriormente para "alquilo" y "arilo". Los números designados de átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>) se refieren independientemente al número de átomos de carbono en una fracción alquilo, una fracción arilo o en la porción alquilo de un sustituyente superior en el que alquilo aparece como su prefijo raíz. Para los sustituyentes alquilo y alcoxi, el número designado de átomos de carbono incluye todos los miembros independientes incluidos dentro de un intervalo dado especificado. Por ejemplo, alquilo C<sub>1-6</sub> incluiría metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo individualmente, así como subcombinaciones de los mismos (por ejemplo, C<sub>1-2</sub>, C<sub>1-3</sub>, C<sub>1-4</sub>, C<sub>1-5</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>5-6</sub>, C<sub>2-5</sub>, etc.).

60 En general, según las reglas de nomenclatura estándar usadas a lo largo de esta divulgación, la parte terminal de la cadena lateral designada se describe primero seguida por la funcionalidad adyacente hacia el punto

de unión. Así, por ejemplo, un sustituyente "alquilcarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un grupo de fórmula:



El término "R" en un estereocentro indica que el estereocentro es puramente de configuración R tal como se define en la técnica; de igual manera, el término "S" significa que el estereocentro es puramente de configuración S. Como se usan en la presente, los términos "\*R" o "\*S" en un estereocentro se usan para designar que el estereocentro es de configuración pura pero desconocida. Como se usa en la presente, el término "RS" se refiere a un estereocentro que existe como una mezcla de las configuraciones R- y S-. De manera similar, los términos "\*RS" o "\*SR" se refieren a un estereocentro que existe como una mezcla de las configuraciones R- y S- y tiene una configuración desconocida con respecto a otro estereocentro dentro de la molécula.

15 Los compuestos que contienen un estereocentro dibujado sin una designación de enlace estéreo son una mezcla de dos enantiómeros. Los compuestos que contienen dos estereocentros, dibujados ambos sin designaciones de enlaces estéreo, son una mezcla de cuatro diastereómeros. Los compuestos con dos estereocentros, ambos etiquetados como "RS" y dibujados con designaciones de enlace estéreo, son una mezcla de dos componentes con estereoquímica relativa tal como se dibuja. Los compuestos con dos estereocentros, ambos etiquetados como "\*RS" y dibujados con designaciones de enlaces estéreo, son una mezcla de dos componentes con una estereoquímica relativa desconocida. Los estereocentros sin etiqueta dibujados sin designaciones de enlace estéreo son una mezcla de las configuraciones R- y S-. Para los estereocentros no etiquetados dibujados con designaciones de enlaces estéreo, la estereoquímica absoluta es la que se representa.

25 A menos que se indique lo contrario, se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en cualquier otra parte de esa molécula. Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución de los compuestos de la presente divulgación pueden ser seleccionados por un experto en la técnica para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, así como 30 aquellos métodos expuestos en la presente.

35 El término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento.

40 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto activo o agente farmacéutico, incluyendo un compuesto de la presente invención, que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano, que está siendo buscada por un investigador, veterinario, médico u otro practicante clínico, que incluye el alivio total o parcial de los síntomas de la enfermedad, síndrome, afección o trastorno que se está tratando.

45 El término "composición" se refiere a un producto que incluye los ingredientes especificados en cantidades terapéuticamente eficaces, así como a cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

50 Se pretende que el término "agonista de STING" abarque un compuesto que interactúa con STING uniéndose a él e induciendo una transducción de señales en sentido descendente caracterizada por la activación de las moléculas asociadas con la función de STING. Esto incluye la fosforilación directa de STING, IRF3 y/o NF-κB y también podría incluir STAT6. La activación de la vía de STING da como resultado una producción aumentada de interferones tipo I (principalmente IFN-α y IFN-β) y expresión de genes estimulados por interferón (Chen H, et al. "Activation of STAT6 by STING Is Critical for Antiviral Innate Immunity". Cell. 2011, vol.14: 433-446; y Liu S-Y, et al. "Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors". Proc. Natl. Acad. Sci. 2012:vol. 109 4239-4244).

55 El término "modulado por STING" se usa para referirse a una afección afectada por STING directamente o a través de la vía de STING, incluyendo pero no limitadas a, infecciones virales, enfermedades o afecciones como melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma e infección por hepatitis B.

60 Como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, el término "trastorno modulado por STING" significará cualquier infección viral, enfermedad, trastorno o afección caracterizada porque por lo menos uno de sus síntomas característicos se alivia o elimina tras el tratamiento con un agonista de STING. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B.

65 Como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, el término "afectar" o "afectado" (cuando

se hace referencia a una infección viral, enfermedad, síndrome, afección o trastorno que se ve afectado por el agonismo de STING) incluye una reducción en la frecuencia y/o gravedad de uno o más síntomas o manifestaciones de dicha infección viral, enfermedad, síndrome, afección o trastorno; y/o incluyen la prevención del desarrollo de uno o más síntomas o manifestaciones de dicha infección viral, enfermedad, síndrome, afección o trastorno o el desarrollo de la infección viral, enfermedad, afección, síndrome o trastorno.

5 Los compuestos de la presente divulgación son útiles en métodos para tratar o mejorar una infección viral, enfermedad, síndrome, afección o trastorno que se ve afectado por el agonismo de STING. Tales métodos comprenden, consisten y/o consisten esencialmente en administrar a un sujeto, incluyendo un animal, un mamífero y un humano con necesidad de dicho tratamiento, mejora y/o prevención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I), o un enantiómero, diastereómero, solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En particular, los compuestos de Fórmula (I) o un enantiómero, diastereómero, solvato o forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos son útiles para tratar o mejorar enfermedades, síndromes, afecciones o 15 trastornos como melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata., cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B.

20 Más particularmente, los compuestos de Fórmula (I), o un enantiómero, diastereómero, solvato o forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, son útiles para tratar o mejorar el melanoma, el cáncer de colon, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón, el fibrosarcoma y la hepatitis B, que comprende 25 administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I), o un enantiómero, diastereómero, solvato o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en la presente.

30 25 Algunas realizaciones divulgadas en la presente se refieren a métodos para mejorar y/o tratar una infección viral, que incluyen las infecciones provocadas por *Hepadnaviridae*, como el virus de la hepatitis B o VHB. Los métodos pueden incluir administrar a un sujeto al que se ha identificado que padece una infección viral una cantidad eficaz de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35 35 Otras realizaciones divulgadas en la presente se refieren a un método para mejorar y/o tratar una infección viral que puede incluir poner en contacto una célula infectada con el virus con una cantidad eficaz de uno o más compuestos descritos en la presente (por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo), o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos descritos en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Otras realizaciones más descritas en la presente se refieren al uso de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la fabricación de un medicamento para mejorar y/o tratar una infección viral.

40 40 Otras realizaciones más descritas en la presente se refieren a uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, que puede usarse para mejorar y/o tratar una infección viral. Algunas realizaciones divulgadas en la presente se refieren a un método para inhibir la replicación de un virus que puede incluir poner en contacto una célula infectada con el virus con una cantidad eficaz de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos descritos en la presente, o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

50 55 Otras realizaciones descritas en la presente se refieren al uso de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación de un virus. Otras realizaciones más descritas en la presente se refieren a uno o más compuestos descritos en la presente (por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo), o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos descritos en la presente, o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, que puede usarse para inhibir la replicación de un virus.

60 60 En algunas realizaciones, la infección viral puede ser una infección viral por hepatitis B. Los métodos pueden incluir administrar a un sujeto al que se ha identificado que padece VHB una cantidad eficaz de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

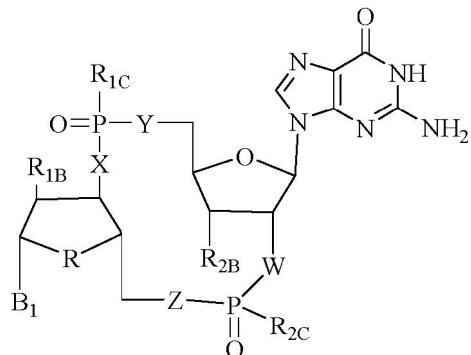
65 Otras realizaciones divulgadas en la presente se refieren a un método para mejorar y/o tratar una infección viral que puede incluir poner en contacto una célula infectada con el VHB con una cantidad eficaz de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición

farmacéutica que incluye uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Otras realizaciones más descritas en la presente se refieren al uso de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la fabricación de un medicamento para mejorar y/o tratar el VHB.

5 Otras realizaciones más descritas en la presente se refieren a uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, que puede usarse para mejorar y/o tratar el VHB. Algunas realizaciones divulgadas en la presente se refieren a un método para inhibir la 10 replicación del VHB que puede incluir poner en contacto una célula infectada con el virus con una cantidad eficaz de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15 Otras realizaciones divulgadas en la presente se refieren al uso de uno o más compuestos de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación del VHB. Otras realizaciones más descritas en la presente se refieren a uno o más compuestos de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, que pueden usarse 20 para inhibir la replicación del VHB.

También se divulga un compuesto de Fórmula (I)



Formula (I)

40 en donde

R es CH<sub>2</sub> u O;

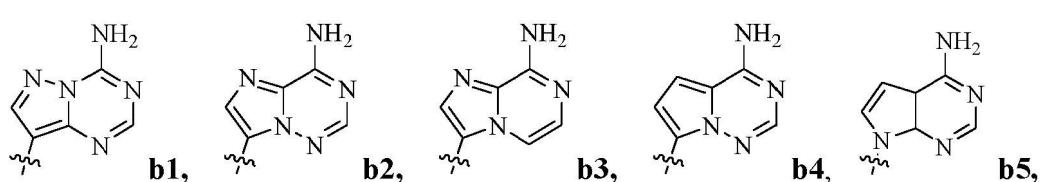
R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;

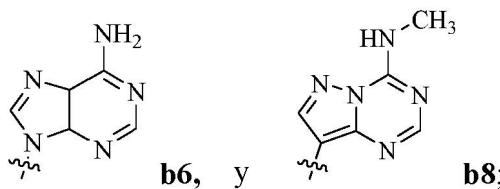
45 R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;

R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;

50 R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;

B<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste de los anillos b1, b2, b3, b4, b5, b6, y b8





10 W es -O- o -NH-;

X es -O- o -NH-;

Y es -CH<sub>2</sub>-, -O- o -NH-;

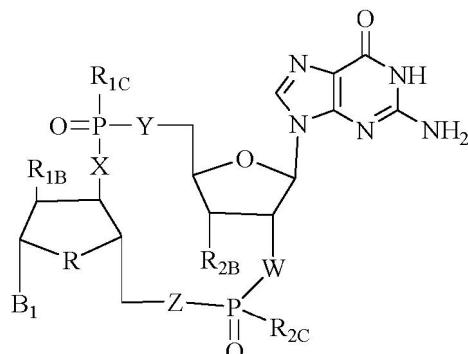
15 Z es -CH<sub>2</sub>-, -O- o -NH-;

de tal manera que solo uno de X e Y es NH, y solo uno de W y Z es NH, en cualquier caso;

20 y de tal manera que cuando R es CH<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> es **b6**, entonces R<sub>2B</sub> es distinto de fluoro o hidroxi;

25 además, siempre que un compuesto de Fórmula (I) sea distinto de un compuesto en el que R, W, X, Y y Z son cada uno O; R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi; B<sub>1</sub> es **b1**; y R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi; o un enantiómero, diastereómero o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 También se divulga un compuesto de Fórmula (I)



en donde

45 R es CH<sub>2</sub> u O;

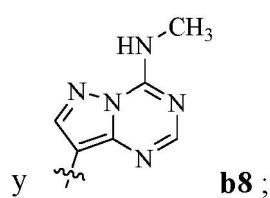
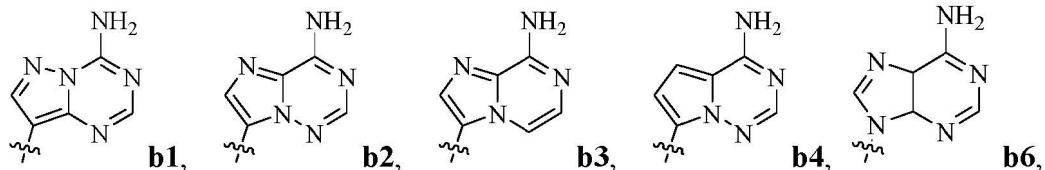
R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;

R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub>-;

R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;

R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub>-;

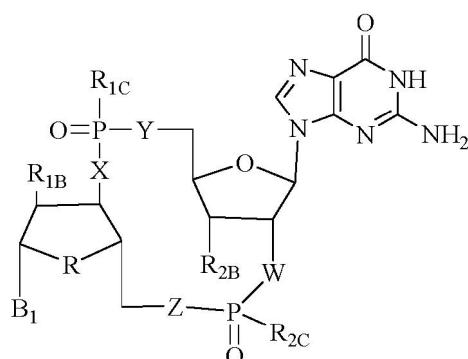
50 B<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste de los anillos **b1**, **b2**, **b3**, **b6**, y **b8**

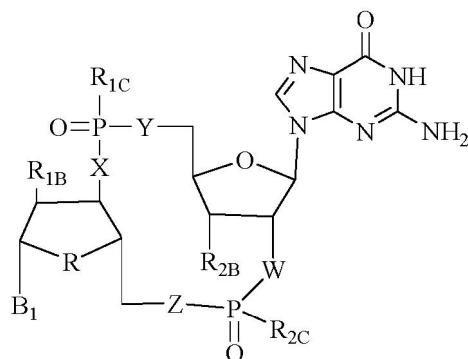


W es -O-;  
 X es -O- o -NH-;  
 Y es -CH<sub>2</sub>-; -O- o -NH-;  
 Z es -CH<sub>2</sub>-; -O- o -NH-;

5 de tal manera que solo uno de X e Y es NH en cualquier caso;  
 y de tal manera que cuando R es CH<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> es **b6**, entonces R<sub>2B</sub> es distinto de fluoro o hidroxi;  
 además, siempre que un compuesto de Fórmula (I) sea distinto de un compuesto en el que R, W, X, Y y Z son  
 cada uno O; R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi; B<sub>1</sub> es **b1**; y R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi;  
 o un enantiómero, diastereómero o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 También se divulga un compuesto de Fórmula (I)





en donde

20 R es CH<sub>2</sub> u O;

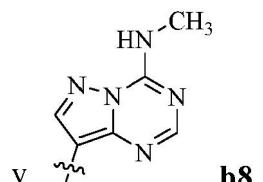
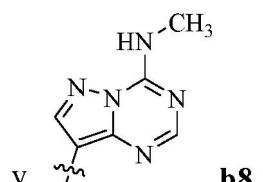
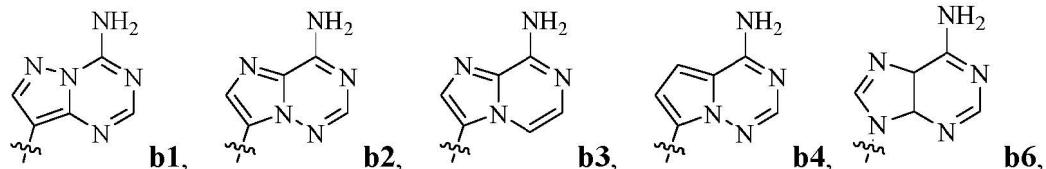
R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;

R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;

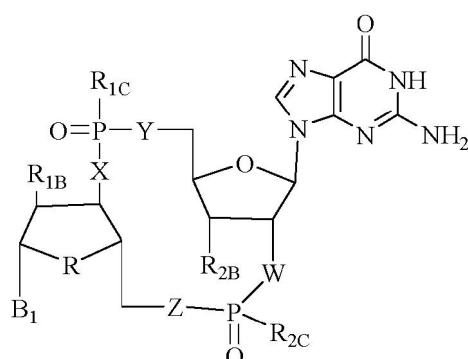
R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;

R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;

B<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste de los anillos b1, b2, b3, b4, b6, y b8



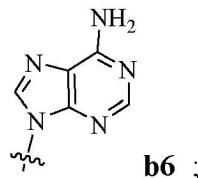
También se divulga un compuesto de Fórmula (I)



en donde

- 5 R es CH<sub>2</sub> u O;  
 R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;  
 R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3-</sub>;  
 R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;  
 R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3-</sub>;  
 B<sub>1</sub> es **b6**

10



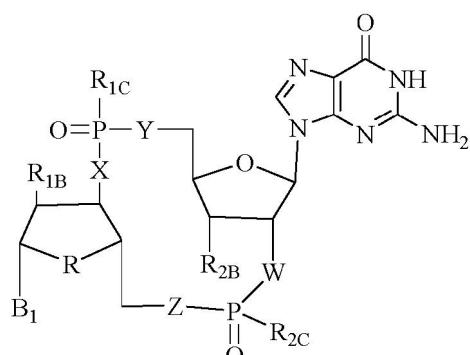
15

- 20 W es -NH-;  
 X es -O- o -NH-;  
 Y es -CH<sub>2</sub>-, -O- o -NH-;  
 Z es -CH<sub>2</sub>-, -O- o -NH-;  
 de tal manera que solo uno de X e Y es NH en cualquier caso;  
 y de tal manera que cuando R es CH<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> es **b6**, entonces R<sub>2B</sub> es distinto de fluoro o hidroxi;  
 o un enantiómero, diastereómero o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25

También se divulga un compuesto de Fórmula (I)

30



35

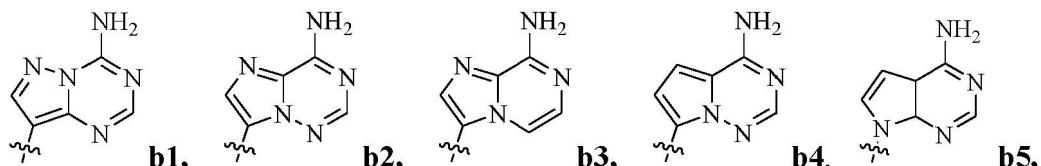
40

Formula (I)

en donde

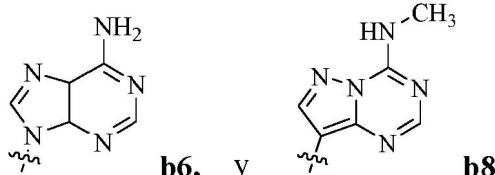
- 45 R es CH<sub>2</sub> u O;  
 R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;  
 R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3-</sub>;  
 R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;  
 R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3-</sub>;  
 B<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste de los anillos **b1**, **b2**, **b3**, **b5**, **b6**, y **b8**

55



60

65



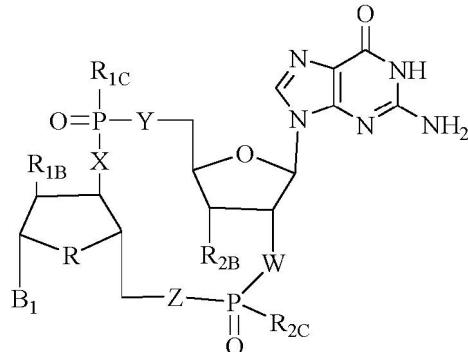
W es -O- o -NH-;

X es -O- o -NH-;

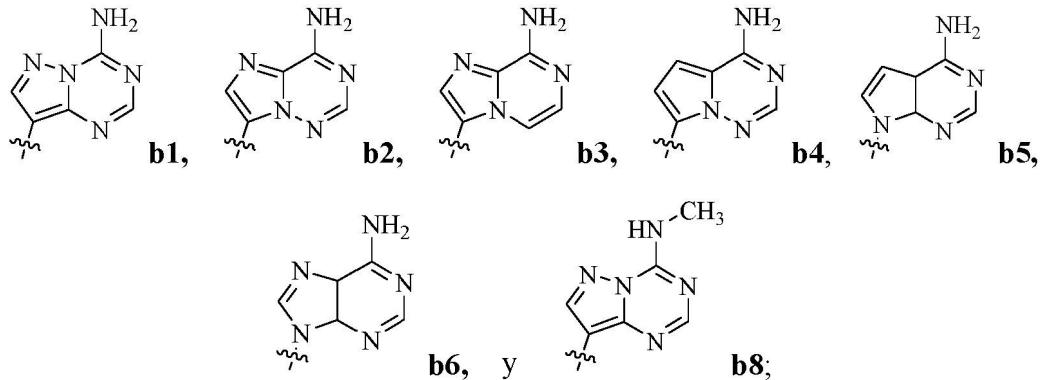
Y es -CH<sub>2</sub>- , -O- o -NH-;Z es -CH<sub>2</sub>- , -O- o -NH-;

5 de tal manera que solo uno de X e Y es NH, y solo uno de W y Z es NH, en cualquier caso; y de tal manera que cuando B<sub>1</sub> es **b6**, entonces R<sub>2B</sub> es distinto de fluoro o hidroxi; o un enantiómero, diastereómero o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 También se divulga un compuesto de Fórmula (I)



en donde

R es CH<sub>2</sub>;R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub>-;R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub>-;B<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste de los anillos **b1**, **b2**, **b3**, **b4**, **b5**, **b6**, y **b8**

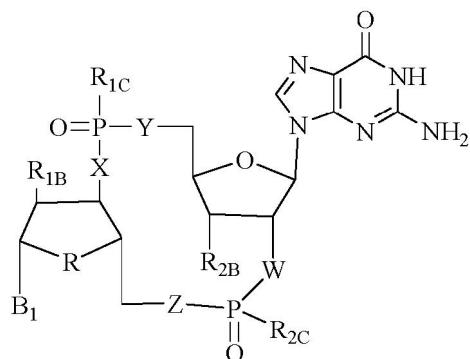
W es -O-;

X es -O-;

Y es -CH<sub>2</sub>- o -O-;Z es -CH<sub>2</sub>- o -O-;

55 de tal manera que cuando B<sub>1</sub> es **b6**, entonces R<sub>2B</sub> es distinto de fluoro o hidroxi; o un enantiómero, diastereómero o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

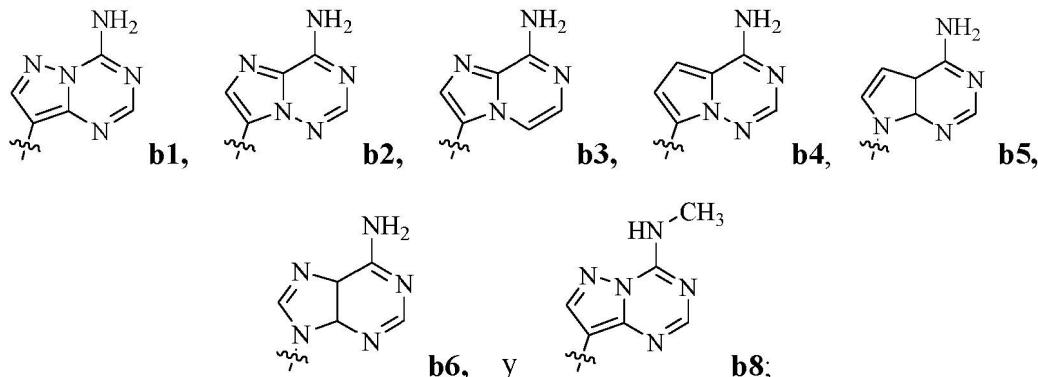
60 También se divulga un compuesto de Fórmula (I)



Formula (I)

en donde

R es O;

R<sub>1B</sub> es hidrógeno, hidroxi o fluoro;R<sub>1C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;R<sub>2B</sub> es hidrógeno, hidroxi, metoxi o fluoro;R<sub>2C</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidroxi, tiol y BH<sub>3</sub><sup>-</sup>;B<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste de los anillos b1, b2, b3, b4, b5, b6, y b8

W es -O- o -NH-;

X es -O- o -NH-;

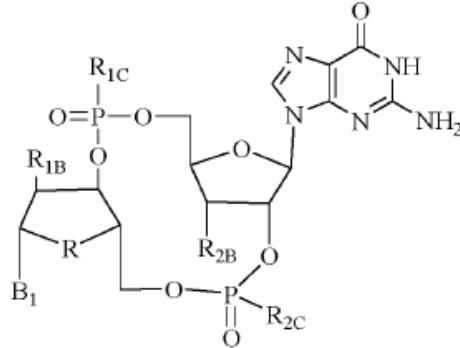
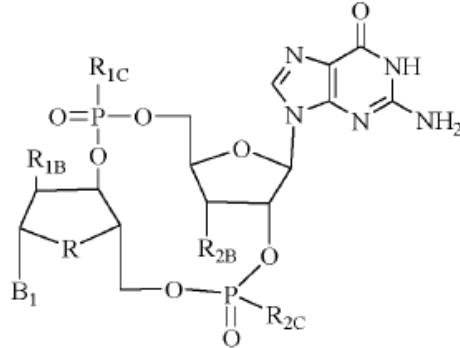
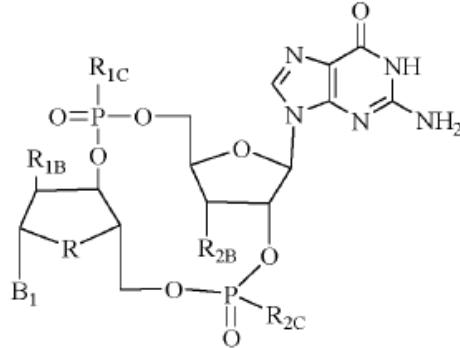
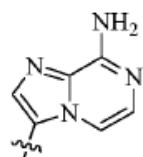
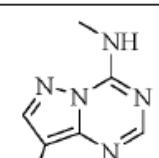
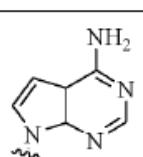
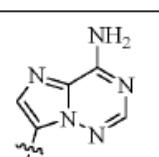
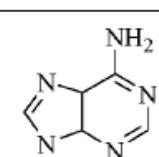
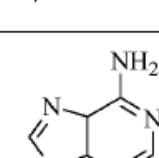
Y es -CH<sub>2</sub>- , -O- o -NH-;Z es -CH<sub>2</sub>- , -O- o -NH-;

de tal manera que solo uno de X e Y es NH, y solo uno de W y Z es NH, en cualquier caso;

además, siempre que un compuesto de Fórmula (I) sea distinto de un compuesto en donde R, W, X, Y y Z son cada uno O; R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi; B<sub>1</sub> es b1; y R<sub>1B</sub> y R<sub>2B</sub> son cada uno hidroxi; o un enantiómero, diastereómero o forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación incluyen un compuesto de Fórmula (Ia), en donde W, X, Y y Z son cada uno O, como se define en la presente, o un enantiómero, diastereómero, solvato o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el los sustituyentes seleccionados de una o más de las variables definidas en la presente (por ejemplo, R, R<sub>1B</sub>, R<sub>1C</sub>, R<sub>2B</sub>, R<sub>2C</sub> y B<sub>1</sub>) se seleccionan independientemente para ser cualquier sustituyente individual o cualquier subconjunto de sustituyentes de los ejemplificados en la lista en la Tabla 1, a continuación en la que el compuesto 2 es un compuesto de la invención. Los compuestos 1 y 3-13 no son compuestos de la invención

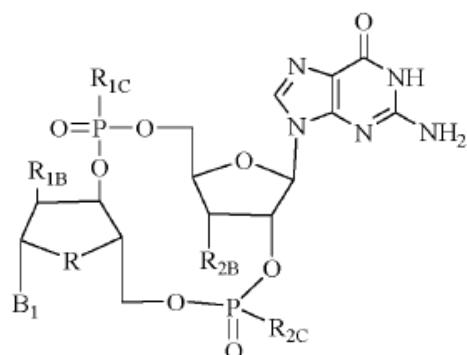
Tabla 1

5							
10							
15							
20	<p style="text-align: center;"><u>Formula (Ia)</u></p>						
25	Comp. Nº	R	R <sub>1B</sub>	R <sub>1C</sub>	R <sub>2C</sub>	R <sub>2B</sub>	B <sub>1</sub>
30	1	-O-	OH	OH	OH	OH	 b3
35	2	-O-	OH	OH	OH	OH	 b8
40	3	-CH <sub>2</sub> -	OH	OH	OH	OH	 b5
45	4	-O-	OH	OH	OH	OH	 b2
50	5	-CH <sub>2</sub> -	OH	( <sup>*</sup> R) SH	( <sup>*</sup> R) SH	OCH <sub>3</sub>	 b6
55	6	-CH <sub>2</sub>	OH	( <sup>*</sup> S) SH	( <sup>*</sup> R) SH	OCH <sub>3</sub>	 b6
60							

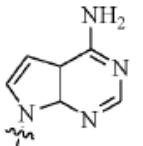
(continuación)

5						
10	<u>Formula (Ia)</u>					
Comp. №	R	R <sub>1B</sub>	R <sub>1C</sub>	R <sub>2C</sub>	R <sub>2B</sub>	B <sub>1</sub>
20	7	-CH <sub>2</sub> -	OH	( <sup>*</sup> S) SH	( <sup>*</sup> S) SH	OCH <sub>3</sub>
25	8	-CH <sub>2</sub> -	OH	( <sup>*</sup> R) SH	( <sup>*</sup> S) SH	OCH <sub>3</sub>
30	9	-CH <sub>2</sub> -	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
35	10	-CH <sub>2</sub> -	OH	( <sup>*</sup> S) SH	( <sup>*</sup> S) SH	OCH <sub>3</sub>
40	11	-CH <sub>2</sub> -	OH	( <sup>*</sup> S) SH	( <sup>*</sup> R) SH	OCH <sub>3</sub>
45	12	-CH <sub>2</sub> -	OH	( <sup>*</sup> R) SH	( <sup>*</sup> S) SH	OCH <sub>3</sub>
50						
55						
60						

(continuación)

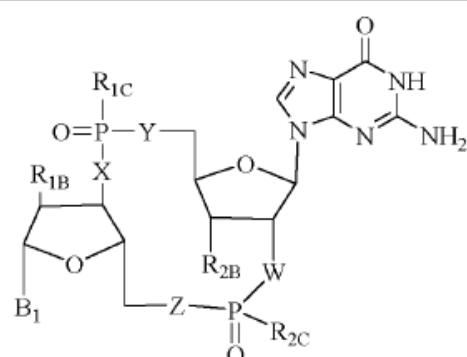


Formula (Ia)

Comp. Nº	R	R <sub>1B</sub>	R <sub>1C</sub>	R <sub>2C</sub>	R <sub>2B</sub>	B <sub>1</sub>
13	-CH <sub>2</sub> -	OH	( <sup>*</sup> R) SH	( <sup>*</sup> R) SH	OCH <sub>3</sub>	 b5

También se divulga un compuesto de Fórmula (Ib), en donde R es O, como se define en la presente, o un enantiómero, diastereómero, solvato o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde los sustituyentes seleccionados de una o más de las variables definidas en la presente (por ejemplo, R<sub>1B</sub>, R<sub>1C</sub>, R<sub>2B</sub>, R<sub>2C</sub>, W, X, Y, Z y B<sub>1</sub>) se seleccionan independientemente para que sean cualquier sustituyente individual o cualquier subconjunto de sustituyentes de los exemplificados en la lista de la Tabla 2, a continuación. Los compuestos 14-33 no son compuestos de la invención.

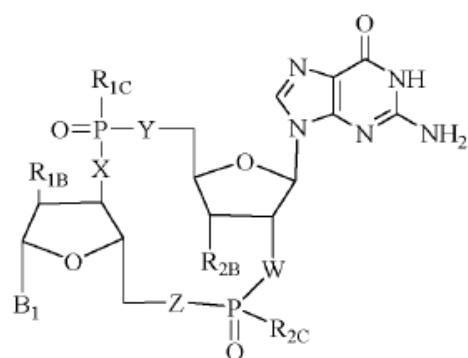
Tabla 2



Formula (Ib)

Comp. Nº	R <sub>1B</sub>	R <sub>1C</sub>	W	X	Y	Z	R <sub>2B</sub>	R <sub>2C</sub>	B <sub>1</sub>
14	F	OH	-O-	-O-	-O-	CH <sub>2</sub>	OH	OH	b6
15	OH	OH	-O-	-O-	-O-	CH <sub>2</sub>	F	OH	b6
16	OH	-O-	-O-	-O-	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	OH	OH	b6
17	H	OH	-O-	NH	-O-	-O-	OH	OH	b6
18	F	OH	-O-	NH	-O-	-O-	OH	OH	b6
19	F	OH	-O-	-O-	NH	-O-	OH	OH	b6
20	OH	OH	-O-	NH	-O-	-O-	OH	OH	b6

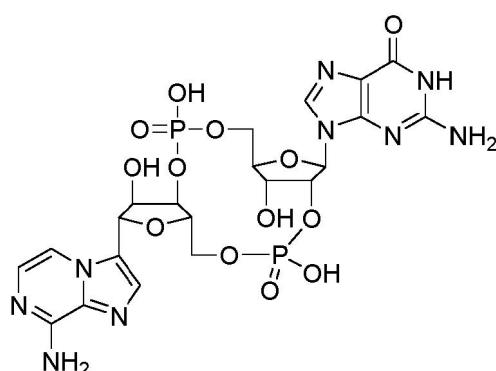
(continuación)



Formula (Ib)

Comp. N°	R <sub>1B</sub>	R <sub>1C</sub>	W	X	Y	Z	R <sub>2B</sub>	R <sub>2C</sub>	B <sub>1</sub>
21	OH	OH	-O-	-O-	-O-	NH	F	OH	b6
22	OH	OH	-O-	-O-	NH	NH	OH	OH	b6
23	F	OH	-O-	-O-	-O-	NH	F	OH	b6
24	OH	OH	-O-	-O-	NH	-O-	F	OH	b6
25	F	OH	-O-	-O-	-O-	NH	OCH <sub>3</sub>	OH	b6
26	F	OH	-O-	NH	-O-	-O-	OCH <sub>3</sub>	( <sup>*</sup> R)-SH	b6
27	F	OH	-O-	NH	-O-	-O-	OCH <sub>3</sub>	( <sup>*</sup> S)-SH	b6
28	F	( <sup>*</sup> R)-SH	-O-	NH	-O-	-O-	OCH <sub>3</sub>	( <sup>*</sup> R)-SH	b6
29	F	( <sup>*</sup> R)-SH	-O-	NH	-O-	-O-	OCH <sub>3</sub>	( <sup>*</sup> S)-SH	b6
30	F	( <sup>*</sup> S)-SH	-O-	NH	-O-	-O-	OCH <sub>3</sub>	( <sup>*</sup> S)-SH	b6
31	F	( <sup>*</sup> S)-SH	-O-	NH	-O-	-O-	OCH <sub>3</sub>	( <sup>*</sup> R)-SH	b6
32	F	( <sup>*</sup> RS)-SH	-O-	-O-	-O-	-CH <sub>2</sub> -	OCH <sub>3</sub>	OH	b6
33	F	OH	-NH-	-O-	-O-	-O-	OCH <sub>3</sub>	OH	b6

También se divulga un compuesto de Fórmula (I), seleccionado de los compuestos 1 a 33,

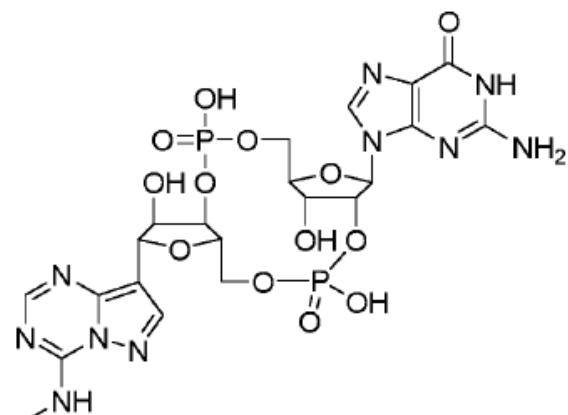


1,

60

65

5



15

20

25

30

35

40

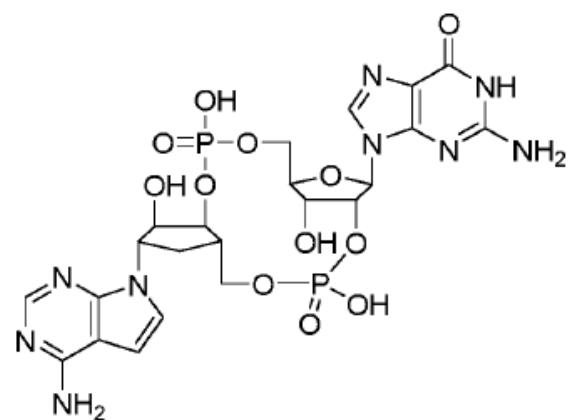
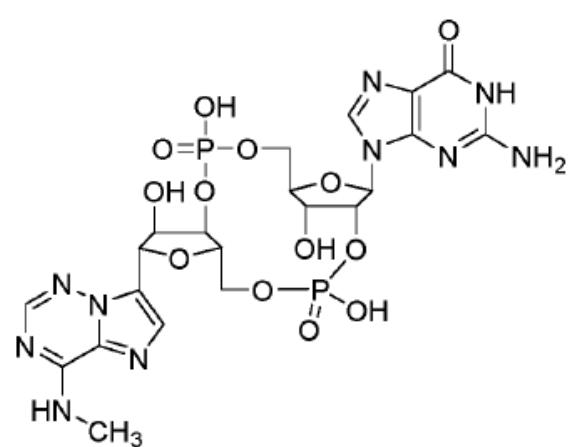
45

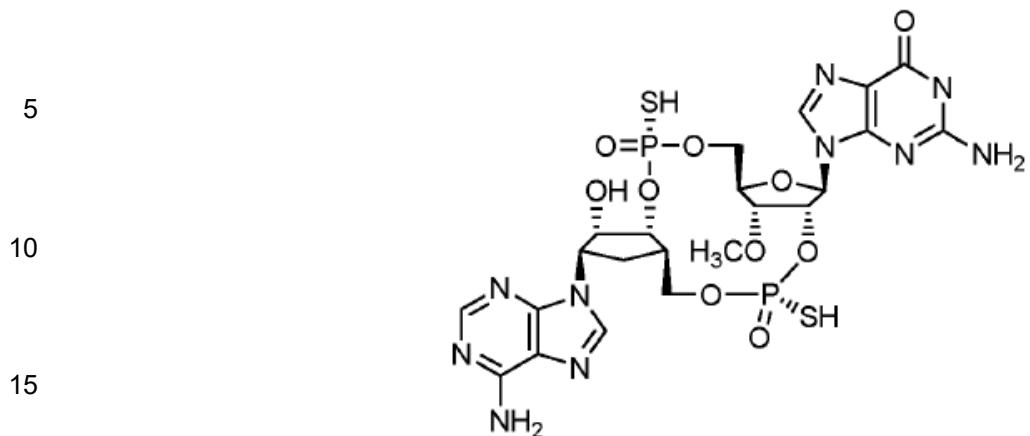
50

55

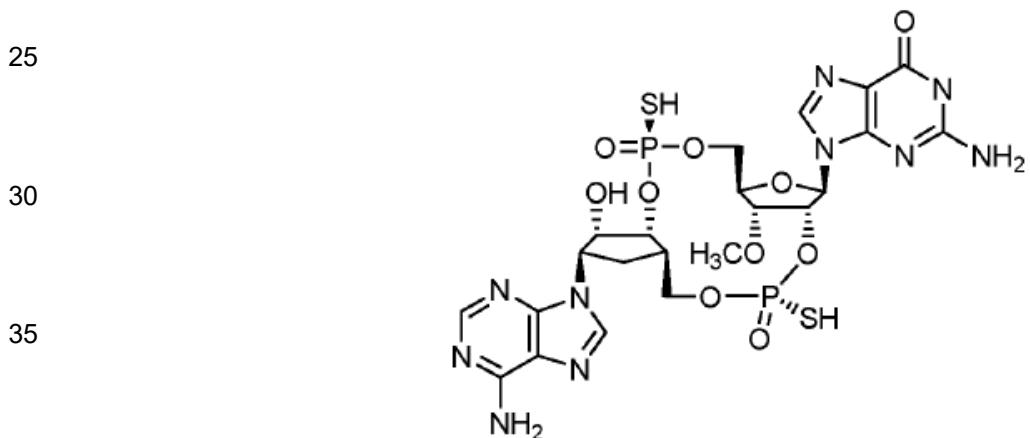
60

65

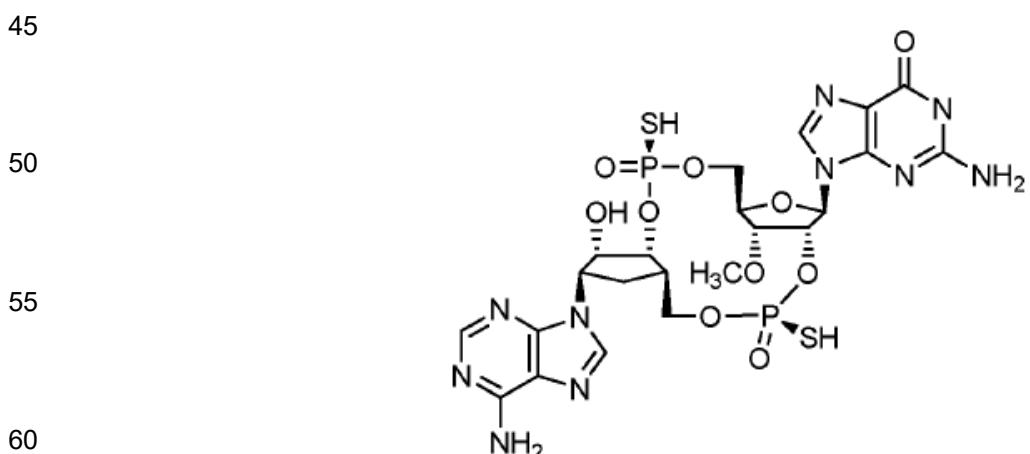
**2,****3,****4,**



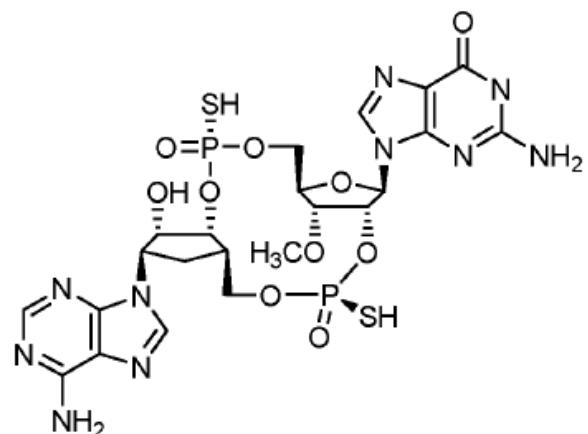
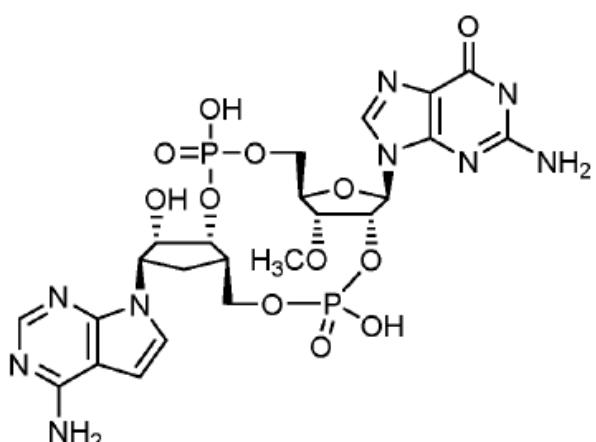
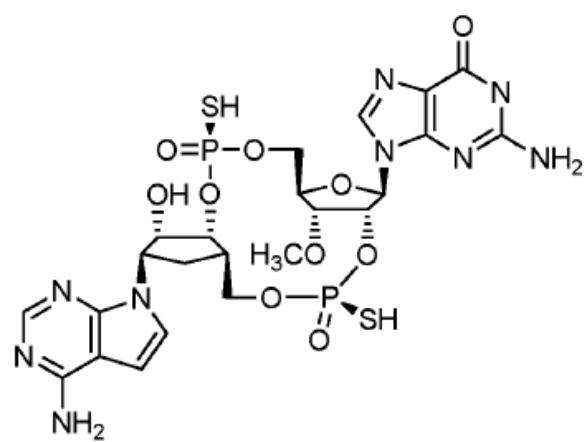
5,



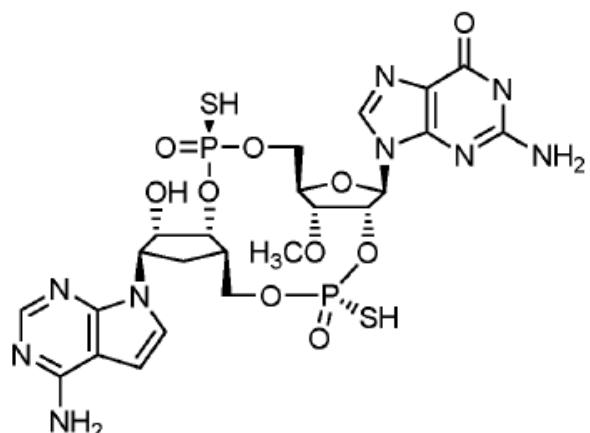
6,



7,

**8,****9,****10,**

5



10

15

20

**11,**

25

30

35

40

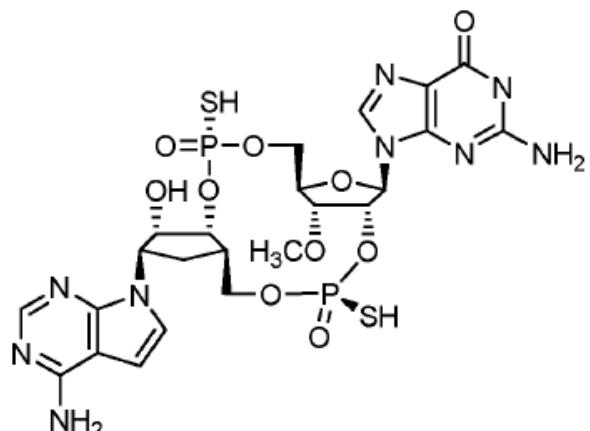
**12,**

45

50

55

60

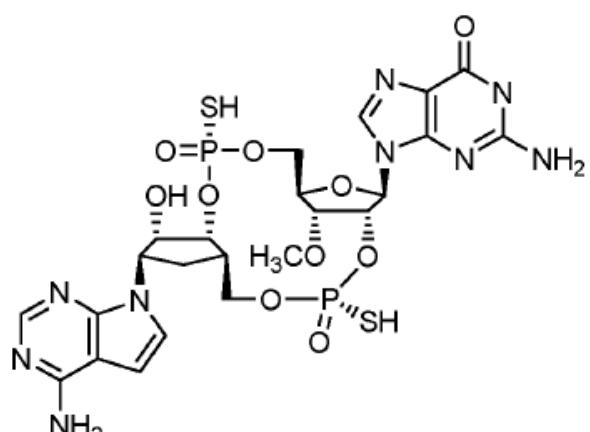
**12,**

45

50

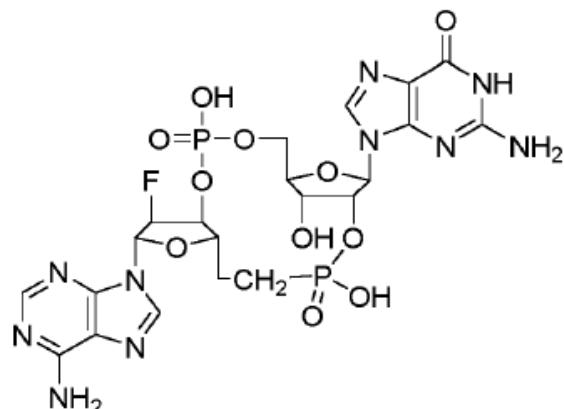
55

60

**13**

65

5



10

15

**14,**

20

25

30

35

40

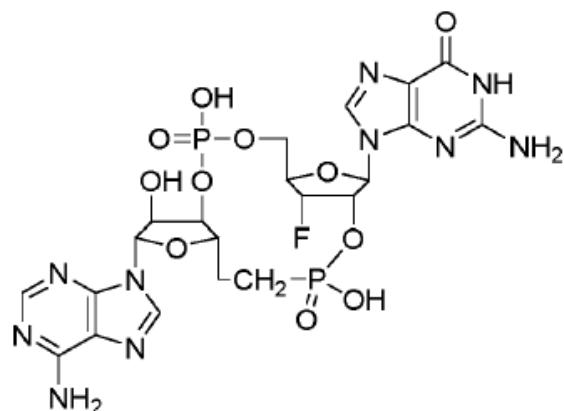
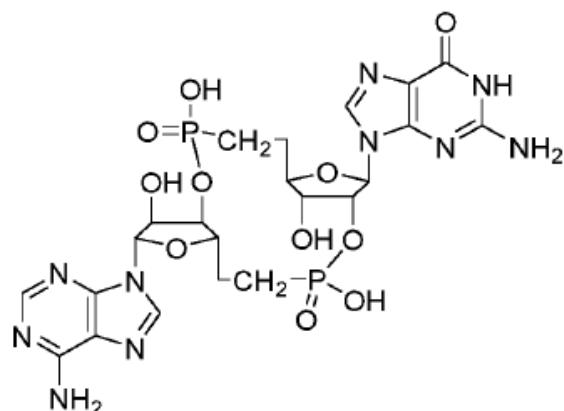
45

50

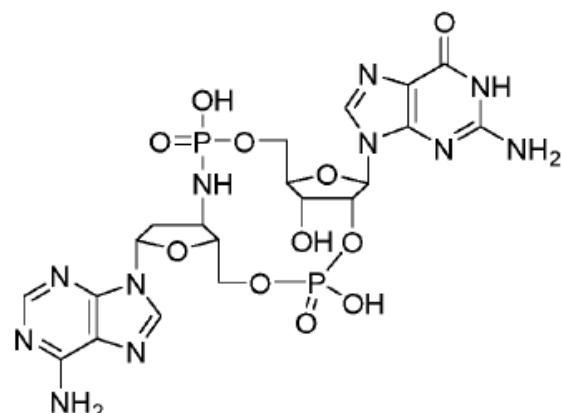
55

60

65

**15,****16,**

5



10

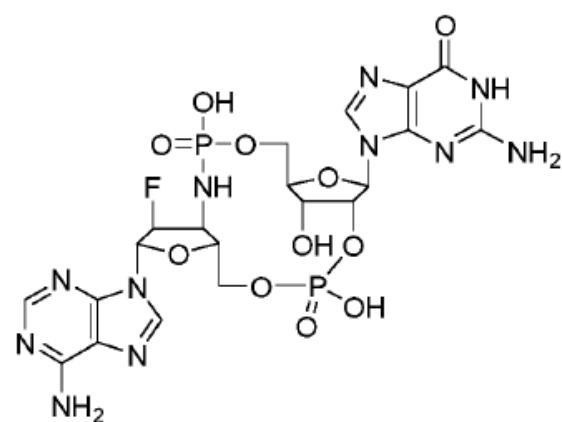
15

20

25

30

35

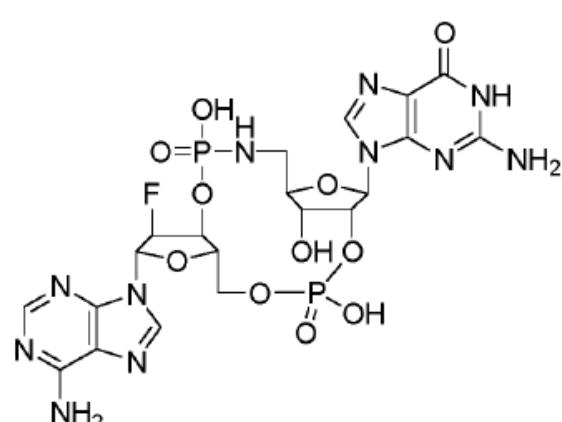
**17,**

40

45

50

55

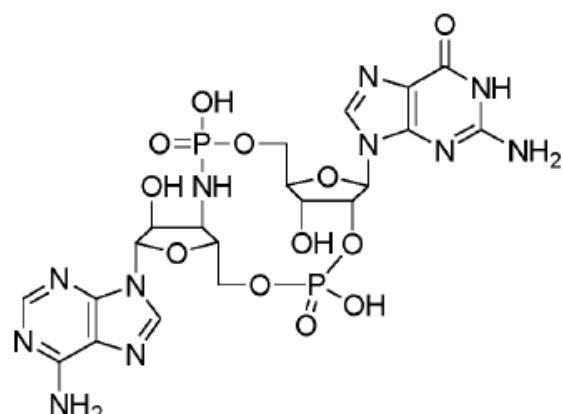
**18,**

60

65

**19,**

5

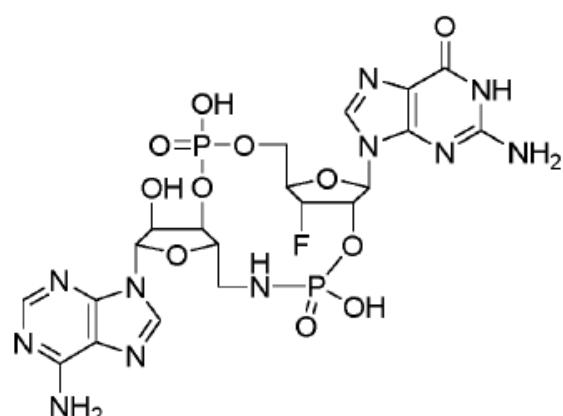


15

**20,**

20

25

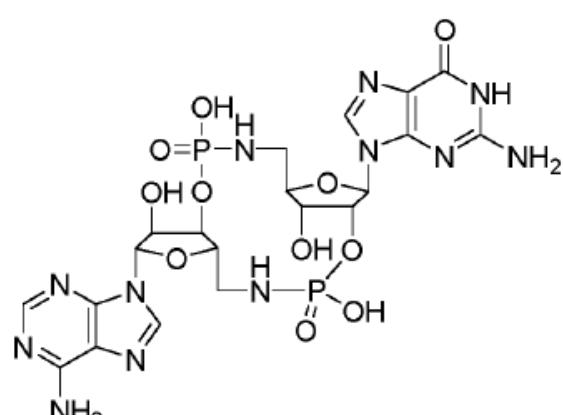


35

**21,**

40

45



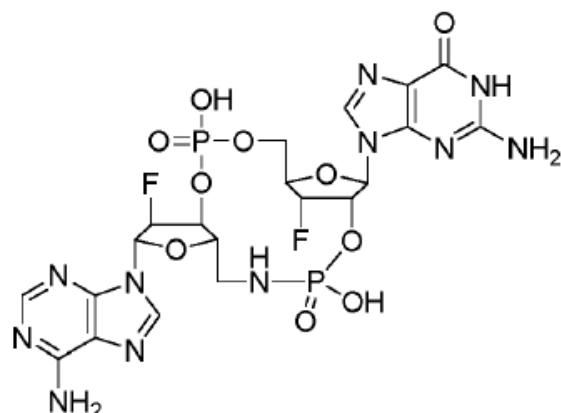
55

**22,**

60

65

5



15

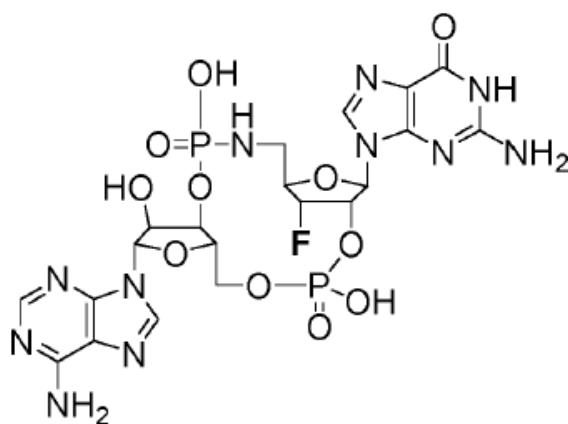
20

25

30

35

40

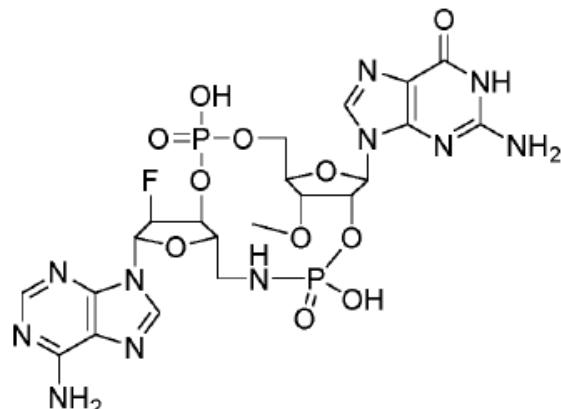
**23,**

45

50

55

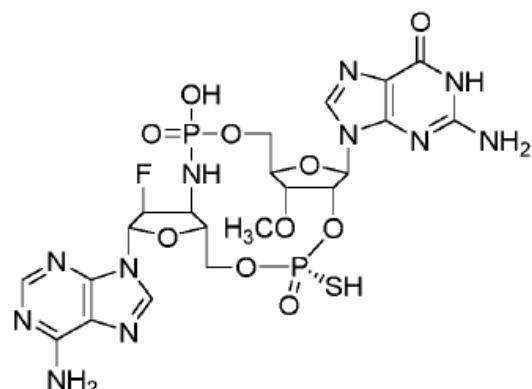
60

**24,**

65

**25,**

5



10

15

20

25

30

35

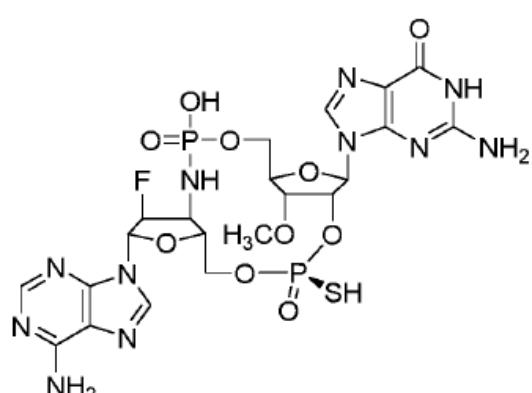
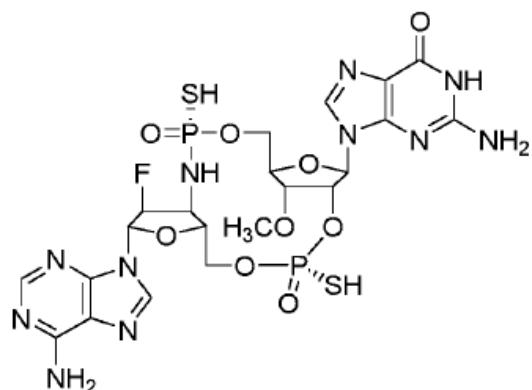
40

45

50

55

60

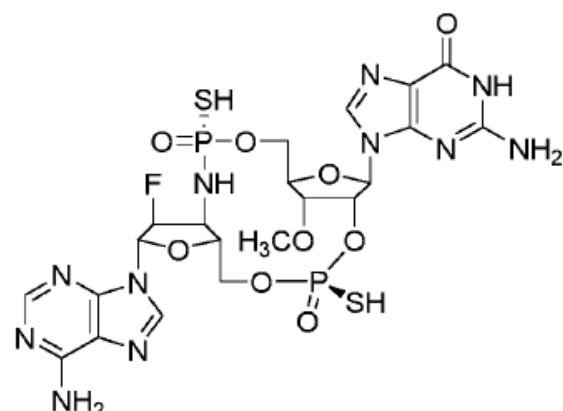
**26,****27,**

65

**28,**

28

5



10

15

20

**29,**

25

30

35

40

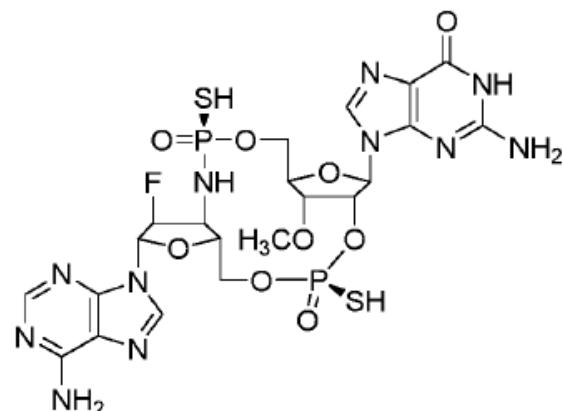
**30,**

45

50

55

60



65

**31,**

5

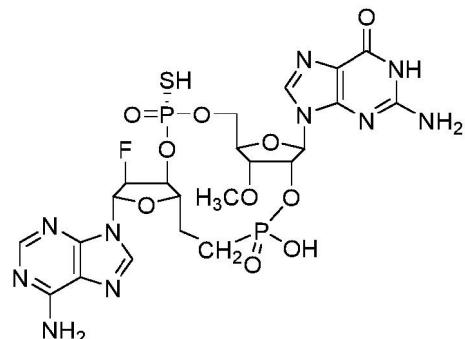
10

15

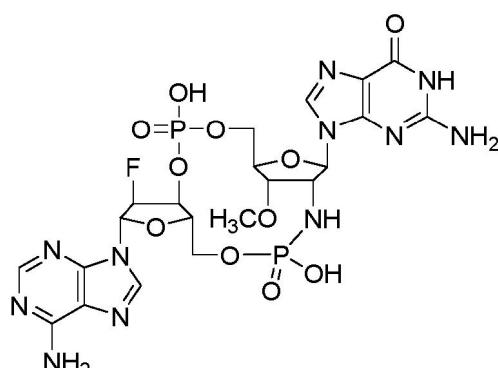
20

25

30



32, y



33;

35 o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Para uso en medicina, las sales de compuestos de Fórmula (I), como el compuesto 2 de la invención, se refieren a "sales farmacéuticamente aceptables" no tóxicas. Sin embargo, otras sales pueden ser útiles en la preparación de compuestos de Fórmula (I) o de sus formas de sal farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de compuestos de Fórmula (I) incluyen sales de adición de ácido que pueden, por ejemplo, formarse mezclando una solución del compuesto con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Además, cuando los compuestos de Fórmula (I) portan una fracción ácida, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los mismos pueden incluir sales de metales alcalinos como sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos como sales de calcio o magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados como sales de amonio cuaternario. Por tanto, las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isotonato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, sal de N-metilglucamina amonio, oleato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, sulfato, subacetato, succinato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato, trietioduro y valerato.

55 Los ácidos y bases representativos que pueden usarse en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos que incluyen ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, aminoácidos acilados, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido L-aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido (+)-canfórico, ácido canforsulfónico, ácido (+)-(1S)-alcanfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucorónico, ácido L-glutámico, ácido  $\alpha$ -oxo-glutárico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido (+)-L-láctico, ácido ( $\pm$ )-DL-láctico, ácido lactobiónico, ácido maleico, ácido (-)-L-málico, ácido malónico, ácido ( $\pm$ )-DL-mandélico, ácido metanosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido

nicotínico, ácido nítrico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico, ácido L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido 4-amino-salicílico, ácido sebaico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tánico, ácido (+)-L-tartárico, ácido tiociánico, ácido p-toluenosulfónico y ácido undecilénico; y bases que incluyen amoníaco, L-arginina, benetamina, benzatina, hidróxido de calcio, colina, deanol, dietanolamina, dietilamina, 2-(dietilamino)-etanol, etanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, L-lisina, hidróxido de magnesio, 4-(2-hidroxietil)-morfolina, piperazina, hidróxido de potasio, 1-(2-hidroxietil)-pirrolidina, hidróxido de sodio, trietanolamina, trometamina e hidróxido de zinc.

También se divultan profármacos de compuestos de Fórmula (I). En general, tales profármacos serán derivados funcionales de los compuestos que son fácilmente convertibles *in vivo* en el compuesto requerido. Por tanto, en los métodos de tratamiento o prevención de la presente divulgación, el término "administrar" abarca el tratamiento o la prevención de varias enfermedades, afecciones, síndromes y trastornos descritos con el compuesto divulgado específicamente o con un compuesto que puede no estar específicamente divulgado, pero que se convierte en el compuesto especificado *in vivo* después de la administración a un paciente. Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados de profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Cuando los compuestos de acuerdo con esta divulgación tienen por lo menos un centro quiral, en consecuencia pueden existir como enantiómeros. Cuando los compuestos poseen dos o más centros quirales, pueden existir adicionalmente como diastereoisómeros. Debe entenderse que todos estos isómeros y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance de la presente invención. Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos pueden existir como polimorfos y, como tal, se pretende que se incluyan en la presente divulgación. Además, algunos de los compuestos pueden formar solvatos con agua (es decir, hidratos) o solventes orgánicos comunes, y también se pretende que tales solvatos estén incluidos dentro del alcance de esta divulgación. El experto en la técnica entenderá que el término compuesto, como se usa en la presente, incluye compuestos solvatados de Fórmula (I).

Cuando los procesos para la preparación de los compuestos de acuerdo con la divulgación dan lugar a una mezcla de estereoisómeros, estos isómeros pueden separarse mediante técnicas convencionales como cromatografía preparativa. Los compuestos pueden prepararse en forma racémica, o los enantiómeros individuales pueden prepararse mediante síntesis enantioespecífica o mediante resolución. Los compuestos pueden, por ejemplo, resolverse en sus enantiómeros componentes mediante técnicas estándar como la formación de pares diastereoisómeros mediante la formación de sales con un ácido ópticamente activo como el ácido (-)-di-p-toluol-d-tartárico y/o el ácido (+)-di-p-toluol-1-tartárico seguido de cristalización fraccionada y regeneración de la base libre. Los compuestos también pueden resolverse mediante la formación de ésteres diastereoméricos o amidas, seguido de separación cromatográfica y eliminación del auxiliar quiral. Alternativamente, los compuestos pueden resolverse usando una columna de HPLC quiral.

La presente divulgación está dirigida a una composición, incluyendo una composición farmacéutica, que comprende, consiste de y/o consiste esencialmente del enantiómero (+) de un compuesto de Fórmula (I) en donde dicha composición está sustancialmente libre del isómero (-) de dicho compuesto. En el presente contexto, sustancialmente libre significa menos de aproximadamente el 25%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 2% e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% del isómero (-) calculado como

$$\% (+) - \text{enantiómero} = \frac{(\text{masa} (+) - \text{enantiómero})}{(\text{masa} (+) - \text{enantiómero}) + (\text{masa} (-) - \text{enantiómero})} \times 100$$

La presente divulgación proporciona una composición, incluyendo una composición farmacéutica, que comprende, consiste de y consiste esencialmente del enantiómero (-) de un compuesto de Fórmula (I) en donde dicha composición está sustancialmente libre del isómero (+) de dicho compuesto. En el presente contexto, sustancialmente libre significa menos de aproximadamente el 25%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 2% e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% del isómero (+) calculado como

$$\% (-) - \text{enantiómero} = \frac{(\text{masa} (-) - \text{enantiómero})}{(\text{masa} (+) - \text{enantiómero}) + (\text{masa} (-) - \text{enantiómero})} \times 100$$

Durante cualquiera de los procesos para la preparación de los compuestos de la presente divulgación, puede ser necesario y/o deseable proteger los grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas implicadas. Esto puede lograrse por medio de grupos protectores convencionales como los descritos en Protective

Groups in Organic Chemistry, Segunda Edición, J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1991; y T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Tercera Edición, John Wiley & Sons, 1999. Los grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior conveniente usando métodos conocidos en la técnica.

- 5 Incluso aunque los compuestos de la presente divulgación (incluyendo sus sales farmacéuticamente aceptables y solvatos farmacéuticamente aceptables) pueden administrarse solos, generalmente se administrarán mezclados con un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable seleccionados con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica o veterinaria estándar. Por tanto, aspectos particulares de la presente divulgación están dirigidos a composiciones farmacéuticas y veterinarias que comprenden compuestos de Fórmula (I) y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 15 A modo de ejemplo, en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, los compuestos de Fórmula (I) pueden mezclarse con cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante y combinaciones de los mismos adecuado.
- 20 25 Las formas de dosificación orales sólidas como comprimidos o cápsulas que contienen los compuestos de la presente invención pueden administrarse en por lo menos una forma de dosificación a la vez, según sea apropiado. También es posible administrar los compuestos en formulaciones de liberación sostenida.
- 30 35 Las formas orales adicionales en las que pueden administrarse los presentes compuestos inventivos incluyen elixires, soluciones, jarabes y suspensiones; cada uno de los cuales conteniendo opcionalmente agentes aromatizantes y colorantes.
- 40 45 Alternativamente, los compuestos de Fórmula (I) pueden administrarse por inhalación (inatraqueal o intranasal) o en forma de supositorio o pesario, o pueden aplicarse tópicamente en forma de loción, solución, crema, pomada o polvo para espolvorear. Por ejemplo, pueden incorporarse en una crema que comprende, consiste y/o consiste esencialmente de una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. También pueden incorporarse, a una concentración de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% en peso de la crema, en una pomada que comprende, consiste y/o consiste esencialmente de una base de cera o parafina blanda junto con cualquier estabilizante y conservantes según se requiera. Un medio alternativo de administración incluye la administración transdérmica usando un parche para la piel o transdérmico.
- 50 55 60 65 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación (así como los compuestos de la presente divulgación solos) también pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica o intratecal. En este caso, las composiciones también incluirán por lo menos uno de un portador adecuado, un excipiente adecuado y un diluyente adecuado.
- Para la administración parenteral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales y monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre.
- Además de las vías de administración descritas anteriormente para el tratamiento del cáncer, las composiciones farmacéuticas pueden adaptarse para la administración mediante inyección intratumoral o peritumoral. La activación del sistema inmunitario de esta manera para matar tumores en un sitio remoto se conoce comúnmente como efecto abscopal y se ha demostrado en animales con múltiples modalidades terapéuticas (van der Jeught, et al., Oncotarget, 2015, 6(3), 1359-1381). Una ventaja adicional de la administración local, intratumoral o peritumoral es la capacidad de lograr una eficacia equivalente a dosis mucho más bajas, minimizando o eliminando por tanto los eventos adversos que pueden observarse con dosis mucho más altas (Marabelle, A., et al., Clinical Cancer Research, 2014, 20(7), 1747-1756).
- Para la administración bucal o sublingual, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas para chupar, que pueden formularse de manera convencional.
- A modo de ejemplo adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen por lo menos uno de los compuestos de Fórmula (I) como ingrediente activo pueden prepararse mezclando el o los compuestos con un portador farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las técnicas convencionales de preparación de compuestos farmacéuticos. El portador, el excipiente y el diluyente pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la vía de administración deseada (por ejemplo, oral, parenteral, etc.). Así, para preparaciones orales líquidas como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones los portadores, excipientes y diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcohol, agentes aromatizantes, conservantes, estabilizantes, agentes colorantes y similares;

para preparaciones orales sólidas como polvos, cápsulas y comprimidos los portadores, excipientes y diluyentes adecuados incluyen almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Las preparaciones orales sólidas también pueden recubrirse opcionalmente con sustancias como azúcares, o recubrirse entéricamente para modular el sitio principal de absorción y disgregación. Para la administración parenteral, el portador, el excipiente y el diluyente habitualmente incluirán agua estéril, y pueden añadirse otros ingredientes para aumentar la solubilidad y la conservación de la composición. También pueden prepararse suspensiones o soluciones inyectables utilizando portadores acuosos junto con aditivos apropiados como solubilizantes y conservantes.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I) o una composición farmacéutica del mismo incluye un intervalo de dosificación de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 3000 mg, o cualquier cantidad particular o intervalo de la misma, en particular de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 1000 mg, o cualquier cantidad particular o intervalo de la misma, o, más particularmente, de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 250 mg, o cualquier cantidad particular o intervalo de la misma, de ingrediente activo en un régimen de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 veces al día para un humano medio (70 kg); aunque es evidente para un experto en la técnica que la cantidad terapéuticamente eficaz para un compuesto de Fórmula (I) variará según las enfermedades, síndromes, afecciones y trastornos que se estén tratando.

Para la administración oral, una composición farmacéutica se proporciona preferiblemente en forma de comprimidos que contienen aproximadamente 1,0, aproximadamente 10, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250 y aproximadamente 500 miligramos de un compuesto de Fórmula (I).

Ventajosamente, un compuesto de Fórmula (I) puede administrarse en una única dosis diaria, o la dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres y cuatro veces al día.

Las dosificaciones óptimas de un compuesto de Fórmula (I) a administrar pueden determinarse fácilmente y variarán con el compuesto particular usado, el modo de administración, la concentración de la preparación y el avance de la enfermedad, síndrome, afección o trastorno. Además, los factores asociados con el sujeto particular que se está tratando, incluyendo el sexo, la edad, el peso, la dieta y el momento de la administración del sujeto, darán como resultado la necesidad de ajustar la dosis para lograr un nivel terapéutico apropiado y el efecto terapéutico deseado. Las dosificaciones anteriores son, por tanto, ejemplares del caso medio. Puede haber, por supuesto, casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación más altos o más bajos.

Los compuestos de Fórmula (I) pueden administrarse en cualquiera de las composiciones y regímenes de dosificación anteriores o por medio de las composiciones y regímenes de dosificación establecidos en la técnica siempre que se requiera el uso de un compuesto de Fórmula (I) para un sujeto con necesidad de ello.

Como agonistas de la proteína STING, los compuestos de Fórmula (I) son útiles en métodos para tratar o prevenir una infección viral, enfermedad, síndrome, afección o trastorno en un sujeto, incluyendo un animal, un mamífero y un humano en el que el la infección viral, la enfermedad, el síndrome, la afección o el trastorno se ven afectados por la modulación, incluyendo el agonismo, de la proteína STING. Tales métodos comprenden, consisten y/o consisten esencialmente en administrar a un sujeto, incluyendo un animal, un mamífero y un humano, que necesita dicho tratamiento o prevención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, sal o solvato de Fórmula (I).

La presente divulgación se refiere a un compuesto de Fórmula (I), o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso en el tratamiento del cáncer y enfermedades y afecciones del cáncer, o una infección viral.

Los ejemplos de enfermedades y afecciones cancerosas para las que los compuestos de Fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables o solvatos de los mismos, pueden tener efectos antitumorales potencialmente beneficiosos incluyen, pero no se limitan a, cánceres de pulmón, hueso, páncreas, piel, cabeza, cuello, útero, ovarios, estómago, colon, mama, esófago, intestino delgado, intestino, sistema endocrino, glándula tiroides, glándula paratiroides, glándula suprarrenal, uretra, próstata, pene, testículos, uréter, vejiga, riñón o hígado; cáncer de recto; cáncer de la región anal; carcinomas de las trompas de Falopio, endometrio, cuello uterino, vagina, vulva, pelvis renal, célula renal; sarcoma de tejido blando; mixoma; rabdomioma; fibroma; lipoma; teratoma; colangiocarcinoma; hepatoblastoma; angiosarcoma; hemangioma; hepatoma; fibrosarcoma; condrosarcoma; mieloma; leucemia crónica o aguda; linfomas linfocíticos; linfoma primario del SNC; neoplasias del SNC; tumores del eje espinal; carcinomas de células escamosas; sarcoma sinovial; mesoteliomas pleurales malignos; glioma de tronco encefálico; adenoma pituitario; adenoma bronquial; hanlartoma condromatoso; inesotelioma; enfermedad de Hodgkin o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. Convenientemente, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o disminuir la gravedad de cánceres seleccionados del grupo que consiste de cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, enfermedad de Cowden, enfermedad de Lhermitte-Duclos, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, rhabdomiosarcoma, ependimoma,

5 meduloblastoma, cabeza y cuello, riñón, hígado, melanoma, ovario, páncreas, adenocarcinoma, adenocarcinoma ductal, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células acinares, glucagonoma, insulinoma, próstata, sarcoma, osteosarcoma, tumor de células gigantes del hueso, tiroides, leucemia linfoblástica de células T, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia neutrofílica crónica, leucemia linfoblástica aguda de células T, plasmocitoma, leucemia inmunoblástica de células grandes, leucemia de células del manto, mieloma múltiple, leucemia megacarioblástica, mieloma múltiple, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica, eritroleucemia, linfoma maligno, linfoma de hodgkin, linfoma no hodgkin, linfoma de células T linfoblásticas, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, neuroblastoma, cáncer de vejiga, cáncer urotelial, cáncer de vulva, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, 10 cáncer renal, mesotelioma, cáncer de esófago, cáncer de glándulas salivales, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer nasofaríngeo, cáncer bucal, cáncer de boca, GIST (tumor del estroma gastrointestinal) y cáncer testicular.

15 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno afectado por el agonismo de STING seleccionado del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y hepatitis B.

20 Los compuestos divulgados de Fórmula (I) pueden ser útiles en combinación con uno o más compuestos adicionales útiles para tratar la infección por VHB. Estos compuestos adicionales pueden comprender otros compuestos divulgados y/o compuestos que se sabe que tratan, previenen o reducen los síntomas o efectos de la infección por VHB. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la polimerasa del VHB, interferones, inhibidores de la entrada viral, inhibidores de la maduración viral, moduladores del ensamblaje de la cápside descritos en la bibliografía, inhibidores de la transcriptasa inversa, agentes inmunomoduladores, agonistas de TLR y otros agentes con mecanismos distintos o desconocidos que afectan el ciclo de vida del VHB o que afectan 25 a las consecuencias de la infección por VHB.

30 En ejemplos no limitativos, los compuestos divulgados pueden usarse en combinación con uno o más fármacos (o una sal del mismo) seleccionados del grupo que comprende:

35 Inhibidores de la transcriptasa inversa del VHB e inhibidores de la ADN y la ARN polimerasa incluyendo, pero no limitados a, lamivudina (3TC, Zeffix, Heptovir, Epivir y Epivir-VHB), entecavir (Baraclude, Entavir), adefovir dipivoxil (Hepsara, Preveon, bis- POM PMEA), tenofovir disoproxil fumarato (Viread, TDF o PMPA); interferones que incluyen, pero no se limitan a, interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón beta (IFN- $\beta$ ), interferón lambda (IFN- $\lambda$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ );  
35 inhibidores de la entrada viral;  
inhibidores de la maduración viral;  
moduladores de ensamblaje de la cápside como, pero no limitados a, BAY 41-4109;  
inhibidores de la transcriptasa inversa;  
agentes inmunomoduladores como agonistas de TLR; y  
40 agentes de mecanismos distintos o desconocidos, como, pero no limitados a, AT-61 ((E)-N-(1-cloro-3-oxo-1-fenil-3-(piperidin-1-il)prop-1-en-2-il)benzamida), AT-130 ((E)-N-(1-bromo-1-(2-metoxifenil)-3-oxo-3-(piperidin-1-il)prop-1- en-2-il)-4-nitrobenzamida), y análogos de los mismos.

45 En una realización, el agente terapéutico adicional es un interferón. El término "interferón" o "IFN" se refiere a cualquier miembro de la familia de proteínas específicas de especies altamente homólogas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular y modulan la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los interferones humanos se agrupan en tres clases: Tipo I, que incluye interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón-beta (IFN- $\beta$ ) e interferón-omega (IFN- $\omega$ ), Tipo II, que incluye interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), y Tipo III, que incluye interferón-lambda (IFN- $\lambda$ ). Las formas recombinantes de interferones que se han desarrollado y están comercialmente disponibles están abarcadas por el término "interferón" como se usa en la presente. Los subtipos de interferones, como los interferones mutados o modificados químicamente, también están abarcados por el término "interferón" como se usa en la presente. Los interferones químicamente modificados pueden incluir interferones pegilados e interferones glicosilados. Los ejemplos de interferones también incluyen, pero no se limitan a, interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-n1, interferón-beta-1a, interferón-beta-1b, interferón-lamda-1, interferón-lamda-2 e interferón-lamda-3. Los ejemplos de interferones pegilados incluyen interferón-alfa-2a pegilado e interferón alfa-2b pegilado.

55 Por consiguiente, en una realización, los compuestos de Fórmula (I) pueden administrarse en combinación con un interferón seleccionado del grupo que consiste de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón beta (IFN- $\beta$ ), interferón lambda (IFN- $\lambda$ ), e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). En una realización específica, el interferón es interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b o interferón-alfa-n1. En otra realización específica, el interferón-alfa-2a o interferón-alfa-2b está pegilado. En una realización preferida, el interferón-alfa-2a es interferón-alfa-2a pegilado (PEGASYS). En otra realización, el agente terapéutico adicional se selecciona de terapias inmunomoduladoras o inmunoestimuladoras, que incluyen agentes biológicos que pertenecen a la clase de interferón.

60 65 Además, el agente terapéutico adicional puede ser un agente que altera la función de otra u otras proteínas

virales esenciales o proteínas huésped requeridas para la replicación o persistencia del VHB.

En otra realización, el agente terapéutico adicional es un agente antiviral que bloquea la entrada o maduración viral o se dirige a la polimerasa del VHB como inhibidores de polimerasa nucleosídica o nucleotídica o no nucleos(t)ídica. En una realización adicional de la terapia de combinación, el inhibidor de la transcriptasa inversa o el inhibidor de la ADN o ARN polimerasa es zidovudina, didanosina, zalcitabina, ddA, estavudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina, entecavir, apricitabina, atevirapina, ribavirina, aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, valganciclovir, tenofovir, adefovir, PMPA, cidofovir, efavirenz, nevirapina, delavirdina o etravirina.

En una realización, el agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador que induce una respuesta inmunitaria natural limitada que lleva a la inducción de respuestas inmunitarias contra virus no relacionados. En otras palabras, el agente inmunomodulador puede efectuar la maduración de las células presentadoras de抗ígenos, la proliferación de células T y la liberación de citoquinas (por ejemplo, IL-12, IL-18, IFN-alfa, -beta y -gamma y TNF-alfa, entre otros).

En una realización adicional, el agente terapéutico adicional es un modulador de TLR o un agonista de TLR, como un agonista de TLR-7 o un agonista de TLR-9. En una realización adicional de la terapia de combinación, el agonista de TLR-7 se selecciona del grupo que consiste de SM360320 (9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxi-etoxy)adenina) y AZD 8848 ((3-({[3-(6-amino-2-butoxi-8-oxo-7,8-dihidro-9H-purin-9-il)propil][3-(4-morfolinil)propil]amino}metil)fenil)acetato de metilo).

En cualquiera de los métodos proporcionados en la presente, el método puede comprender además administrar al individuo por lo menos una vacuna contra el VHB, un inhibidor nucleósido del VHB, un interferón o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la vacuna contra el VHB es por lo menos una de RECOMBIVAX HB, ENGERIX-B, ELOVAC B, GENEVAC-B o SHANVAC B.

En una realización, los métodos descritos en la presente comprenden además administrar por lo menos un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste de análogos de nucleótidos/nucleósidos, inhibidores de entrada, inhibidores de fusión y cualquier combinación de estos u otros mecanismos antivirales.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar una infección por VHB en un individuo con necesidad de ello, que comprende reducir la carga viral del VHB administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto divulgado solo o en combinación con un inhibidor de la transcriptasa inversa; y administrar además al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna contra el VHB. El inhibidor de la transcriptasa inversa puede ser por lo menos uno de zidovudina, didanosina, zalcitabina, ddA, estavudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina, entecavir, apricitabina, atevirapina, ribavirina, aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, valganciclovir, tenofovir, adefovir, PMPA, cidofovir, efavirenz, nevirapina, delavirdina o etravirina.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar una infección por VHB en un individuo con necesidad de ello, que comprende reducir la carga viral del VHB administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto divulgado solo o en combinación con un oligonucleótido o agente de interferencia del ARN que se dirige a los ácidos nucleicos del VHB; y administrar además al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de vacuna contra el VHB. El oligonucleótido antisentido o el agente de interferencia de ARN posee suficiente complementariedad con los ácidos nucleicos objetivo del VHB para inhibir la replicación del genoma viral, la transcripción de los ARN virales o la traducción de proteínas virales.

En otra realización, el compuesto divulgado y el por lo menos un agente terapéutico adicional se formulan conjuntamente. En aún otra realización, el compuesto divulgado y el por lo menos un agente terapéutico adicional se administran conjuntamente. Para cualquier terapia de combinación descrita en la presente, puede calcularse el efecto sinérgico, por ejemplo, usando métodos adecuados como la ecuación sigmoidal- $E_{max}$  (Holford & Scheiner, 19981, Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe & Muischnek, 1926, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 114: 313-326) y la ecuación del efecto mediano (Chou & Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55). Cada ecuación mencionada anteriormente puede aplicarse a datos experimentales para generar un gráfico correspondiente para ayudar a evaluar los efectos de la combinación de fármacos. Los gráficos correspondientes asociados con las ecuaciones mencionadas anteriormente son la curva de concentración-efecto, la curva de isobolograma y la curva de índice de combinación, respectivamente.

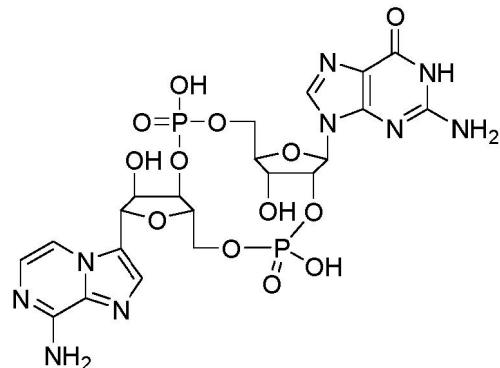
En una realización de cualquiera de los métodos de administración de terapias de combinación proporcionadas en la presente, el método puede comprender además monitorizar o detectar la carga viral del VHB del sujeto, en donde el método se lleva a cabo durante un período de tiempo que incluye hasta el momento en que el virus VHB es indetectable

Las abreviaturas usadas en la presente memoria descriptiva, particularmente los esquemas y ejemplos, son las siguientes:

	ACN	acetonitrilo
	AcOH	ácido acético glacial
	ADDP	dipiperidida azodicarboxílica
5	ac.	acuoso
	Bn o Bzl	bencilo
	BINAP	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
	Boc	terc-butiloxicarbonilo
	conc.	concentrado
10	dba	dibencilidenacetona
	DBU	1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno
	DCC	N,N'-diciclohexil-carbodiimida
	DCE	1,2-dicloroetano
	DCM	diclorometano
15	DEAD	azodicarboxilato de dietilo
	DIBAL	hidruro de diisobutilaluminio
	DIPEA o DIEA	diisopropil-etylamina
	DMA	dimetilanilina
	DMAP	4-dimetilaminopiridina
20	DME	dimetoxietano
	DMF	N,N-dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	DMT	4,4'-dimetoxitriptilo
	DPPA	difenilfosforilazida
25	dppf	1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno
	EA	acetato de etilo
	EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
	ESI	ionización por electropulverización
	EtOAc o EA	acetato de etilo
30	EtOH	etanol
	GCMS	cromatografía de gases-espectrometría de masas
	h o hr(s)	hora u horas
	HEK	riñón embrionario humano
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
35	LAH	hidruro de litio y aluminio
	LDA	diisopropilamida de litio
	LHMDS	bis(trimetilsilil)amida de litio
	MEK	metiletilcetona
	MeOH	metanol
40	MHz	megahercios
	min	minuto o minutos
	MS	espectrometría de masas
	Ms	metanosulfonilo
	NBS	N-bromosuccinimida
45	NIS	N-yodosuccinimida
	NMM	N-metilmorfolina
	NMP	N-metilpirrolidona
	NMR	resonancia magnética nuclear
	PCC	clorcromato de piridinio
50	PE	éter de petróleo
	RP	fase inversa
	ta o TA	temperatura ambiente
	R <sub>t</sub>	tiempo de retención
	Seg	segundo o segundos
55	SEM-Cl	cloruro de 2-(trimetilsilil)etoximetilo
	TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
	TBDMS	t-butildimetilsililo
	TBP	fosfato de tributilo
	TEA o Et <sub>3</sub> N	trietylamina
60	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TIPS	triisopropilsililo
	TLC	cromatografía de capa fina
	TMS	tetrametilsilano
65	Ts	4-toluenosulfonilo

Ejemplos específicos

5 El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 1 describe una ruta posible para la preparación del compuesto 1, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Ejemplo de referencia 1

25

30

35

40

45

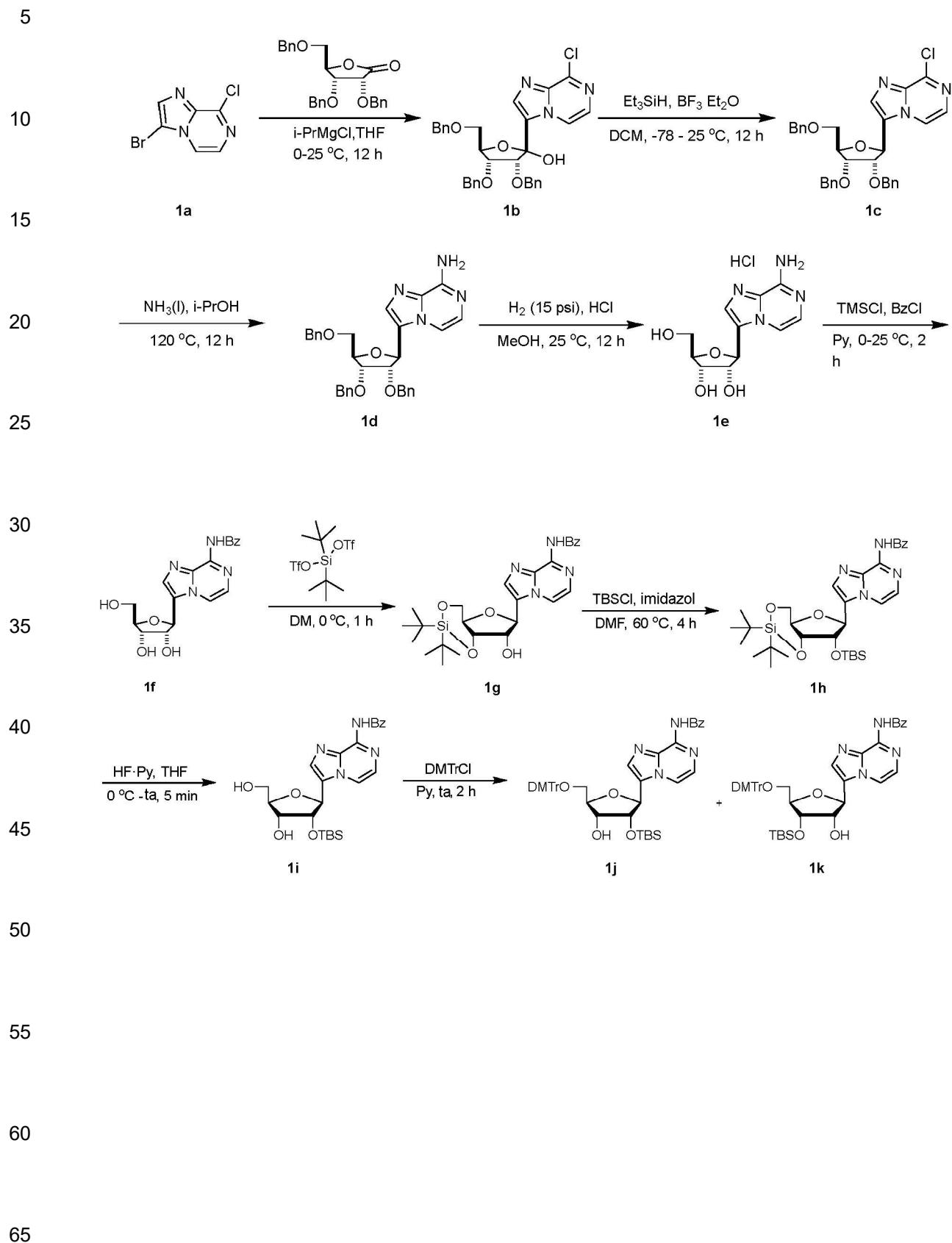
50

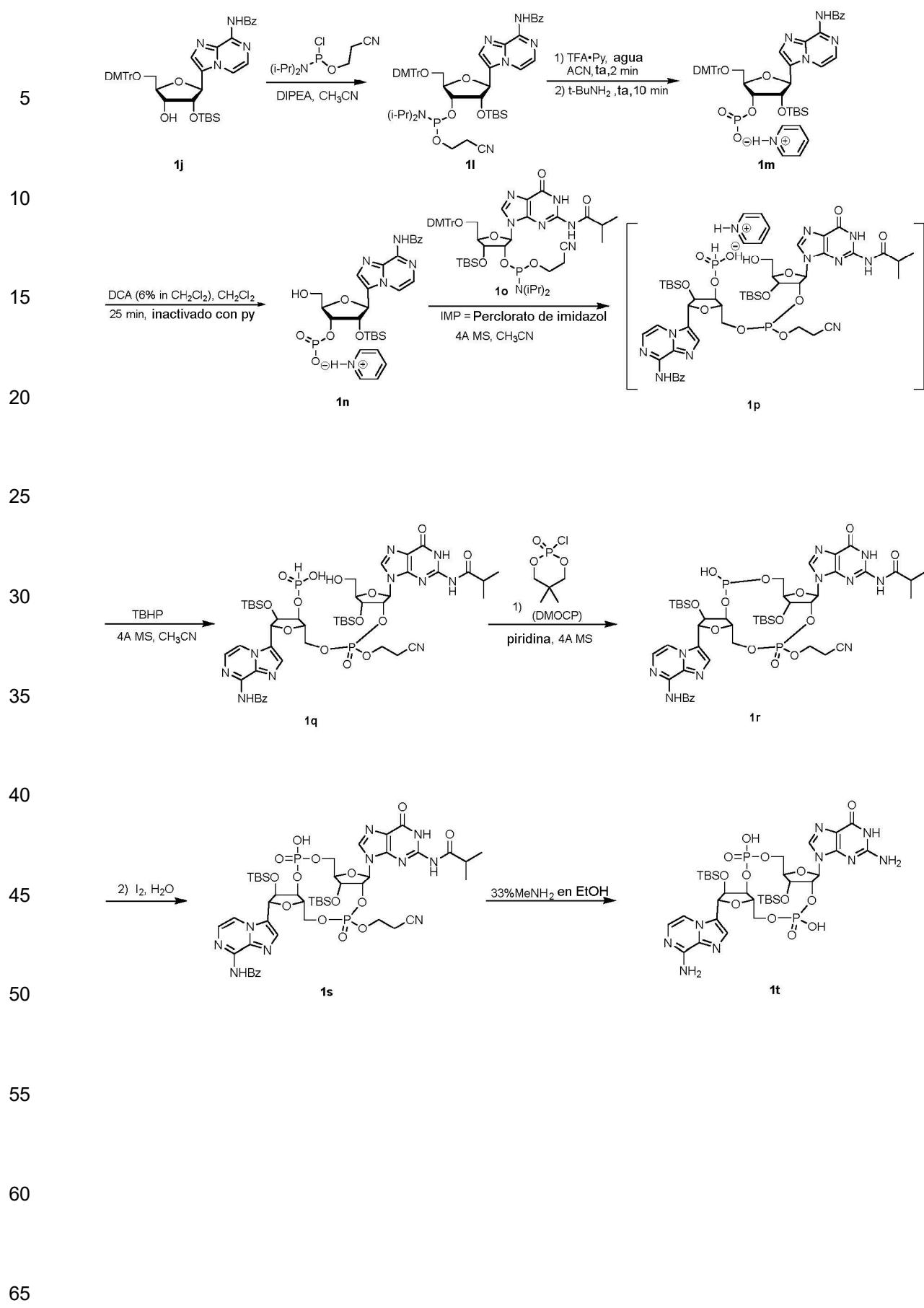
55

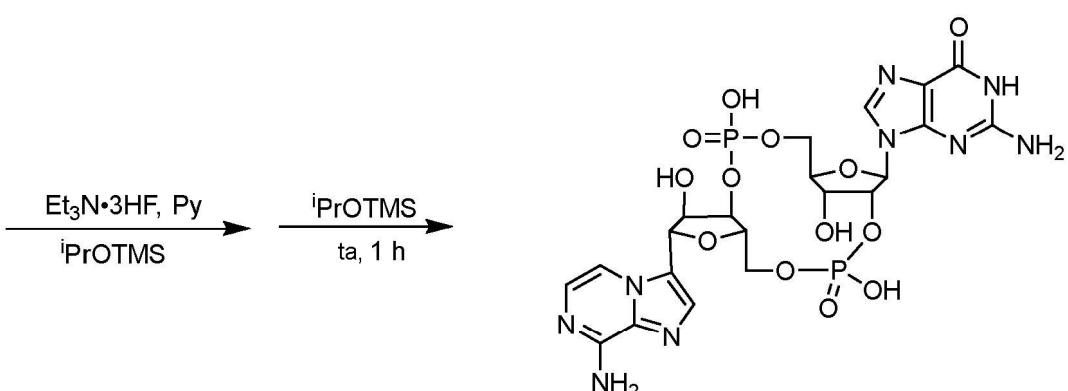
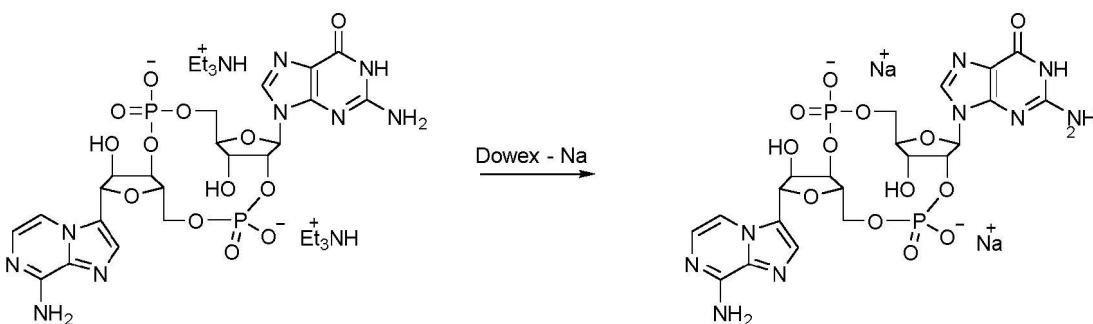
60

65

## Compuesto 1





5  
10  
1520  
25  
30  
35

Compuesto 1 sal de trietilamina

Compuesto 1 sal de sodio

## Paso 1: Preparación del compuesto 1f

40 A una solución del compuesto **1e** (Journal of Heterocycle Chemistry 1993, 30: 1213-1220) (5 g, 14,7 mmol) en piridina (80,0 ml) se le añadió TMSCl (9,61 g, 88,4 mmol) a 0° C. La mezcla de reacción se agitó a 0° C durante 0,5 h. Se añadió gota a gota cloruro de benzoilo (2,49 g, 17,7 mmol) a 0° C. Despues de 5 min, la mezcla se calentó hasta ta y se agitó a 25° C durante 1,5 h. La mezcla se diluyó con agua (5 ml) a 0° C y se añadió gota a gota NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O (25%, 7, 5 ml). Luego, la mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 50:1 a 5:1) para proporcionar el compuesto **1f** (1,05 g, 1,08 mmol) como un sólido blanco.

50 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO d6) δ 10.86 (s, 1H), 8.59 (d, J=4.8 Hz, 1H), 8.04 (d, J=7.6 Hz, 2H), 7.76-7.37 (m, 2H), 7.65-7.61 (m, 1H), 7.56-7.53 (m, 2H), 5.28 (d, J=6.8 Hz, 1H), 5.12 (d, J=4.8 Hz, 1H), 5.07-5.02 (m, 2H), 4.30-4.25 (m, 1H), 4.06-4.05 (m, 1H), 3.94-3.93 (m, 1H), 3.39 (bar, 2H); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO d6) δ 165.7, 144.0, 136.4, 133.7, 132.9, 132.1, 128.5, 128.0, 126.9, 125.8, 117.6, 86.0, 74.8, 73.2, 71.2, 61.6; ESI-MS m/z 371 (M+1)<sup>+</sup>.

## Paso 2: Preparación del compuesto 1g

55 A una solución del compuesto **1f** (550 mg, 1,485 mmol) en DMF (10,0 ml) se le añadió bis(trifluorometanosulfonato) de di-terc-butilsilanolílio (1,31 g, 2,97 mmol) a 0° C. La mezcla de la reacción se agitó a 0° C durante 1 h. Se añadió 1H-imidazol (505,49 mg, 7,42 mmol) en una porción a 0° C. Despues de 5 min, la mezcla se agitó a 25° C durante 30 min. La mezcla se diluyó con DCM (30 ml) y se lavó con agua/salmuera = 1/1 (20 ml x 2) y salmuera (20 ml). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a 1/1) para proporcionar el compuesto 1g (670 mg, 1,281 mmol) como una espuma blanca.

65 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.49 (s, 1H), 8.09-7.96 (m, 2H), 7.90-7.84 (m, 1H), 7.84-7.78 (m, 1H), 7.67-7.47 (m, 4H), 5.34-5.23 (m, 1H), 4.57 (d, J=5.2 Hz, 1H), 4.49 (dd, J=5.2, 9.2 Hz, 1H), 4.16-4.06 (m, 1H), 4.03-3.92 (m, 2H), 1.06 (d, J=0.8 Hz, 18H); ESI-MS m/z 511.2 (M+1)<sup>+</sup>.

Paso 3: Preparación del **compuesto 1h**

5 A una solución del compuesto **1g** (2,53 g, 4,95 mmol) en DMF (50 ml) se le añadió imidazol (2,024 g, 29,72 mmol) y terc-butilclorodimetilsilano (2,24 g, 14,86 mmol) a 0° C. La mezcla se agitó a 60° C durante 12 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (50 ml), agua (50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a 3/1) para proporcionar el compuesto 3 (2,86 g, 4,577 mmol) como un sólido blanco.

10 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.47 (s, 1H), 8.02 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.93-7.75 (m, 2H), 7.68-7.45 (m, 4H), 5.17 (s, 1H), 4.66 (d, J=5.0 Hz, 1H), 4.45 (dd, J=5.3, 9.3 Hz, 1H), 4.21-4.15 (m, 1H), 3.92 (dd, J=5.3, 9.8 Hz, 1H), 3.85 (t, J=9.8 Hz, 1H), 1.05 (d, J=2.5 Hz, 18H), 0.92 (s, 9H), 0.15 (d, J=7.5 Hz, 6H); ESI-MS m/z 625.7 (M+1)<sup>+</sup>.

15 Paso 4: Preparación del **compuesto 1i**

20 Se diluyó cuidadosamente hidrofluoruro de piridina (1,65 ml, 18,306 mmol) con piridina (12 ml) y luego se añadió gota a gota a una solución del compuesto **1h** (2,86 g, 4,57 mmol) en THF (45 ml) a 0° C. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 5 min. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de piridina (12 ml) y se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml), se lavó con salmuera (50 ml x 2), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a 0/1) para dar el compuesto **1i** (2,04 g, 4,21 mmol) como un sólido blanco.

25 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.52 (s, 1H), 8.29 (d, J=4.5 Hz, 1H), 8.04 (d, J=7.0 Hz, 2H), 7.77 (d, J=4.5 Hz, 1H), 7.64-7.58 (m, 2H), 7.57-7.49 (m, 2H), 5.09 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.51 (dd, J=5.5, 8.0 Hz, 1H), 4.30-4.16 (m, 2H), 4.04-3.85 (m, 2H), 3.49 (s, 1H), 2.82 (d, J=2.5 Hz, 1H), 2.19 (br, s, 1H), 0.83 (s, 9H), -0.12 (s, 3H), -0.27 (s, 3H); ESI-MS m/z 485.1 (M+1)<sup>+</sup>.

30 Paso 5: Preparación del **compuesto 1j**

35 A una solución del compuesto **1i** (1,84 g, 3,797 mmol) en piridina (20 ml) se le añadió DMTrCl (1,93 g, 5,695 mmol) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 12 h. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de MeOH (2,0 ml), se diluyó con EA (100 ml) y se lavó con salmuera (50 ml x 3), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida hasta dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a 1/1) para dar el compuesto **1j** (1,35 g, 1,715 mmol) como una espuma blanca.

40 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.47 (s, 1H), 8.35 (d, J=4.4 Hz, 1H), 8.03 (d, J=7.0 Hz, 2H), 7.65-7.57 (m, 2H), 7.56-7.49 (m, 2H), 7.41 (d, J=7.0 Hz, 2H), 7.34-7.20 (m, 9H), 7.04 (d, J=5.0 Hz, 1H), 6.85-6.78 (m, 4H), 5.09 (d, J=8.5 Hz, 1H), 4.76 (dd, J=5.5, 8.5 Hz, 1H), 4.44 (d, J=5.0 Hz, 1H), 4.27 (d, J=1.5 Hz, 1H), 3.78 (d, J=2.0 Hz, 6H), 3.50 (d, J=2.0 Hz, 2H), 2.88 (d, J=1.5 Hz, 1H), 0.84 (s, 9H), -0.14 (s, 3H), -0.31 (s, 3H); ESI-MS m/z 787.3 (M+1)<sup>+</sup>.

45 Paso 6: Preparación del **compuesto 1l**

50 A una solución del compuesto **1j** (600 mg, 0,762 mmol) en THF (6,0 ml) se le añadió N,N-diisopropiletilamina (591,2 mg, 4,57 mmol) y N,N-diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (541,333 mg, 2,28 mmol) a 0° C. Luego, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 2 h.

55 A una solución del compuesto **1j** (930 mg, 1,18 mmol) en THF (10,0 ml) se le añadió N,N-diisopropiletilamina (916,37 mg, 7,09 mmol) y N,N-diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (839,06 mg, 3,54 mmol) a 0° C. Luego, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 2 h. La mezcla de la reacción se combinó con la primera reacción y la mezcla combinada se inactivó mediante la adición de MeOH (5 ml) y se diluyó con EA (50 ml). La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (20 ml) y salmuera (20 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a 3/1) para proporcionar el compuesto **1l** (1,76 g, 1,78 mmol) como un aceite amarillo.

60 <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 151.467 (s, 1P), 148.337 (s, 1P); ESI-MS m/z 904.4 (M-(N(iPr)<sub>2</sub>+OH))<sup>+</sup>.

65 Paso 7: Preparación del **compuesto 1m**

66 A una solución del compuesto **1l** (1,76 g, 1,783 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (10,0 ml) y agua (64,236 ul, 3,56 mmol) se añadió trifluoroacetato de piridinio (413,16 mg, 2,14 mmol). Después de 5 min, se añadió terc-butilamina (10,0 ml) y la mezcla de la reacción se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión

reducida para dar una espuma blanca. El residuo se disolvió en CH<sub>3</sub>CN (10,0 ml) y se concentró para proporcionar una espuma, y este proceso se repitió una vez más para dar el compuesto **1m** (1,82 g, bruto) como una espuma blanca, que se usó para el paso siguiente sin purificación adicional.

5      **Paso 8: Preparación del compuesto 1n**

10     A una solución del compuesto **1m** (1,82 g, bruto) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 ml) se le añadió agua (385,3 mg, 21,387 mmol), seguido de ácido dicloroacético al 6% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 ml). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min. Se añadió piridina (10 ml) para inactivar la reacción y la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min. En ese momento, la mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo, que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 100/1 a 5/1) para proporcionar el compuesto **1n** (910 mg, 1,66 mmol) como una espuma blanca.

15     <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.85 (d, J=4.6 Hz, 1H), 8.11 (d, J=7.3 Hz, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.73-7.61 (m, 2H), 7.61-7.51 (m, 2H), 6.19 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.26 (d, J=9.0 Hz, 1H), 4.74 (dd, J=5.0, 10.5 Hz, 1H), 4.61 (dd, J=5.2, 8.7 Hz, 1H), 4.33 (s, 1H), 3.96-3.88 (m, 1H), 3.84-3.75 (m, 1H), 0.76 (s, 9H), -0.09 (s, 3H), -0.39 (s, 3H); ESI-MS m/z 549.1 (M+1)<sup>+</sup>.

20     **Paso 9: Preparación del compuesto 1p**

25     Se agitó una solución del compuesto **1n** (910 mg, 1,659 mmol) y tamices moleculares 4Å en acetonitrilo seco (30 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 3 min. Se añadió perclorato de 1H-imidazol (5,14 g, 30,52 mmol). Despues de 10 min, se añadió (2R,3R,4R,5R)-5-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-((terc-butildimethylsilyl)oxi)-2-(2-isobutiramo-6-oxo-1H-purin-9(6H)-il)tetrahidrofuran-3-il (2-cianoetil)diisopropilfosforamidita, **1o** (1,77 g, 1,825 mmol) en MeCN (15 ml) a 25° C. la mezcla se agitó a 25° C durante 50 min. La mezcla de la reacción (0,03687 M en MeCN, 45 ml) se usó para el paso siguiente sin purificación adicional.

30     **Paso 10: Preparación del compuesto 1q**

35     A una solución del compuesto **1p** (0,03687 M en MeCN, 45 ml) se le añadió hidroperóxido de terc-butilo (1,510 ml, 8,303 mmol) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 1 h. La mezcla de la reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (neutra, columna: Waters Xbridge 150x25 504; fase móvil: agua (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM)-ACN, B%: 33%-53%, 25 ml/min, Tiempo de gradiente: 8 min) para proporcionar el compuesto **1q** (602 mg, 0,532 mmol) como un sólido blanco.

40     <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 4.05 (s, 1P), 3.92 (s, 1P), -2.20 (s, 1P), -2.98 (s, 1P); ESI-MS m/z 1131.1 (M+1)<sup>+</sup>.

45     **Paso 11: Preparación del compuesto 1r**

50     A una solución del compuesto **1q** (600 mg, 0,53 mmol) y tamices moleculares 4Å en piridina (150 ml) se le añadió DMOCP (293,669 mg, 1,591 mmol) a 25° C. La mezcla se agitó a 25° C durante 1 H. La mezcla de la reacción (0,00353 M en Py, 150 ml) se usó para el paso siguiente sin purificación adicional.

55     **Paso 12: Preparación del compuesto 1s**

60     A una solución del compuesto **1r** (0,00353 M en Py, 150 ml) se le añadió agua (95,48 mg, 5,30 mmol) y I<sub>2</sub> (672,594 mg, 2,65 mmol, 5,0 eq) a 25° C. La mezcla se agitó a 25° C durante 1 h. La reacción se inactivó con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> acuoso (50 ml). La mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (columna: Agela Durashell C18 150x25 5 μM; fase móvil: agua (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>CN del 35% al 55%, caudal: 25 ml/ min) para proporcionar el compuesto **1s** (285 mg, 0,25 mmol) como un sólido blanco.

65     ESI-MS m/z 1130.1 (M+1)<sup>+</sup>.

70     **Paso 13: Preparación del compuesto 1t**

75     Se agitó el compuesto **1s** (120 mg, 0,106 mmol) en MeNH<sub>2</sub> (33% en EtOH, 10 ml) a 25° C durante 16 h. La mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto **1t** bruto (125 mg) como un sólido amarillo, que se usó para el paso siguiente sin purificación adicional.

80     **Paso 14: Preparación del compuesto 1, sal de trietilamonio**

85     A una solución del compuesto **1t** (125 mg, bruto) en Py (5 ml) se le añadió Et<sub>3</sub>N (1,402 g, 13,86 mmol) y

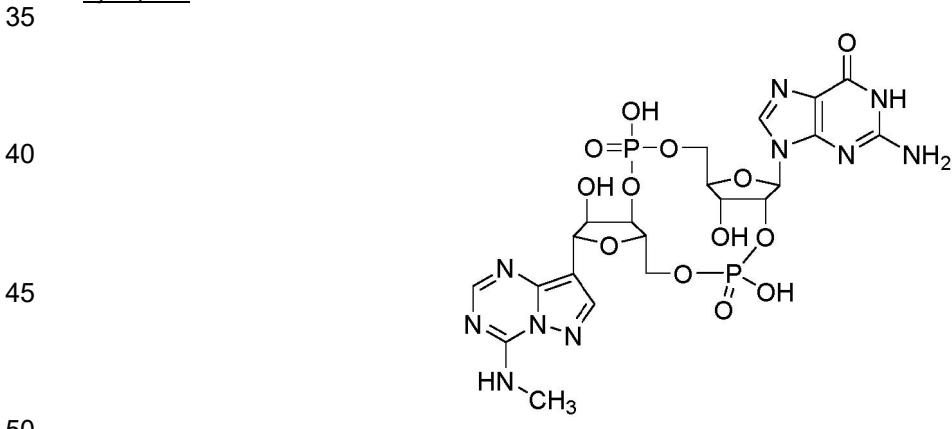
trihidrofluoruro de trietilamina (1,117 g, 6,929 mmol, 50,0 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 50° C durante 12 h. La mezcla se disolvió en THF (3 ml) y se añadió isopropoxitrimetilsilano (3,66 g, 27,71 mmol) a 25° C y se agitó durante 12 h. La mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo (108 mg, bruto) como un sólido marrón, recogido como lote 1.

5 A una solución del compuesto **1t** (183 mg, bruto) en Py (6 ml) se le añadió trietilamina (2,05 g, 20,29 mmol) y trihidrofluoruro de trietilamina (1,63 g, 10,145 mmol) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 50° C durante 12 h. La mezcla se disolvió en THF (5 ml) y se añadió isopropoxitrimetilsilano (5,36 g, 40,58 mmol) a 25° C y se agitó durante 12 h. La mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo como lote 2. El lote 2 se combinó con el lote 1 y se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (columna: Agela Durashell C18 150x25 5  $\mu$ M; fase móvil: agua (0,05% de hidróxido de amoníaco v/v)-ACN del 0% al 15%, caudal: 35 ml/min) para proporcionar el compuesto **1, sal de trietilamonio** (125 mg, 0,186 mmol) como un sólido blanco.  $^1$ H NMR (400 MHz,  $D_2O$ ) 7.77 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.50-7.16 (m, 2H), 5.86 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.54-4.42 (m, 2H), 4.32 (br s, 1H), 4.21 (br, d,  $J=8.5$  Hz, 4H), 3.87 (d,  $J=11.5$  Hz, 1H); ESI-MS m/z 674.0 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

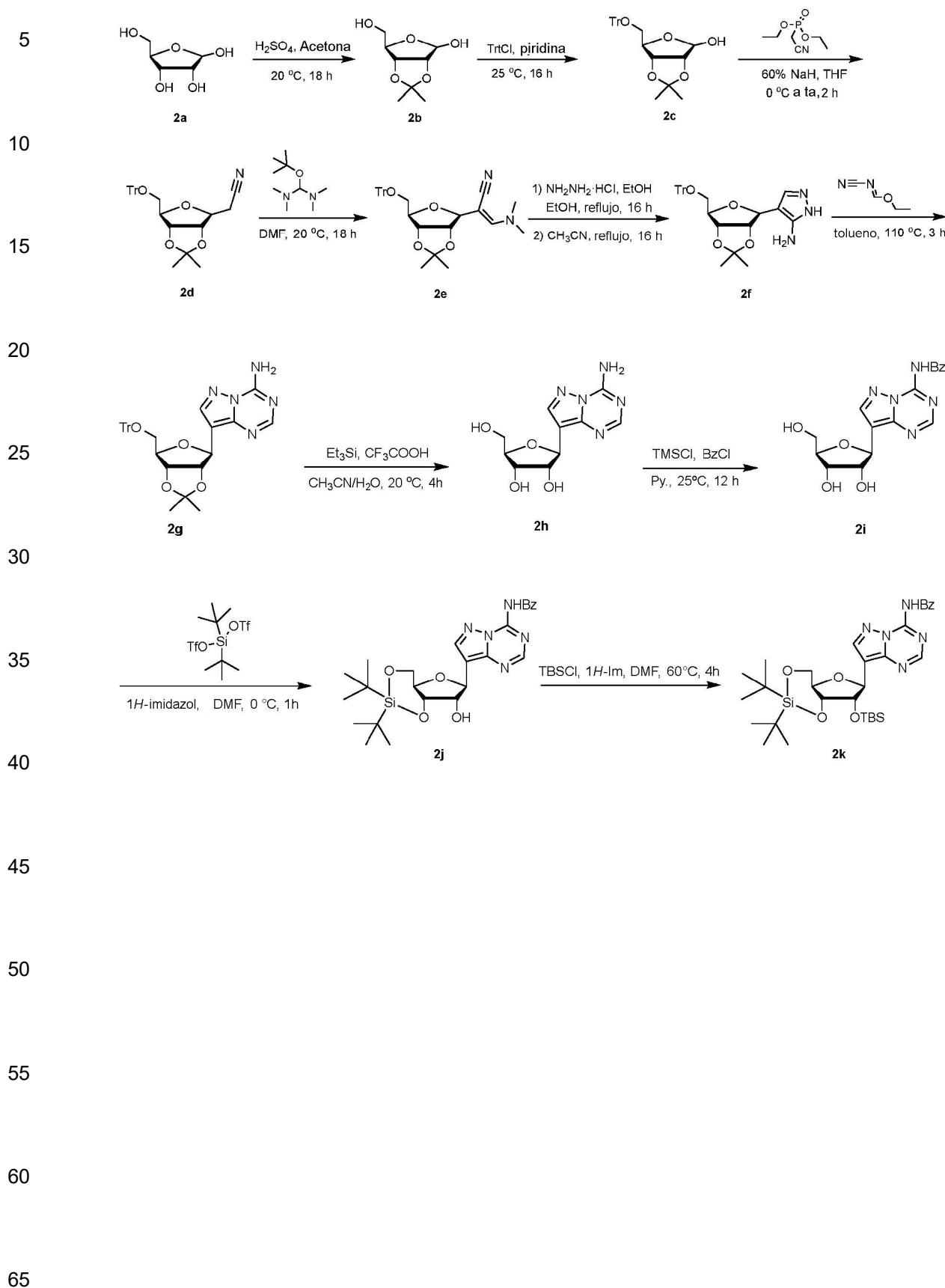
10 15 Paso 15: Preparación del compuesto **1, sal de sodio**

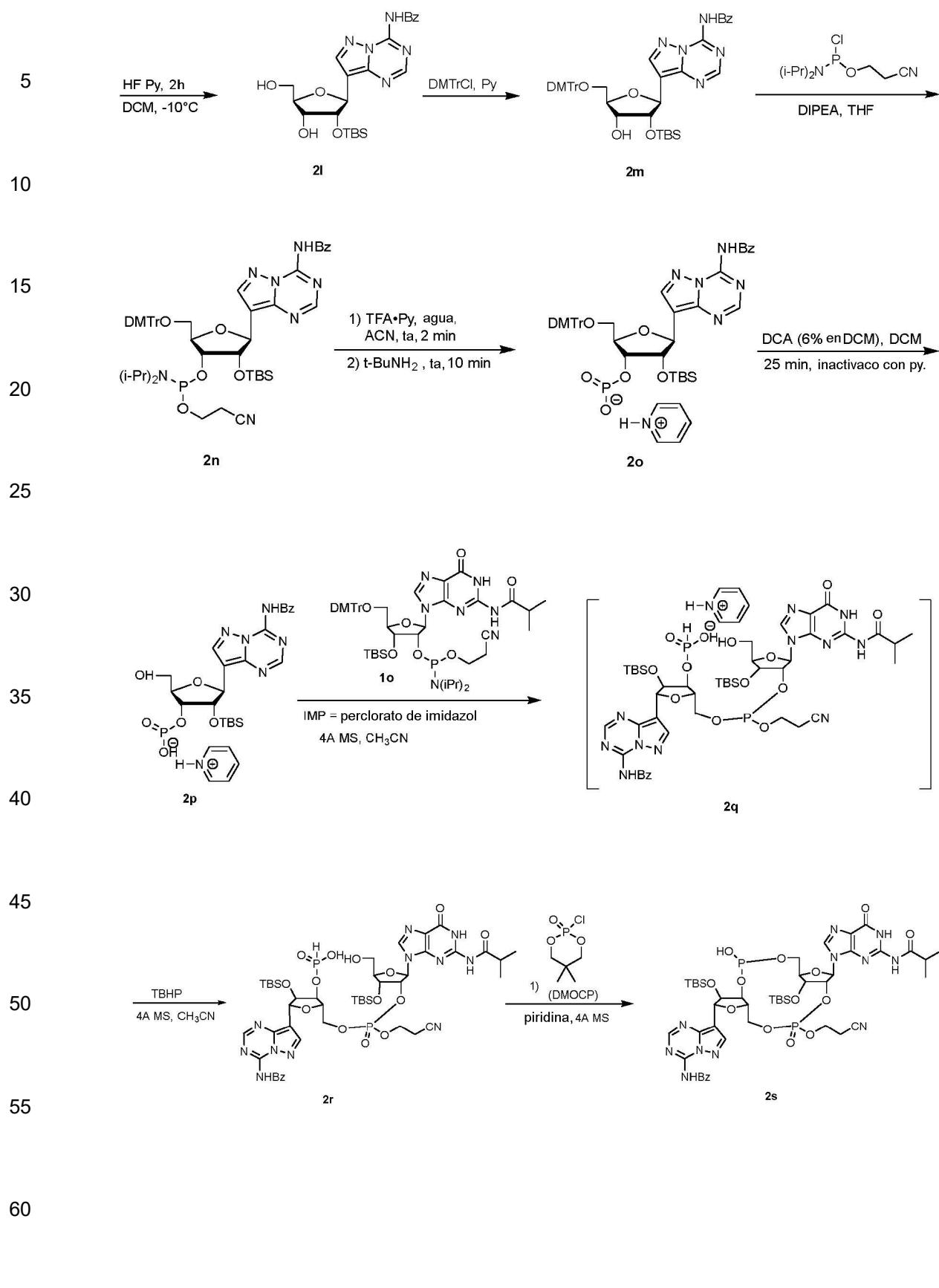
El compuesto **1, sal de trietilamonio**, se secó a vacío alto para dar un sólido blanco (125 mg). Se añadió Dowex 50Wx8, 200-400 (forma H, 10 ml) a un vaso de precipitados (para 125 mg del compuesto **1, sal de trietilamonio**) y se lavó con agua desionizada (2x). Luego a la resina se le añadió  $H_2SO_4$  al 15% en  $H_2O$  desionizada (50 ml) y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con  $H_2SO_4$  al 15% en  $H_2O$  desionizada y se lavó con  $H_2SO_4$  al 15% (por lo menos 4 CV), y luego con  $H_2O$  desionizada hasta que se volvió neutra. La resina se transfirió de nuevo al vaso de precipitados y se añadió NaOH al 15% en solución de  $H_2O$  desionizada (50 ml) y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en  $H_2O$  desionizada (por lo menos 4 CV), y luego con  $H_2O$  desionizada hasta que se volvió neutra (por lo menos 4 CV). El compuesto **1, sal de trietilamonio**, se disolvió en  $H_2O$  desionizada (125 mg en 10 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con  $H_2O$  desionizada. La sal de sodio convertida se eluyó en las primeras fracciones. detectado por TLC (UV). El producto se liofilizó para dar el compuesto **1, sal de sodio** (85 mg, 0,117 mmol) como un sólido blanco.  $^1$ H NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ) 8.01 (s, 1H), 7.74 (d,  $J=5.0$  Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.02 (br d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.62 (t,  $J=4.3$  Hz, 1H), 4.56 (d,  $J=3.5$  Hz, 1H), 4.45-3.99 (m, 6H), 3.86 (d,  $J=11.5$  Hz, 1H);  $^{31}P$  NMR (162 MHz,  $CD_3OD$ ) 0.63 (s, 1P), -2.91 (s, 1P); ESI-MS m/z 673.9 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

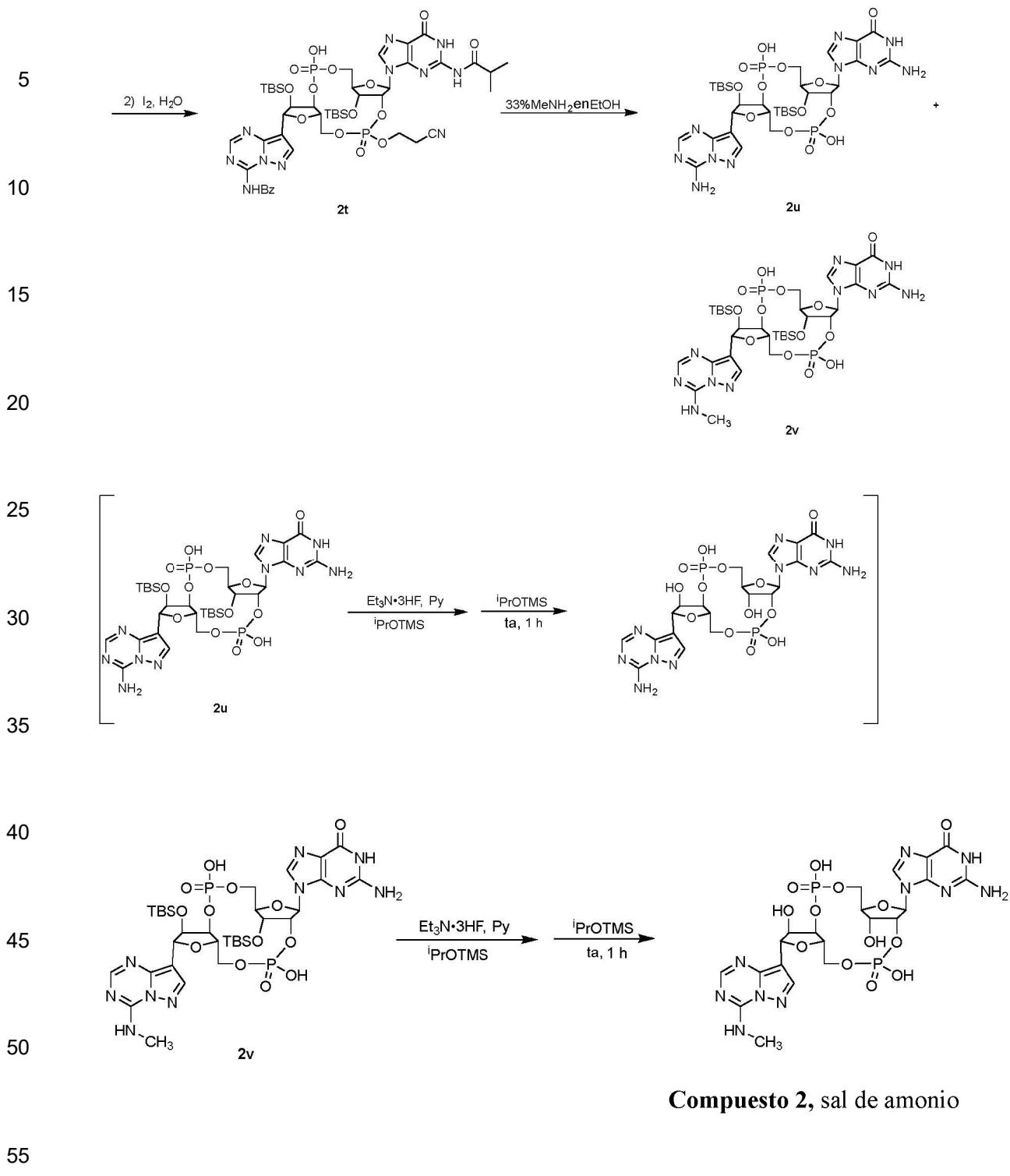
35 Ejemplo 2

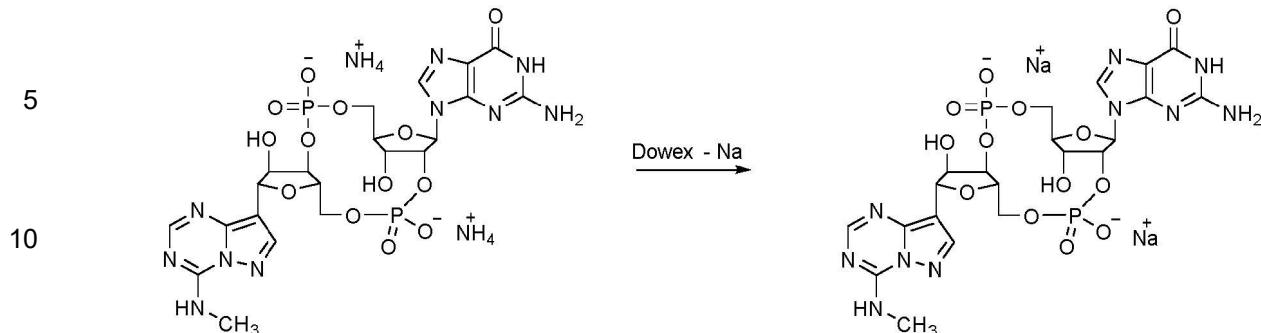


## Compuesto 2









20 **Paso 1: Preparación del compuesto 2j**

25 A una solución de **2i** (WO2013179289) (2 g, 5,39 mmol) en DMF (20 ml) se le añadió gota a gota bis(trifluorometanosulfonato) de di-terc-butilsilanolio (2,61 g, 5,92 mmol) a 0° C en N<sub>2</sub>. Despues de 1 h, se añadió imidazol (458,32 mg, 6,73 mmol) en una porción a 0° C. Despues de 5 min, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 25 min. La mezcla se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se recristalizó en CH<sub>3</sub>CN y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para dar el compuesto **2j** (2,1 g, 4,10 mmol, bruto) como un sólido blanco.

30 **Paso 2: Preparación del compuesto 2k**

35 Se agitó una solución de **2j** (2,1 g, 4,10 mmol), imidazol (2,24 g, 32,84 mmol) y TBSC1 (2,78 g, 18,47 mmol) en DMF (20 ml) a 60° C durante 3 h. La mezcla se inactivó con agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante chromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH = 20:1) para proporcionar el compuesto **2k** (2,22 g, 3,54 mmol) como un sólido blanco.

40 **Paso 3: Preparación del compuesto 2l**

45 Se agitó una solución de **2k** (2,52 g, 4,03 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) a 0° C. A la mezcla se le añadió fluoruro de piridinio (1,64 ml, 18,15 mmol) y la reacción se agitó a ta durante 8 H. La mezcla se inactivó con agua y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante chromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH = 10:1) para proporcionar el compuesto **2l** (1,60 g, 3,3 mmol) como un sólido blanco.

50 **Paso 4: Preparación del compuesto 2m**

55 Se agitó una solución de **2l** (2,34 g, 4,81 mmol) en piridina (23 ml) a temperatura ambiente, a la que se le añadió 4,4'-(cloro(fenil)metileno)bis(metoxibenceno) (3,26 g, 9,62 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se inactivó con agua y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante chromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH = 10:1) para proporcionar **2m** (3,59 g, 4,56 mmol) como un sólido amarillo.

60 **Paso 5: Preparación del compuesto 2n**

65 A una solución de **2m** (500 mg, 0,64 mmol) y DIPEA (246,0 mg, 1,90 mmol) en THF (1,56 ml) se le añadió 3-((cloro(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo (450,5 mg, 1,90 mmol) a 15° C. La mezcla se agitó a ta durante 1 h. Se añadió agua a la mezcla y la mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante chromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo:EtOAc=1:2) para proporcionar el compuesto **2n** (498 mg, 0,55 mmol) como un aceite amarillo. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 10.28 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.42-8.33 (m, 2H), 7.93-7.77 (m, 6H), 7.66 (t, J=8.4 Hz, 4H), 7.59 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.52-7.43 (m, 1H), 7.11 (d, J=8.4 Hz, 4H), 5.55-5.40 (m, 1H), 5.41-5.35 (m, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.59-4.36 (m, 2H), 4.05 (s, 6H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.57-3.53 (m, 1H), 3.01-2.90 (m, 2H), 1.03 (s, 9H), 0.31 (s, 3H), 0.00 (s, 3H); ESI-MS m/z 927.8 (M+Na)<sup>+</sup>.

Paso 6: Preparación del **compuesto 2o**

A una solución de **2n** (813 mg, 0,898 mmol) en agua y acetonitrilo se le añadió trifluoroacetato de piridinio (208,18 mg, 1,078 mmol) a temperatura ambiente. Se añadió t-butilamina (3,44 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla se concentró para proporcionar el producto **2o** bruto (836,39 mg, 0,898 mmol, bruto) como un sólido amarillo, que se coevaporó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x) y se usó directamente para el paso siguiente.

Paso 7: Preparación del **compuesto 2p**

A una solución de **2o** (836,39 mg, 0,898 mmol) en agua y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se le añadió ácido dicloroacético (407,149 mg, 3,158 mmol) a temperatura ambiente durante 0,5 h. Se añadió piridina (0,145 ml, 1,80 mmol). Después de 10 min, la mezcla se concentró y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=1:0 a 5:1) para proporcionar el compuesto **2p** (467,2 mg, 0,744 mmol) como un sólido blanco.

Paso 8: Preparación del **compuesto 2r**

Se agitó una solución de **2p** (467,2 mg, 0,744 mmol) y tamices moleculares 4Å (0,5 g) en CH<sub>3</sub>CN (27 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 3 min. Se añadió perclorato de imidazol (2,51 g, 14,89 mmol). Después de 10 min, se añadió (2R,3R,4R,5R)-5-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)metil)-4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-2-(2-isobutiramido-6-oxo-1H-purin-9(6H)-il)tetrahidrofuran-3-il(2-cianoetil)diisopropilfosforamidita, **1o** (866,53 mg, 0,89 mmol) en CH<sub>3</sub>CN. La mezcla se agitó a 26° C durante 1 hora. Se añadió hidroperóxido de terc-butilo (0,74 ml, 3,72 mmol). La mezcla final se agitó a 26° C durante 1 hora. La mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar 2 fracciones del producto deseado **2r** (62,7 mg, 0,054 mmol y 99,4 mg, 0,076 mmol) como un sólido blanco. ESI-MS m/z 1132.7 (M+H)<sup>+</sup>.

Paso 9: Preparación del **compuesto 2t**

A una solución de **2r** (99,4 mg, 0,088 mmol) y tamices moleculares 4Å en piridina (43 ml) se le añadió DMOCP (48,61 mg, 0,263 mmol) a temperatura ambiente en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a 26° C durante 1 h. Se añadieron agua (15,81 mg, 0,87 mmol) e I<sub>2</sub> (111,41 mg, 0,44 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 26° C durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (sat.). La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un producto bruto que se purificó por HPLC preparativa de fase inversa para dar el compuesto **2t** (50 mg, 0,044 mmol) como un sólido blanco. ESI-MS m/z 1130.4 (M+H)<sup>+</sup>.

Paso 10: Preparación del **compuesto 2u** y el **compuesto 2v**

Se trató el compuesto **2t** (50 mg, 0,044 mmol) con una solución de MeNH<sub>2</sub> en EtOH (33%, 20 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para dar los compuestos **2u** y **2v** (40 mg, 0,044 mmol), que se usaron para el paso siguiente sin purificación. ESI-MS m/z compuesto **2u** 903.3; compuesto **2v** 917.2 (M+H)<sup>+</sup>.

Paso 11: Preparación del **compuesto 2**

A una solución de los compuestos **2u** y **2v** (40 mg, 0,044 mmol) en piridina (1,95 ml) se le añadió trietilamina (537,20 mg, 5,31 mmol) y fluoruro de trietiliamonio (427,92 mg, 2,65 mmol). La mezcla se agitó a 50° C durante 10 h. Se añadió isopropoxtrimetilsilano (1,76 g, 13,27 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar la **sal de amonio del compuesto 2** (11,7 mg, 0,017 mmol), cada una como un sólido blanco. **Compuesto 2:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 8.12-7.95 (m, 3H), 5.92 (d, J=8.4 Hz, 1H), 5.47 (d, J=3.6 Hz, 1H), 5.27 (d, J=5.2 Hz, 1H), 4.98-4.81 (m, 1H), 4.59-4.44 (m, 2H), 4.37 (s, 1H), 4.31-4.15 (m, 3H), 4.14-4.07 (m, 1H), 4.02 (br d, J=10.4 Hz, 1H), 3.12 (d, J=4.4 Hz, 3H).

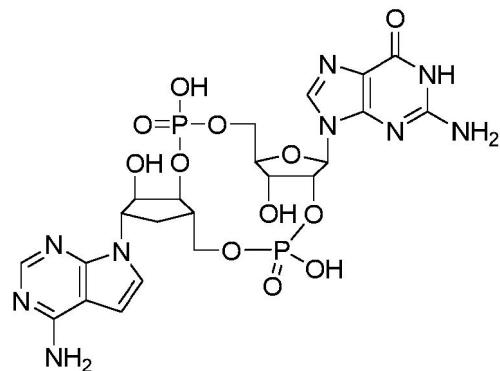
Paso 12: Preparación de la **sal de sodio del compuesto 2**

Se añadió un volumen de 10 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 11,7 mg de **sal de amonio del compuesto 2**) y se lavó con H<sub>2</sub>O DI (2x). Luego a la resina se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en H<sub>2</sub>O DI (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en H<sub>2</sub>O DI y se lavó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% (por lo menos 4 CV), y luego con H<sub>2</sub>O DI hasta que se volvió neutra. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió NaOH al 15% en solución de H<sub>2</sub>O DI (50 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en H<sub>2</sub>O DI (por lo menos 4 CV), y luego con H<sub>2</sub>O hasta que se volvió neutra (por lo menos 4 CV). Se disolvió A en agua DI (11,7 mg en 5 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con H<sub>2</sub>O DI. El compuesto 7 se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para dar la sal sódica del compuesto 2 (8,8 mg, 0,012 mmol) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 8.06 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 5.90 (d, J=8.4 Hz, 1H), 5.47 (d, J=4.0 Hz, 1H), 5.27 (s, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.58-4.50 (m, 1H), 4.36 (s, 1H), 4.29-4.22 (m, 2H), 4.29-4.22 (m, 1H), 4.17 (s, 1H), 4.14-4.08 (m, 1H), 4.03 (d, J=12.0 Hz, 1H), 3.10 (s, 3H); <sup>31</sup>P NMR

(162 MHz, D<sub>2</sub>O) –1.13, –1.75; ESI-MS m/z 688.8 (M+H)<sup>+</sup>.

5 El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo 3 de referencia describe una ruta posible para la preparación del compuesto 3, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Ejemplo de referencia 3



25

30

35

40

45

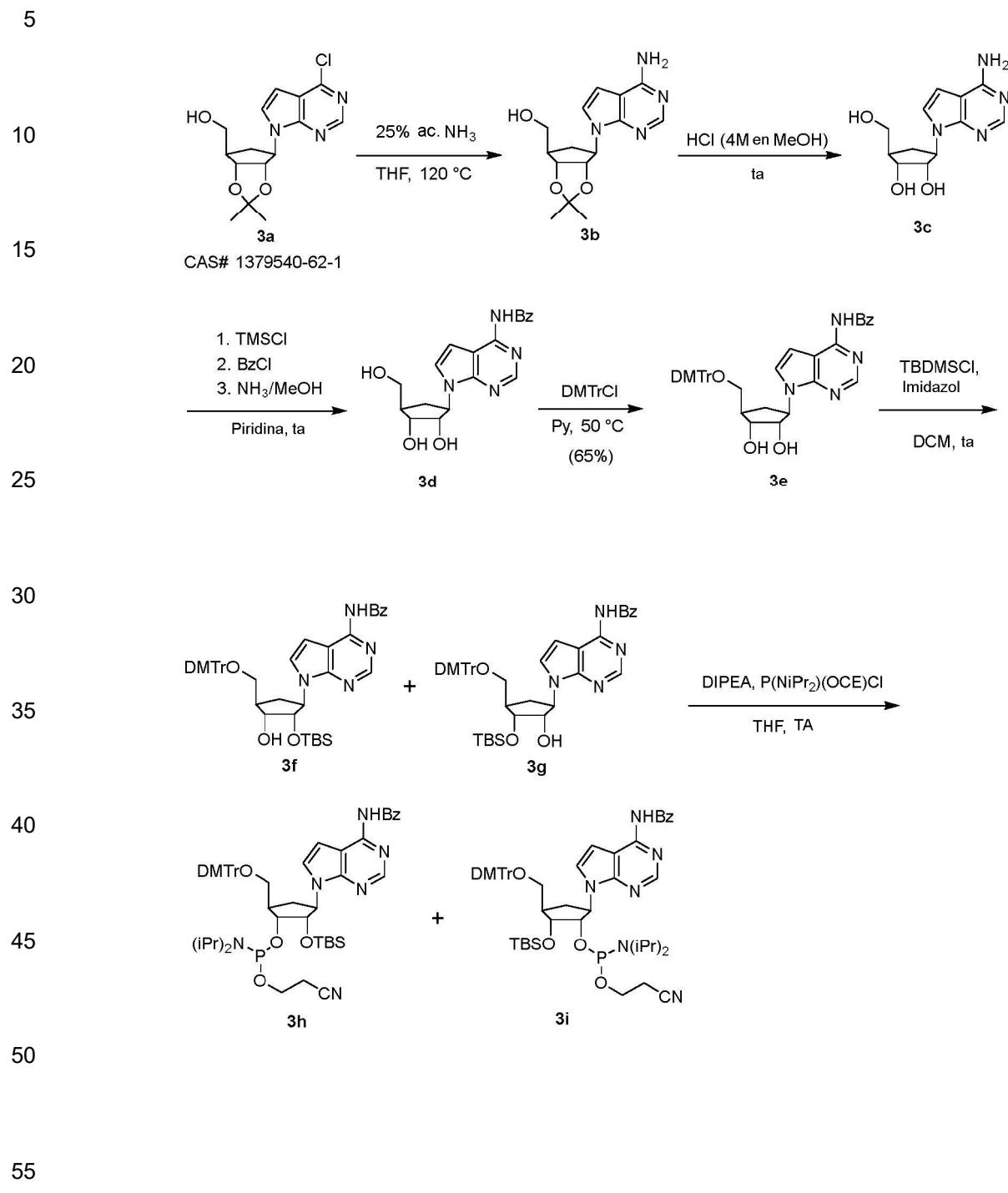
50

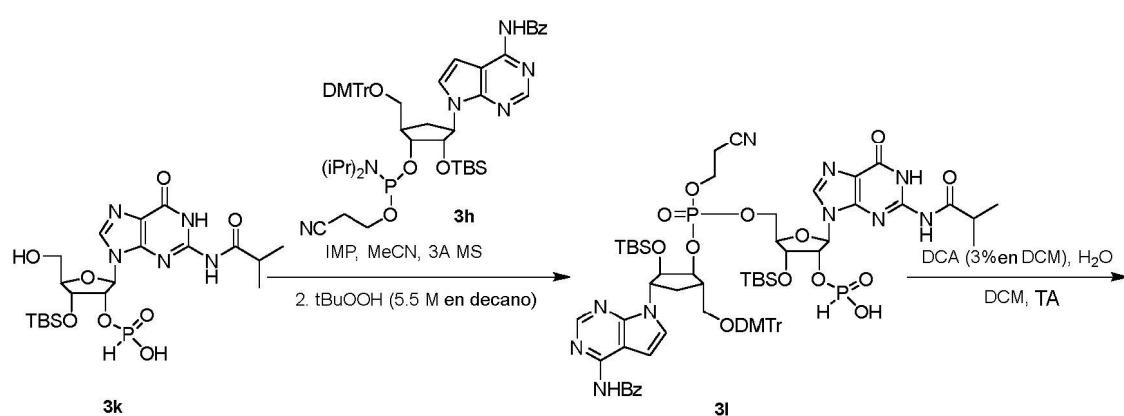
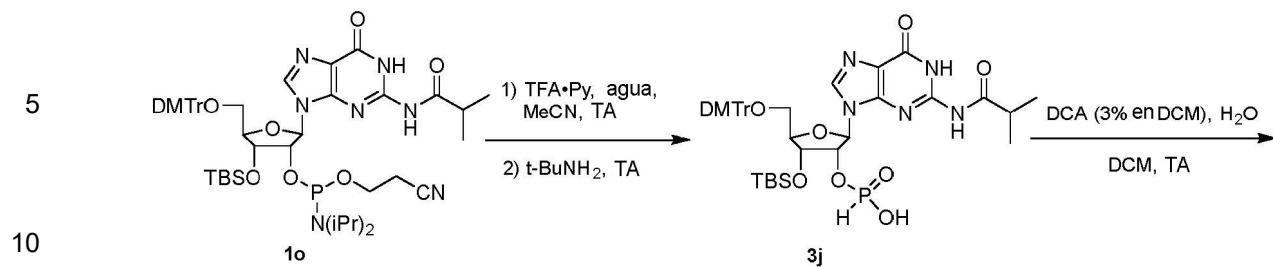
55

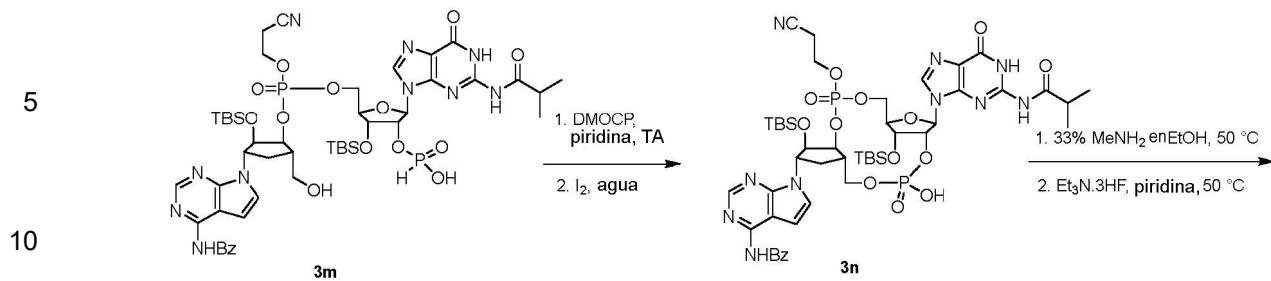
60

65

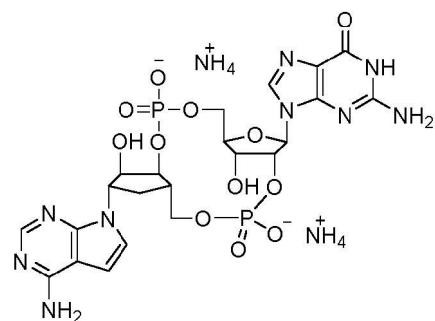
## Compuesto 3



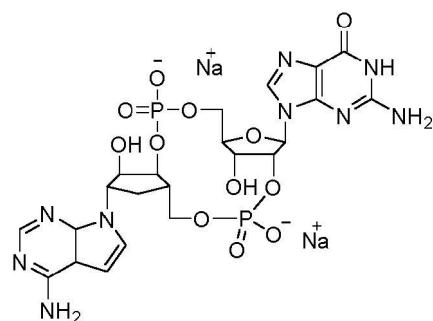




**Compuesto 3, sal de amonio**



Dowex - Na

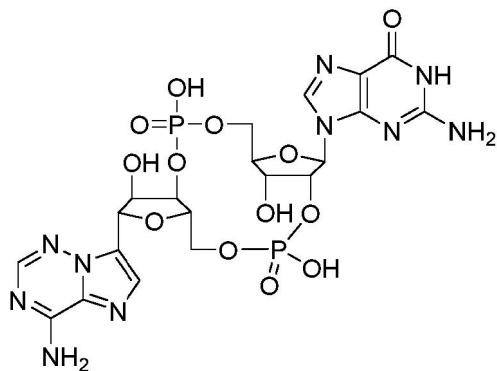


**Compuesto 3, sal de amonio**

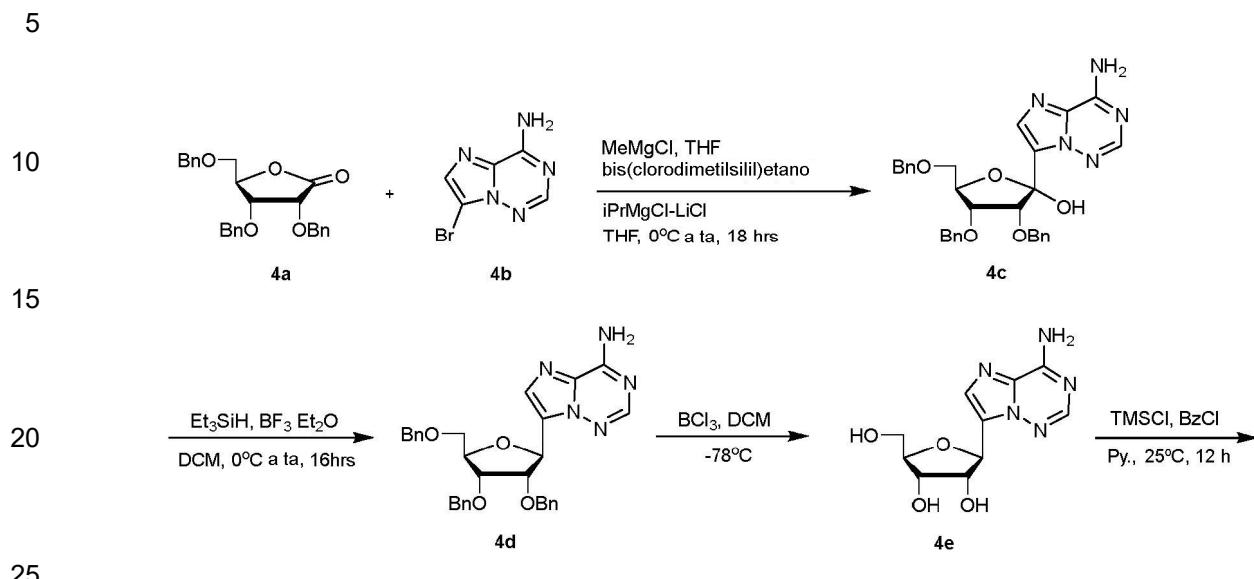
**Compuesto 3, sal de sodio**

El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 4 describe una ruta posible para la preparación del compuesto 4, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

**Ejemplo de referencia 4**



## Compuesto 4



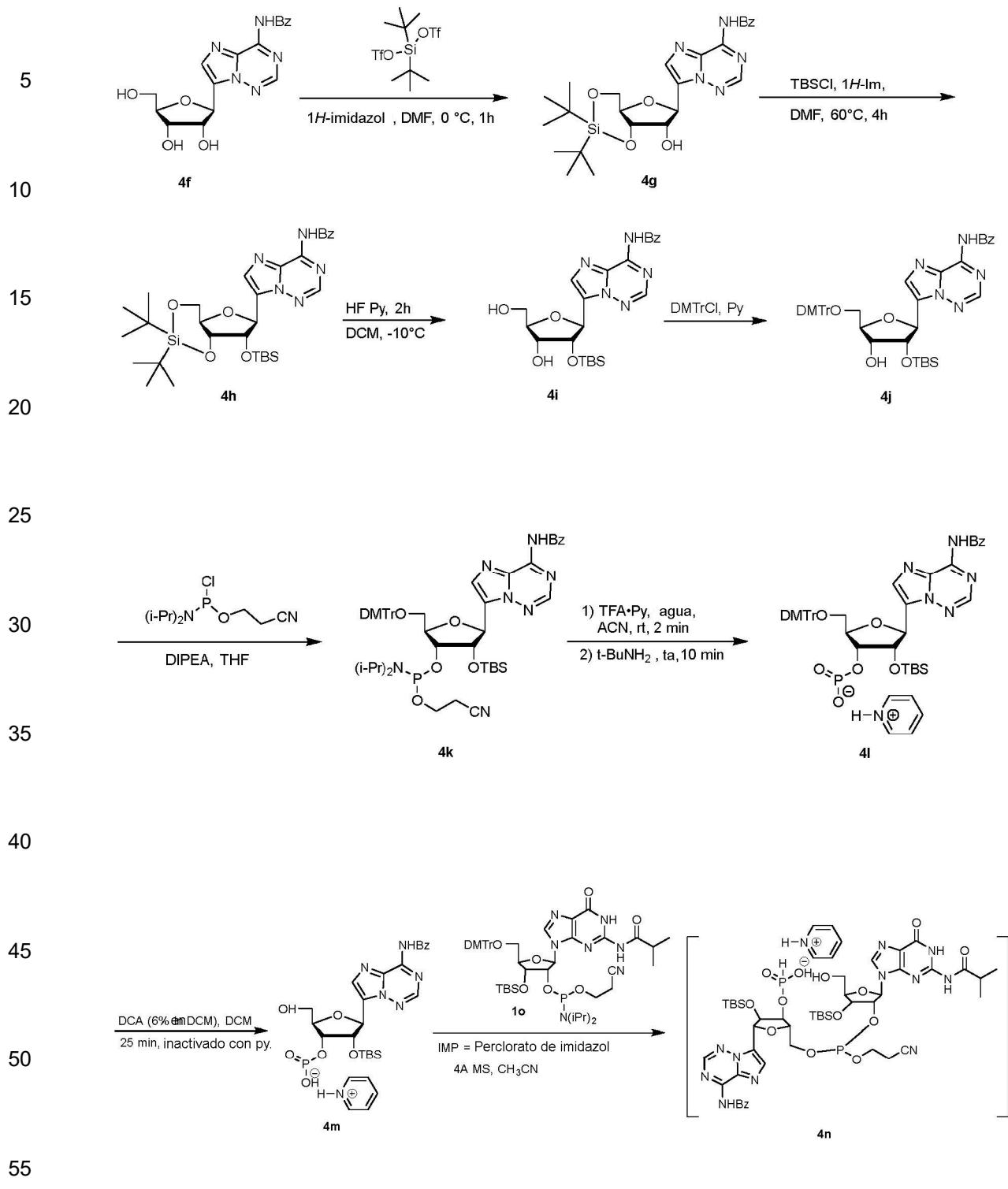
30

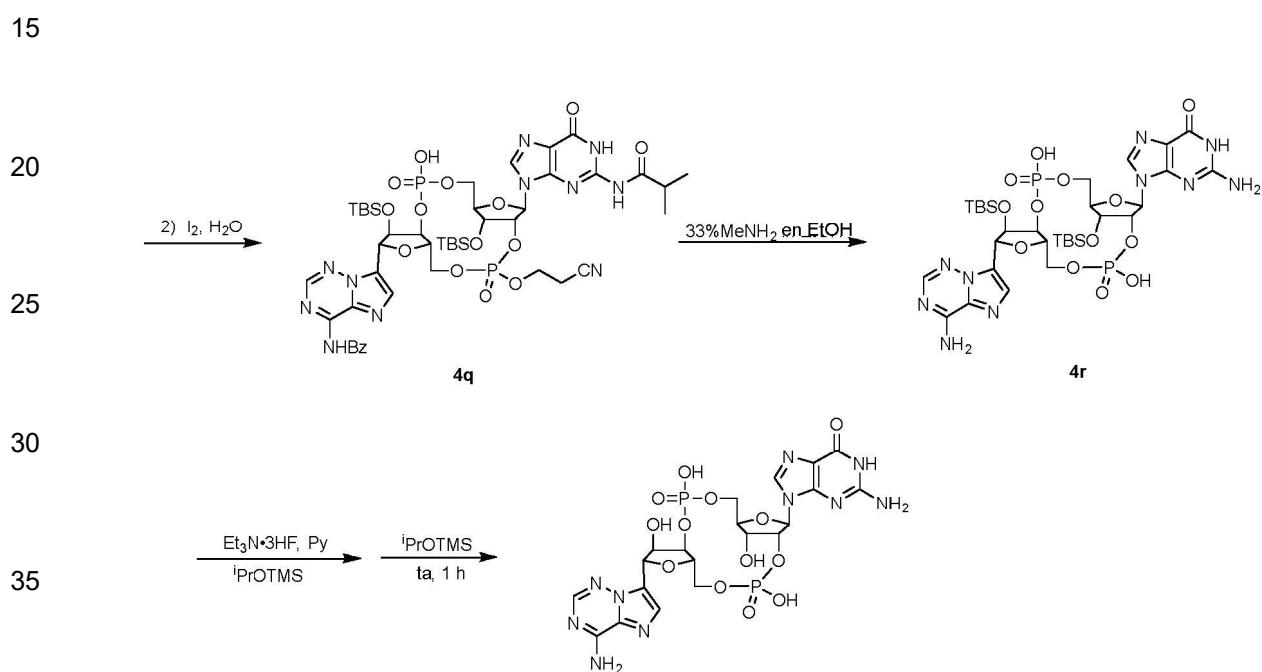
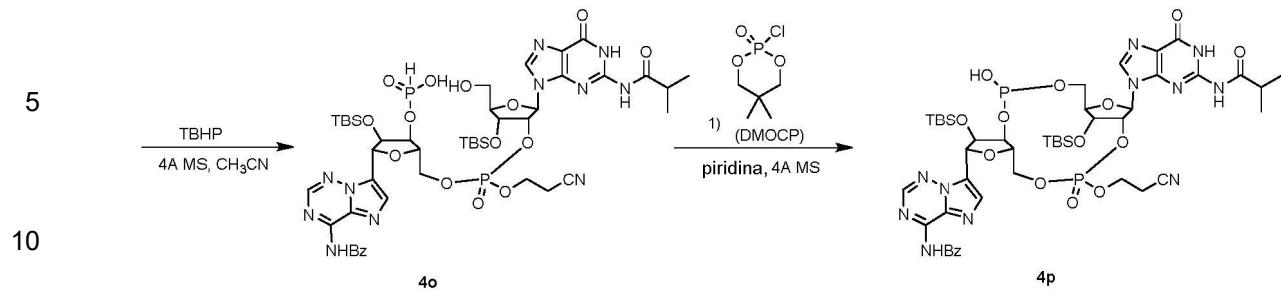
35

40

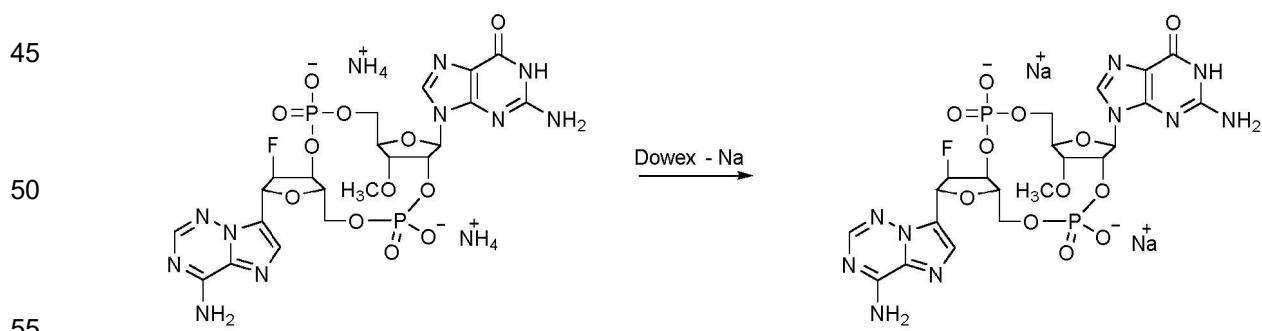
60

65



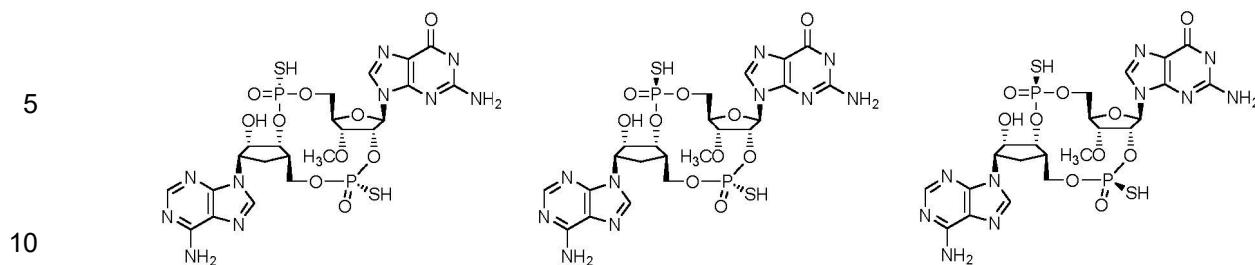
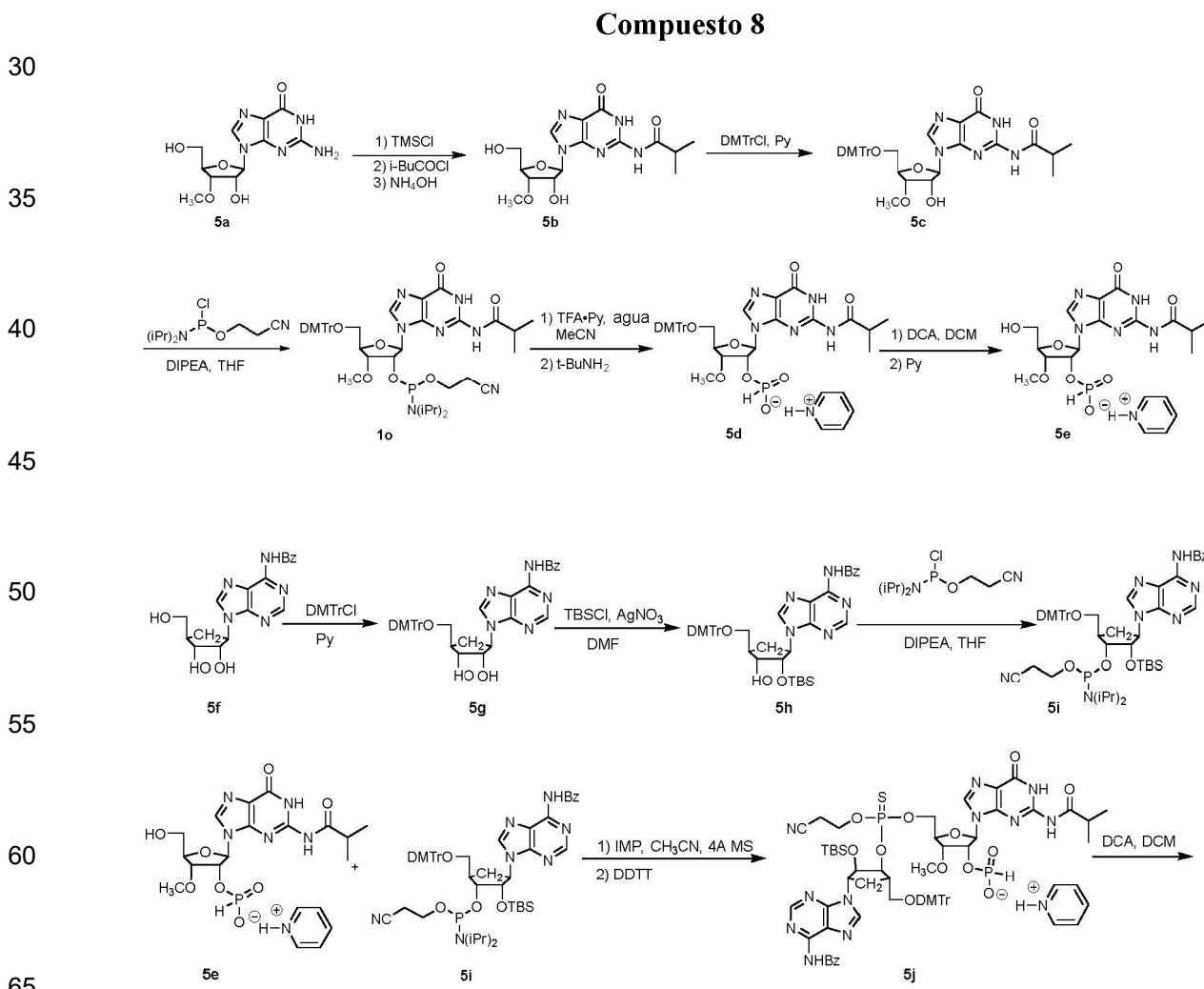


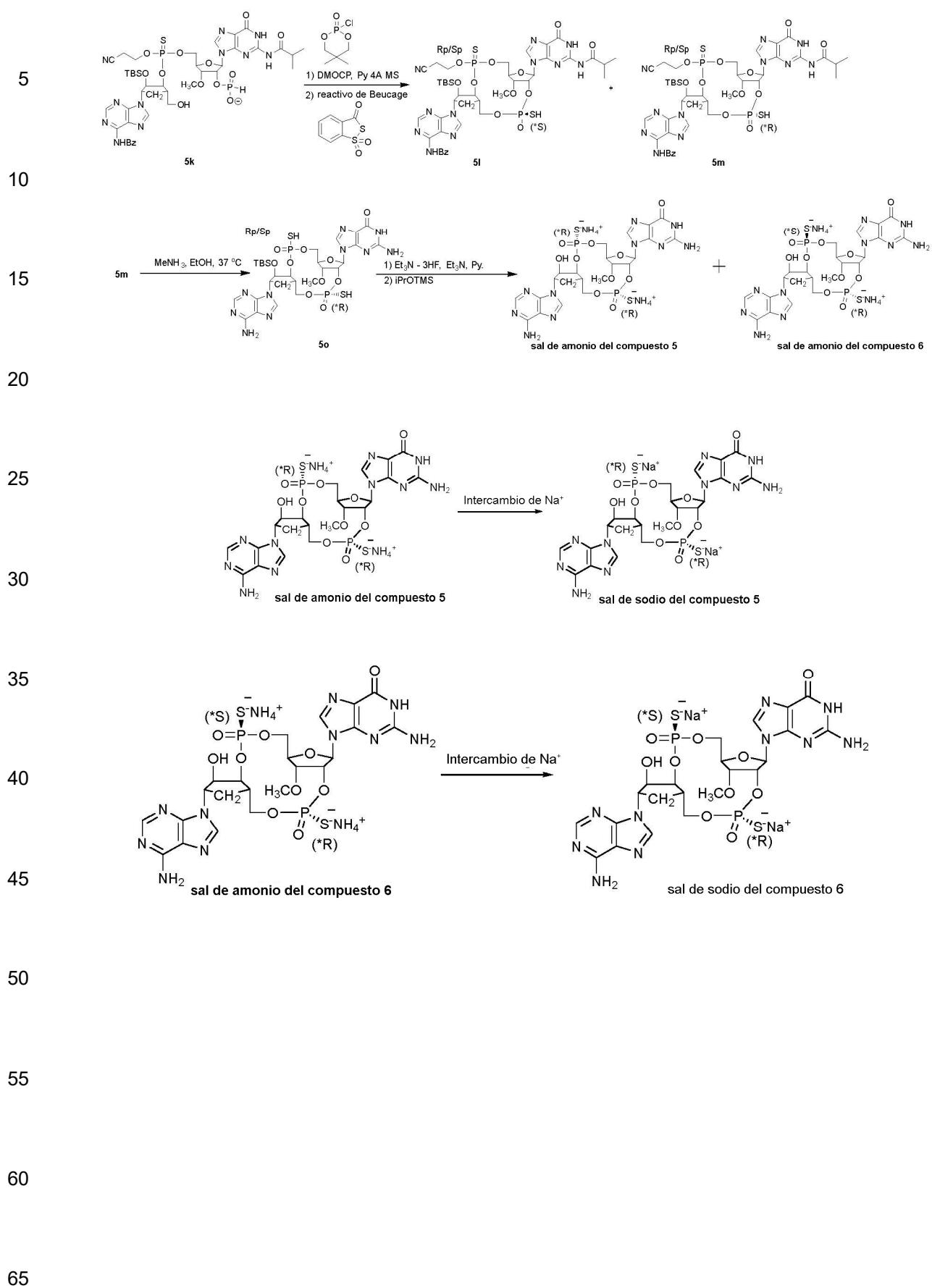
### Compuesto 4, sal de amonio

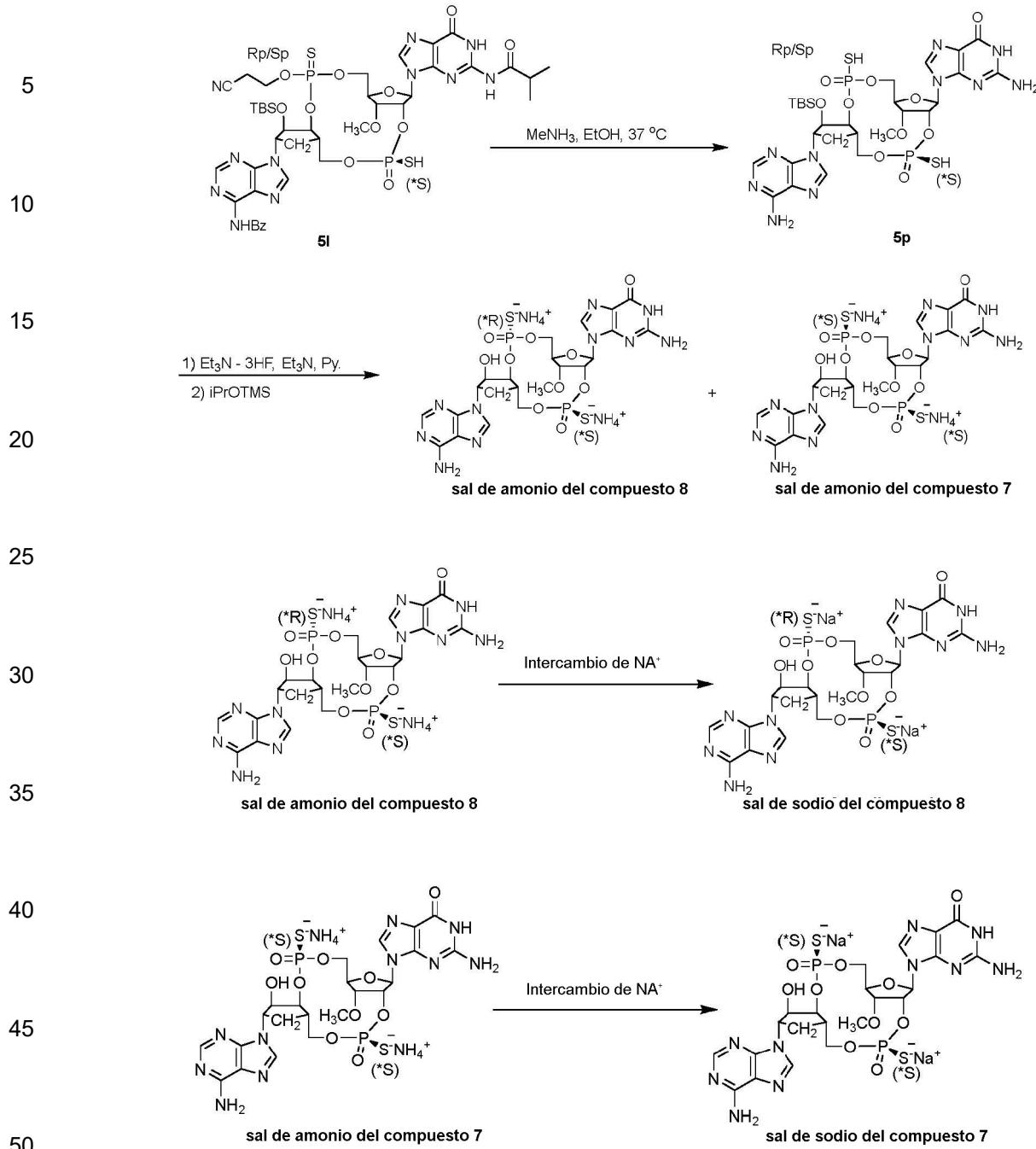


### Compuesto 4, sal de amonio

### Compuesto 4, sal de sodio

Ejemplo de referencia 5**Compuesto 5****Compuesto 6****Compuesto 7**





### Paso 1: Preparación del compuesto **5b**

55 A una solución del compuesto **5a** (10,0 g, 33,64 mmol) en piridina (250 ml) se le añadió gota a gota TMSCl (18,27 g, 168,20 mmol) a 0° C; después de agitar a 15° C durante 1 h, se añadió gota a gota cloruro de isobutililo (4,30 g, 40,37 mmol) a 15° C. Después de agitar a 15° C durante 2 h, la mezcla se inactivó con H<sub>2</sub>O (50 ml) a 0° C y se añadió NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O (50 ml) a 0° C. Después de 10 min, la mezcla se agitó a 15° C durante 0,5 h. Se repitió el procedimiento anterior (escala de 20 g del compuesto **5a**) y se combinaron las dos mezclas de reacción. Luego, las mezclas se concentraron a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH = 100/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **5b** (25,5 g) como un sólido blanco.

60

## Paso 2: Preparación del compuesto **5c**

65 A una solución del compuesto **5b** (24,5 g, 66,69 mmol) en piridina (500 ml) se le añadió cloruro de dimetoxitritilo (24,85 g, 73,36 mmol) a 0° C. Después de agitar a 25° C durante 2 h, la solución se concentró a

5 presión reducida para dar un residuo. El residuo se diluyó con acetato de etilo (500 ml) y se lavó con agua (300 ml x 3). La capa orgánica se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se combinó con otro lote (generado a partir de una escala de 2 g del compuesto **5b**) y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH=100/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **5c** (30,0 g) como un sólido amarillo. LCMS: m/z 670.2 [M+H]<sup>+</sup>.

10 Paso 3: Preparación del compuesto **1o**

15 A una solución del compuesto **5c** (1 g, 1,49 mmol) en THF (20 ml) se le añadió N-etyl-N-isopropilpropan-2-amina (1,16 g, 8,96 mmol) y 3-((cloro(diisopropilamino)-fosfino)oxi)propanonitrilo (1,11 g, 4,48 mmol, 3 eq.) a 0° C. Despues de agitar durante 2 h a 25° C, la mezcla de la reacción se inactivó añadiendo agua (30 ml) y se diluyó con acetato de etilo (30ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida

20 (DCM/EA = 10/1 a 2/1) para proporcionar el compuesto **1o** (0,99 g) como un sólido blanco. LCMS:ESI-MS: m/z 787.4 [M+H]<sup>+</sup>.

25 Paso 4: Preparación del compuesto **5d**

30 A una solución del compuesto **1o** (0,99 g, 1,14 mmol) en acetonitrilo (7 ml) se le añadió agua (0,041 g, 2,28 mmol) y trifluoroacetato de piridinio (0,263 g, 1,37 mmol). Se añadió terc-butilamina (7 ml) y la mezcla de la reacción se agitó durante 15 min a 25° C. Luego, la mezcla se concentró a presión reducida para dar una espuma. La espuma se disolvió en CH<sub>3</sub>CN (10,0 ml), se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto **5d** (0,925 g) como una espuma blanca que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.

35 Paso 5: Preparación del compuesto **5e**

30 A una solución del compuesto **5d** (0,925 g, 1,14 mmol) en diclorometano (20 ml) y agua (0,205 g, 11,38 mmol) se le añadió ácido 2,2-dicloroacético (20 ml, 6% en DCM). Despues de agitar a 25° C durante 20 min, la mezcla se inactivó con piridina (3 ml) y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH = 10/1 a 5/1) para proporcionar el compuesto **5e** (0,43 g, 0,84 mmol) como una espuma blanca. LC-MS: ESI-MS: m/z 432.2 [M + H]<sup>+</sup>.

35 Paso 6: Preparación del compuesto **5g**

40 A una solución del compuesto **5f** (4 g, 10,83 mmol) en piridina (40 ml) se le añadió 4,4'-(cloro(fenil)meleno)bis(metoxibenceno) (4,4 g, 12,99 mmol) a 25° C. Despues de agitar a 25° C durante 2 h, la mezcla de la reacción se inactivó con metanol (5 ml) y luego se concentró a presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH = 50/1 a 20/1) para dar el compuesto **5g** (6,3 g) como una espuma amarilla. LCMS:ESI-MS: m/z 672.3 [M + H]<sup>+</sup>.

45 Paso 7: Preparación del compuesto **5h**

50 A una solución del compuesto **5g** (0,5 g, 0,74 mmol) en N,N-dimetilformamida (8 ml) se le añadió terc-butilclorodimetilsilano (0,17 g, 1,12 mmol) y 1H-imidazol (0,15 g, 2,23 mmol) a 25° C. Despues de agitar a 25° C durante 12 h, la mezcla de la reacción se inactivó con metanol (2 ml) y se diluyó con acetato de etilo (40 ml); la capa orgánica se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (20 ml x 2), salmuera (20 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH = 50/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **5h** (0,14 g) como un aceite amarillo. LCMS:ESI-MS: m/z 786.8 [M + H]<sup>+</sup>.

55 Paso 8: Preparación del compuesto **5i**

60 A una solución del compuesto **5h** (0,5 g, 0,64 mmol) en THF (9 ml) se le añadió a 0° C N-etyl-N-isopropilpropan-2-amina (0,49 g, 3,82 mmol) y 3-((cloro (diisopropil-amino)fosfino)oxi)propanonitrilo (0,45 g, 1,91 mmol). Despues de agitar durante 12 horas a 25° C, la mezcla de la reacción se inactivó con MeOH (3 ml), se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sucesivamente sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y concentraron bajo presión para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (DCM/EA = 10/1 a 1/1) para proporcionar el compuesto **5i** (0,48 g, 0,49 mmol) como un sólido blanco. LCMS:ESI-MS: m/z 903.5 [MH-iPr<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

65 Paso 9: Preparación del compuesto **5j**

65 A una solución del compuesto **5e** (0,25 g, 0,49 mmol) en acetonitrilo (10 ml) se le añadieron tamices

moleculares 4A; la mezcla resultante se agitó a 25° C durante 10 min. Se añadió perclorato de 1H-imidazol (0,42 g, 2,45 mmol) y la mezcla se agitó durante otros 10 min a 25° C. Se añadió el compuesto **5i** (0,48 g, 0,49 mmol) y la mezcla se agitó a 25° C durante 1 h. Luego se añadió N,N-dimetil-N'-(5-sulfaniliden-1,2,4-ditiazol-3-il)-metanimidamida (DDTT) (0,5 g, 2,45 mmol) y la mezcla se agitó a 25° C durante otra hora. La mezcla de la reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna ultrarrápida (DCM/metanol = 10/1 a 3/1) para proporcionar el compuesto **5j** (0,42 g) como un sólido blanco.

5 Paso 10: Preparación del compuesto **5k**

10 A una solución del compuesto **5j** (0,42 g, 0,31 mmol) en diclorometano (20 ml) y agua (0,056 g, 3,115 mmol, 10 eq.) se le añadió ácido 2,2-dicloroacético (6% en DCM, 20 ml). Despues de agitar a 25° C durante 20 min, la mezcla se inactivó con piridina (3 ml), luego se concentró a presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH = 10/1 a 2/1) para proporcionar el compuesto **5k** (0,29 g) como un sólido blanco. LCMS:ESI-MS: m/z= 1046.5[M+1]<sup>+</sup>;

15 Paso 11: Preparación del compuesto **5l** y **5m**

20 A una solución del compuesto **5k** (0,34 g, 0,32 mmol) en piridina (80 ml) se le añadió 2-óxido de 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosfinano (0,18 g, 0,97 mmol); la mezcla resultante se agitó a 25° C durante 1 h. Luego se añadió 1,1-dióxido de 3H-benzo[c][1,2]ditiol-3-ona (0,325 g, 1,62 mmol) y la mezcla se agitó a 25° C durante 1 h. La reacción de la mezcla se concentró a presión baja; el residuo se purificó por HPLC preparativa (Columna: Agela DuraShell 150 mm x 25 mm x 5 μm; agua (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM) v/v) (A) - CH<sub>3</sub>CN (B); del 37% al 67% de B; Caudal: 25 ml/min) para obtener dos fracciones que incluyen una mezcla de análogos **5m** (46 mg) y **5l** (59 mg) como sólidos blancos. Luego, cada fracción se llevó a cabo por separado. LCMS:ESI-MS: m/z 1060,3 [M+H]<sup>+</sup>. (compuesto **5m**); LCMS:ESI-MS: m/z 1060,4 [M+H]<sup>+</sup>. (compuesto **5l**).

25 Paso 12: Preparación del compuesto **5o**

30 Se trató el compuesto **5m** (80 mg, 0,075 mmol) con metanamina (8 ml, 35% en EtOH); después de agitar a 25° C durante 12 h, la mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto **5o** (62,8 mg) que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.

35 Paso 13: Preparación de los compuestos **5** y **6**

40 A una solución del compuesto **5o** (62,8 mg, 0,075 mmol) en piridina (8 ml), se le añadió trietilamina (0,46 g, 4,53 mmol) y trihidrofluoruro de trietilamina (0,37 g, 2,26 mmol); la mezcla resultante se agitó a 50° C durante 10 h. Se añadió isopropoxitrimetilsilano (0,99 g, 7,55 mmol) a 15° C y la mezcla se agitó durante otras 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC preparativa (Columna: Agela DuraShell 150 mm x 25 mm x 5μm; agua (hidróxido amónico al 0,05% v/v) (A) - CH<sub>3</sub>CN (B); del 1% al 16% de B; Caudal: 25 ml/min) para proporcionar la sal de amonio del compuesto **5** (27 mg) y la sal de amonio del compuesto **6** (11 mg) como sólidos blancos. LCMS:ESI-MS: m/z 718.8 [M+H]<sup>+</sup>. (compuesto **5**); LCMS: ESI-MS: m/z 718.8 [M+H]<sup>+</sup>. (compuesto **6**).

45 Paso 14: Preparación de sal de sodio de **5**

50 Se añadió un volumen de 20 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 58 mg del compuesto **5**) y se lavó con H<sub>2</sub>O DI (2x). Luego se añadió a la resina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en H<sub>2</sub>O DI (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en H<sub>2</sub>O DI y se lavó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna), y luego con H<sub>2</sub>O DI hasta que se volvió neutra. La resina se transfirió de nuevo al vaso de precipitados y se añadió NaOH al 15% en solución de H<sub>2</sub>O (50 ml); la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en H<sub>2</sub>O (por lo menos 4 volúmenes de columna) y luego con H<sub>2</sub>O hasta que se volvió neutra (por lo menos 4 volúmenes de columna). La **sal de amonio del compuesto 5** se disolvió en agua DI (58 mg en 5 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua DI. Se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para proporcionar la **sal de sodio del compuesto 5** (55,1 mg) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ=8.39 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 5.98 (d, J=8.5 Hz, 1H), 5.50 (ddd, J=4.3, 8.7, 12.9 Hz, 1H), 5.09-5.02 (m, 1H), 4.91 (q, J=7.4 Hz, 1H), 4.74 (dd, J=4.8, 6.3 Hz, 1H), 4.58 (br s, 1H), 4.32 (d, J=4.3 Hz, 1H), 4.30-4.17 (m, 3H), 4.05-3.97 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.82-2.68 (m, 2H), 1.93-1.82 (m, 1H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ=57.599, 54.556; LCMS:ESI-MS: m/z 718.8 [M+H]<sup>+</sup>.

60 Paso 15: Preparación de sal de sodio de **6**

65 Se añadió un volumen de 8 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 22 mg del **compuesto 6**) y se lavó con H<sub>2</sub>O DI (2x). Luego se añadió a la resina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en H<sub>2</sub>O DI (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en H<sub>2</sub>O DI

5 y se lavó con  $H_2SO_4$  al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna), y luego con  $H_2O$  DI hasta que se volvió neutra. La resina se transfirió de nuevo al vaso de precipitados y se añadió  $NaOH$  al 15% en solución de  $H_2O$  (50 ml); la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con  $NaOH$  al 15% en  $H_2O$  (por lo menos 4 volúmenes de columna) y luego con  $H_2O$  hasta que se volvió neutra (por lo menos 4 volúmenes de columna). La **sal de amonio del compuesto 6** se disolvió en agua DI (39 mg en 5 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua DI. **6** se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para proporcionar la **sal de sodio del compuesto 6** (10,1 mg) como un sólido blanco.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ =8.47 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 5.95 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 5.77 (ddd,  $J$ =4.3, 8.4, 12.7 Hz, 1H), 5.13-5.05 (m, 1H), 4.97-4.90 (m, 1H), 4.58 (br s, 1H), 4.53 (t,  $J$ =3.9 Hz, 1H), 4.47-4.38 (m, 1H), 4.29 (d,  $J$ =4.5 Hz, 1H), 4.24 (td,  $J$ =5.4, 10.6 Hz, 1H), 4.12 (br d,  $J$ =12.3 Hz, 1H), 4.05 (br d,  $J$ =10.3 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 2.91-2.69 (m, 2H), 2.17-2.01 (m, 1H);  $^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ =55.896, 54.936; LCMS:ESI-MS: m/z 718.8 [M+H] $^+$ .

10 Ejemplo de referencia 5a

15 Paso 1: Preparación del compuesto **5p**

20 Se trató el compuesto **5l** (60 mg, 0,057 mmol) con metanamina (6 ml, 35% en EtOH); después de agitar a 25° C durante 12 h, la mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto **5p** (47,14 mg) que se usó para el paso siguiente sin purificación adicional.

25 Paso 2: Preparación de los compuestos **7** y **8**

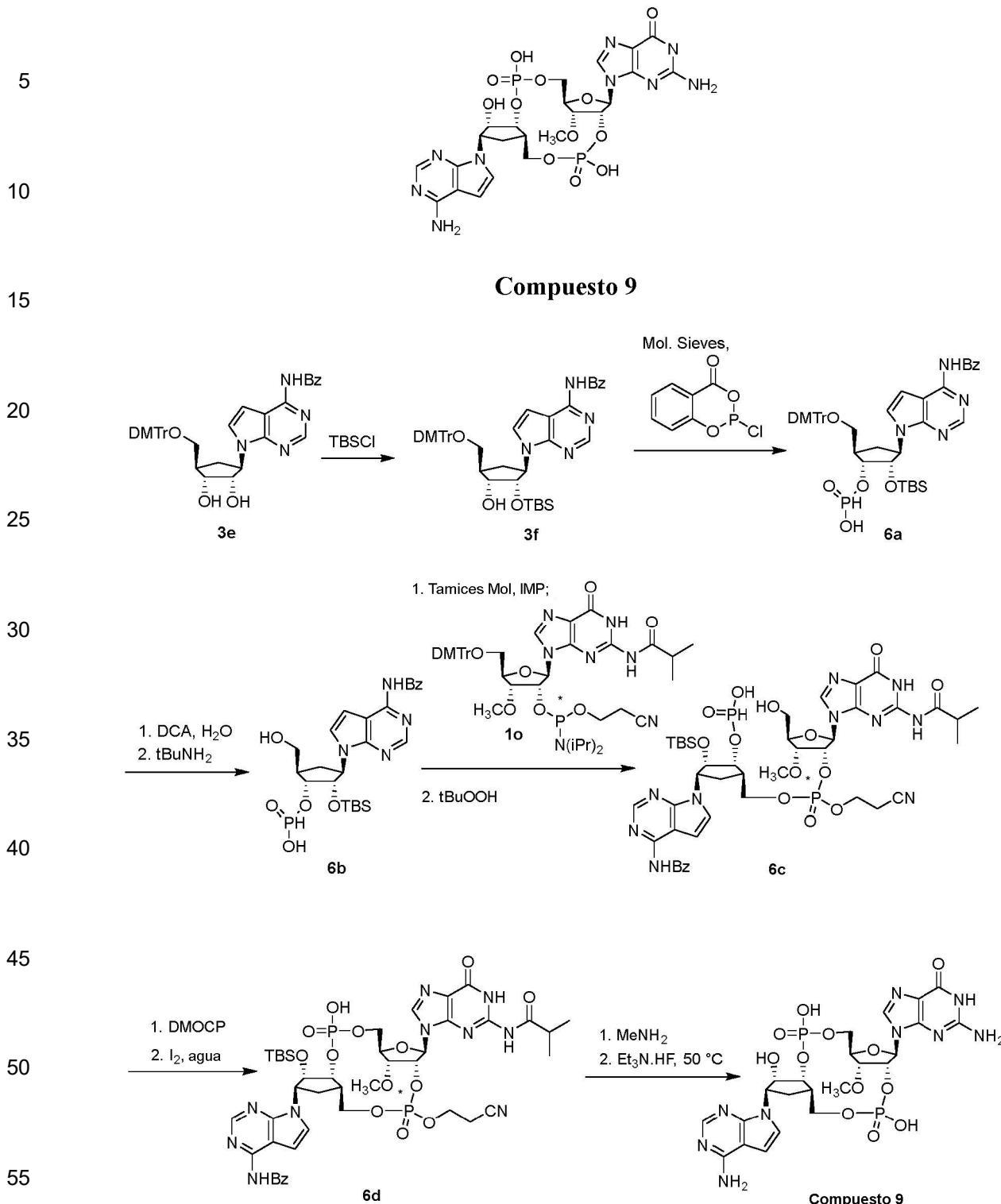
30 A una solución del compuesto **5p** (47,14 mg, 0,06 mmol) en piridina (5 ml), se le añadió trietilamina (0,34 g, 3,4 mmol) y trihidrofluoruro de trietilamina (0,27 g, 1,7 mmol); la mezcla resultante se agitó a 50° C durante 10 h. Se añadió isopropoxitrimetilsilano (0,75 g, 5,66 mmol) a 15° C y la mezcla se agitó durante otras 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC preparativa (Columna: Agela DuraShell 150 mm x 25 mm x 5  $\mu$ m; agua (0,05% hidróxido amónico v/v) (A) -  $CH_3CN$  (B); del 1% al 16% de B; Caudal: 25 ml/min) para proporcionar la sal de amonio del compuesto **7** (8 mg) y la sal de amonio del compuesto **8** (19 mg) como sólidos blancos. LCMS:ESI-MS: m/z 718.8 [M+H] $^+$ . (compuesto **8**); LCMS: ESI-MS: m/z 718.8 [M+H] $^+$ . (compuesto **7**).

35 Paso 3: Preparación de **sal de sodio de 7**

40 Se añadió un volumen de 8 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 20 mg del compuesto **7**) y se lavó con  $H_2O$  DI (2x). Luego se añadió a la resina  $H_2SO_4$  al 15% en  $H_2O$  DI (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con  $H_2SO_4$  al 15% en  $H_2O$  DI y se lavó con  $H_2SO_4$  al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna), y luego con  $H_2O$  DI hasta que se volvió neutra. La resina se transfirió de nuevo al vaso de precipitados y se añadió  $NaOH$  al 15% en solución de  $H_2O$  (50 ml); la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con  $NaOH$  al 15% en  $H_2O$  (por lo menos 4 volúmenes de columna) y luego con  $H_2O$  hasta que se volvió neutra (por lo menos 4 volúmenes de columna). La **sal de amonio del compuesto 7** se disolvió en agua DI (39 mg en 5 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua DI. **7** se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para proporcionar la **sal de sodio del compuesto 7** (15,5 mg) como un sólido blanco.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ =8.32 (s, 1H), 8.25 (s, 2H), 6.00 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 5.57-5.42 (m, 1H), 4.98-4.83 (m, 3H), 4.63 (br s, 1H), 4.44 (d,  $J$ =4.0 Hz, 1H), 4.24 (br s, 2H), 4.14 (br d,  $J$ =5.0 Hz, 2H), 3.62 (s, 3H), 2.85-2.64 (m, 2H), 2.04-1.91 (m, 1H);  $^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  54.121, 52.853; ESI-MS: m/z 718.8 [M+H] $^+$ .

45 Paso 4: Preparación de **sal de sodio de 8**

50 Se añadió un volumen de 8 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 39 mg del compuesto **8**) y se lavó con  $H_2O$  DI (2x). Luego se añadió a la resina  $H_2SO_4$  al 15% en  $H_2O$  DI (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con  $H_2SO_4$  al 15% en  $H_2O$  DI y se lavó con  $H_2SO_4$  al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna), y luego con  $H_2O$  DI hasta que se volvió neutra. La resina se transfirió de nuevo al vaso de precipitados y se añadió  $NaOH$  al 15% en solución de  $H_2O$  (50 ml); la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con  $NaOH$  al 15% en  $H_2O$  (por lo menos 4 volúmenes de columna) y luego con  $H_2O$  hasta que se volvió neutra (por lo menos 4 volúmenes de columna). La **sal de amonio del compuesto 8** se disolvió en agua DI (39 mg en 5 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua DI. **8** se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para proporcionar la **sal de sodio del compuesto 8** (25,8 mg) como un sólido blanco.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ =8.21 (d,  $J$ =2.3 Hz, 2H), 7.91 (s, 1H), 5.90 (d,  $J$ =8.8 Hz, 1H), 5.83-5.74 (m, 1H), 5.01 (dt,  $J$ =4.1, 8.1 Hz, 1H), 4.88-4.83 (m, 1H), 4.59 (br s, 1H), 4.49-4.38 (m, 2H), 4.32 (d,  $J$ =4.3 Hz, 1H), 4.28-4.20 (m, 1H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.89-2.70 (m, 2H), 2.13-2.03 (m, 1H);  $^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ =54.483, 52.291; LCMS: ESI-MS: m/z 718.8 [M+H] $^+$ .

Ejemplo de referencia 6**Paso 1: Preparación del producto intermedio 3f**

60 Se disolvieron diol **3e** ([1834500-45-6], 27,2 g, 40,6 mmol) e imidazol (8,3 g, 121,7 mmol) en DCM (600 ml), seguido de la adición de cloruro de terc-butildimetilsililo (10,4 g, 69,0 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, después de lo cual se vertió en NaHCO<sub>3</sub> acuoso y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (gradiente de elución: 0-50% de EtOAc en éter de petróleo) para dar una mezcla del producto intermedio 1b y su isómero 3'-hidroxilo

5 protegido (no se muestra la estructura) (25 g en total, rendimiento: 79%). Esta mezcla regiosomérica se separó mediante HPLC preparativa de fase inversa (fase estacionaria: Phenomenex Synergi, 10  $\mu$ m Max-RP, 250 x 50 mm; fase móvil:  $H_2O$  (A) - MeCN (B); elución isocrática: 92% de B, caudal: 110 ml/min) para dar el producto intermedio puro **3f** como el primer isómero eluido (12 g, rendimiento: 37%).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-d6)  $\delta$  ppm -0.42 (s, 3H), -0.21 (s, 3H), 0.62 (s, 9H), 1.89-2.02 (m, 1H), 2.17-2.30 (m, 2H), 3.07-3.15 (m, 1H), 3.15-3.23 (m, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.83-3.90 (m, 1H), 4.41 (dd,  $J$ =8.8, 5.3 Hz, 1H), 4.45 (d,  $J$ =5.3 Hz, 1H), 5.03-5.15 (m, 1H), 6.64 (d,  $J$ =3.5 Hz, 1H), 6.91 (d,  $J$ =8.8 Hz, 4H), 7.23 (t,  $J$ =7.5 Hz, 1H), 7.27-7.38 (m, 6H), 7.45 (d,  $J$ =7.1 Hz, 2H), 7.49 (d,  $J$ =3.5 Hz, 1H), 7.54 (t,  $J$ =7.5 Hz, 2H), 7.63 (t,  $J$ =7.1 Hz, 1H), 8.06 (d,  $J$ =7.1 Hz, 2H), 8.48 (s, 1H), 11.05 (br s, 1H); ESI-MS: m/z 785.3 [M+H]<sup>+</sup>

10 Paso 2: Preparación del producto intermedio **6a**

15 Se añadieron 2 g de 4Å MS activado a una solución del producto intermedio **3f** (2,5 g, 3,2 mmol) en piridina (12,5 ml) y 1,4-dioxano (35 ml), la mezcla de la reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadió una solución de 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforin-4-ona (1,26 g, 6,2 mmol) en 1,4-dioxano seco (2,5 ml) y se continuó agitando durante 30 min. La mezcla de la reacción se inactivó añadiendo 15 ml de una mezcla 1/1 de agua y piridina, seguido de una cantidad extra de agua (50 ml). La mezcla obtenida se filtró y se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> acuoso, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío para dar el producto intermedio bruto **6a** como un sólido blanco (3,3 g). El producto bruto se usó como tal en el paso siguiente sin purificación.

20 ESI-MS: m/z 849.2 [M+H]<sup>+</sup>

25 Paso 3: Preparación del producto intermedio **6b**

30 A una solución del producto intermedio bruto **6a** (6,5 g, 5,7 mmol) en DCM (80 ml) se le añadió  $H_2O$  (1,0 ml, 56,7 mmol) y ácido dicloroacético (1,46 g, 11,3 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió una cantidad extra de ácido dicloroacético (472  $\mu$ l, 5,7 mmol) y se continuó agitando durante 20 min. La reacción se inactivó mediante la adición de terc-butilamina (26 ml, 248,1 mmol) y se concentró al vacío. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (gradiente de elución: MeOH al 0-30% en DCM) para dar el producto intermedio 1d como un sólido blanco (3 g, rendimiento: 82%). El producto intermedio **6b** se convirtió en la correspondiente sal de terc-butilamonio agitándolo como una solución en DCM (30 ml) durante 1 hora en presencia de terc-butilamina, seguido de concentración a presión reducida y secado a alto vacío.  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-d6)  $\delta$  ppm -0.4 (s, 3H), -0.1 (s, 3H), 0.6 (s, 9H), 1.3 (s, 9H), 1.7-1.8 (m, 1H), 2.2 (dt,  $J$ =12.9, 8.6 Hz, 1H), 2.3-2.4 (m, 1H), 3.5-3.6 (m, 2H), 4.2-4.4 (m, 2H), 5.1-5.2 (m, 1H), 5.8 (br s, 1H), 6.7 (d,  $J$ =583.9 Hz, 1H), 6.7 (d,  $J$ =3.7 Hz, 1H), 7.5 (t,  $J$ =7.7 Hz, 2H), 7.6-7.7 (m, 2H), 8.0 (br s, 3H), 8.1 (d,  $J$ =7.3 Hz, 2H), 8.5 (s, 1H), 11.0 (br s, 1H); ESI-MS: m/z 547.0 [M+H]<sup>+</sup>.

40 Paso 4: Preparación del producto intermedio **6c**

45 Se añadió perclorato de 1H-imidazolio (IMP, 2,4 g, 14,0 mmol) a una solución del producto intermedio **6b** (500 mg, 0,81 mmol) en MeCN anhídrico (23 ml) bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, tras lo cual se obtuvo una solución de 5'-O-(4,4-dimetoxitritil)-N2-isobutiril-3'-O-metilguanosina-2'-(2-cianoethyl-N,N-diisopropilfosforamidita) ([179479-04-0], 1,4 g, 1,56 mmol) en MeCN anhídrico (2 ml). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se añadió tBuOOH (5,5 M en decano, 0,71 ml, 3,9 mmol) y se continuó agitando durante 1 hora. La mezcla de la reacción se filtró y se concentró a presión reducida para dar un aceite incoloro que se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (fase estacionaria: Waters XBridge, 5  $\mu$ m, 150 x 25 mm; fase móvil:  $H_2O$  (A) - MeCN (B); elución en gradiente: 18%-48% de B en A, caudal: 25 ml/min) para proporcionar el producto intermedio **6c** (250 mg, rendimiento: 31%). ESI-MS: m/z 515.4 [(M+H)/2]<sup>+</sup>.

50 Paso 5: Preparación del producto intermedio **6d**

55 Se añadió DMOCP (52 mg, 0,29 mmol) a una solución del producto intermedio **6c** (100 mg, 0,095 mmol) en piridina (60 ml), la mezcla de la reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadieron agua (17 mg, 0,95 mmol) e I<sub>2</sub> (120 mg, 0,48 mmol) y se continuó agitando durante 1 hora. La reacción se inactivó con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> acuoso (8 ml), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (fase estacionaria: Waters XBridge, 5  $\mu$ m, 150 x 25 mm; fase móvil: bicarbonato amónico acuoso 10 mM (A) - MeCN (B); gradiente de elución 17-47% de B en A; caudal: 25 ml/min) para dar el producto intermedio If (250 mg, 0,238 mmol) como un sólido blanco. Se repitió el procedimiento anterior usando una escala similar para generar una cantidad total de 100 mg (rendimiento: 46%) del producto intermedio **6d**. ESI-MS: m/z 1027,4 [M+H]<sup>+</sup>.

60 Paso 6: Preparación del compuesto **9**

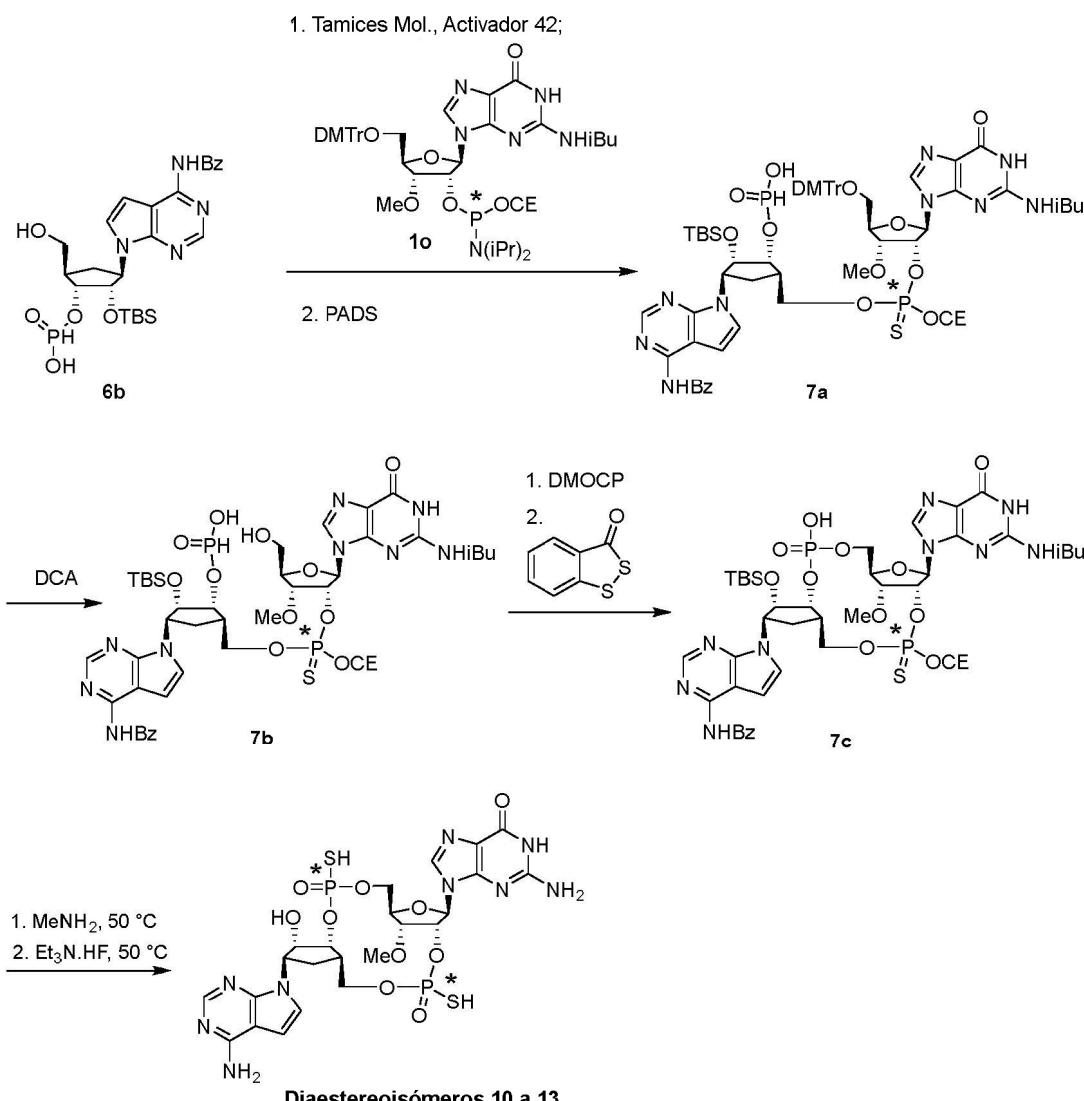
65 El producto intermedio **6d** (100 mg, 0,97 mmol) se agitó en una solución de metilamina al 33% en etanol (40 ml) a temperatura ambiente durante 6 horas, después de lo cual la mezcla de la reacción se concentró a presión

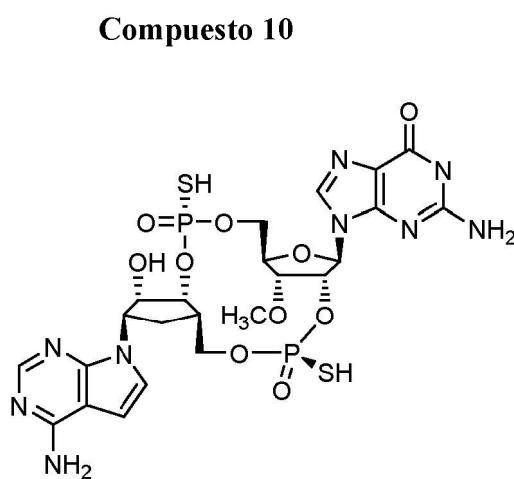
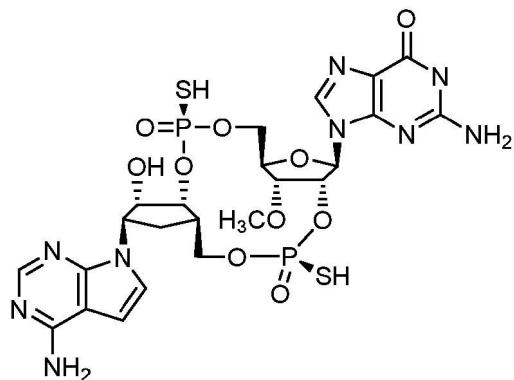
reducida. Este procedimiento se repitió en una escala de 68 mg. La cantidad total de producto bruto obtenido se disolvió en piridina (8 ml), seguido de la adición de trietilamina (1,1 g, 10,5 mmol) y trihidrofluoruro de trietilamina (847 mg, 5,25 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 50°C durante 12 horas, después de lo cual se enfrió a temperatura ambiente; Se añadió isopropoxitrimetilsilano (2,8 g, 21,0 mmol) y se continuó agitando durante otras 12 horas. El residuo obtenido después de la concentración a presión reducida se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (Fase estacionaria: Agela Durashell C18, 5 μm, 150 x 25 mm; Fase móvil: 0,05% de hidróxido de amoníaco acuoso (A) - MeCN (B); gradiente de elución: 0-15% de B en A, caudal: 35 ml/min) para dar el **compuesto 9** como la sal de amonio (60 mg, 50%). La conversión en la **sal de sodio del compuesto 9** se realizó por elución de una solución acuosa sobre una columna compactada con resina en forma de Na<sup>+</sup> Dowex® 50WX8. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 1.28-1.41 (m, 1H), 2.22-2.39 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.55-3.65 (m, 1H), 3.75 (br d, J=11.4 Hz, 1H), 3.90-4.00 (m, 1H), 4.03 (d, J=4.1 Hz, 1H), 4.14 (br s, 1H), 4.36 (dd, J=10.0, 3.9 Hz, 1H), 4.76-4.84 (m, 1H), 4.90 (q, J=9.5 Hz, 1H), 5.35 (td, J=9.2, 4.1 Hz, 1H), 5.81 (d, J=8.5 Hz, 1H), 6.57 (br s, 2H), 6.65 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.37 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.65 (br s, 2H), 7.98 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 10.73 (s, 1H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d6) δ ppm 0.83 (s, 1P), 1.63 (s, 1P); ESI-MS: m/z 685.9 [M+H]<sup>+</sup>.

5  
10  
15

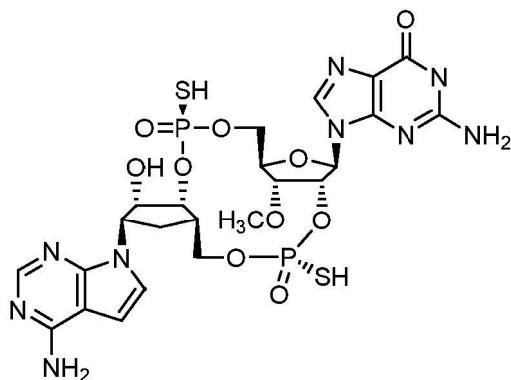
Ejemplo de referencia 7

20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

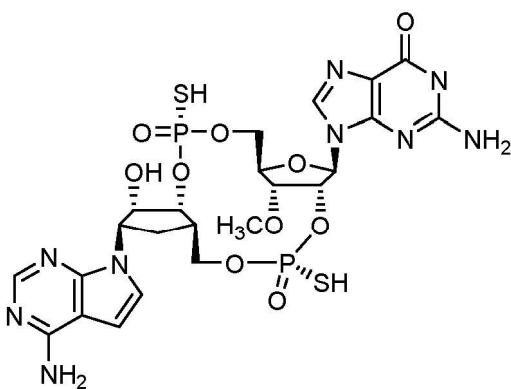




Compuesto 10



Compuesto 11



Compuesto 12

Compuesto 13

## Paso 1: Preparación del producto intermedio 7a

A la sal de terc-butilamonio del producto intermedio **6b** (700 mg, 1,13 mmol) y tamices moleculares activados se le añadió una solución de MeCN de Activador 42 ([175205-09-1], 9,9 ml de una solución 0,25 M, 2,49 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 75 min bajo nitrógeno, después de lo cual se añadió una solución de 5'-O-(4,4-dimetoxitritil)-N2-isobutiril-3'-O-metilguanosina-2'-(2-cianoethyl-N,N-diisopropilfosforamidita) **1o** (1,28 g en MeCN anhídrico (9 ml), 1,4 mmol, solución secada sobre tamices moleculares antes de su uso). La mezcla de la reacción se agitó durante 1 hora seguido de la adición de una porción extra de **1o** (248 mg en MeCN, 0,282 mmol, solución secada en tamices moleculares antes de su uso), después de una hora adicional de agitación, se añadió una tercera porción de 5'-O-(4,4-dimetoxitritil)-N2-isobutiril-3'-O-metilguanosina-2'-(2-cianoethyl-N,N-diisopropilfosforamidita) (98 mg en MeCN, 0,113 mmol, solución secada sobre tamices moleculares antes de su uso). Se continuó agitando durante una hora, después de lo cual la mezcla de la reacción se concentró a presión reducida. Se añadió piridina (10 ml), seguido de la adición de disulfuro de fenilacetilo (PADS, 854 mg, 2,82 mmol), la mezcla se agitó durante 1 hora. Los tamices moleculares se retiraron por filtración y se lavaron con DCM, el filtrado se concentró y el residuo resultante se coevaporó con MeCN. El producto bruto **7a** se usó como tal en el paso siguiente. ESI-MS: m/z 672,8 [M-H]<sup>-</sup>.

## Paso 2: Preparación del producto intermedio 7b

Se añadieron agua (204 µl, 11,3 mmol), trietilsilano (1,8 ml, 11,3 mmol) y ácido dicloroacético (370 µl, 4,5 mmol) a una solución del producto intermedio bruto **7a** en DCM (10 ml). La mezcla de la reacción se agitó durante 1 hora, seguido de inactivación con piridina (457, 5,6 mmol) y concentración a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (elución en gradiente: MeOH al 5-20% en DCM) para dar el producto intermedio **7b** (700 mg, pureza del 75%, rendimiento: 44%). ESI-MS: m/z 1045,3 [M+H]<sup>+</sup>.

## Paso 3: Preparación del producto intermedio 7c

Se añadió DMOCP (1,1 g, 6,0 mmol) a una solución del producto intermedio **7b** (625 mg, 0,60 mmol) en piridina (22 ml), la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Luego, se añadieron

agua (78 mg, (59,8 mmol) y 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (503 mg, 3,0 mmol) y se continuó agitando durante 40 minutos. La reacción se inactivó mediante la adición de salmuera y se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> acuoso, se secaron con MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el producto intermedio bruto **7c** que se usó como tal en el paso siguiente. ESI-MS: m/z 1059.3 [M H]<sup>+</sup>.

5

Paso 4: Preparación de los **compuestos diastereoisoméricos 10 a 13**

Se agitó el producto intermedio bruto **7c** en una solución de metilamina al 33% en etanol (30 ml) a 50° C durante 4 horas. El residuo obtenido tras la concentración a presión reducida se disolvió en una mezcla de trietilamina (4,2 ml) y piridina (4,8 ml), a la que se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (2,5 ml, 14,9 mmol). La mezcla de la reacción resultante se agitó a 50° C durante 3 horas y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente, seguido de la adición de isopropoxitrimetilsilano (3,2 ml, 17,9 mmol), la agitación se continuó durante una hora. Luego, se añadió agua y la fase acuosa resultante se lavó con EtOAc y se liofilizó. Se añadió metanol al liofilizado oleoso dando como resultado la precipitación de los **diastereoisómeros brutos 10 a 13**. La purificación por HPLC preparativa de fase inversa (fase estacionaria: XBridge C18 OBD, 5 µm, 250 x 30 mm; fase móvil: bicarbonato de amonio acuoso al 0,25% (A) - MeCN (B); elución en gradiente: 0-15% de B en A durante 45 min, caudal: 30 ml/min) dio los cuatro diastereoisómeros: compuesto **10** (20 mg, rendimiento: 4,5% del producto intermedio **7b**), compuesto **11** (18 mg, rendimiento: 4% del producto intermedio **7b**), compuesto **12** (44 mg, rendimiento: 10% del producto intermedio **7b**) y compuesto **13** (60 mg, rendimiento: 13,5% del producto intermedio **7b**). Todos se convirtieron en la sal de sodio correspondiente por elución de una solución acuosa sobre una columna compactada con resina con forma de Na<sup>+</sup> Amberlite IR. Compuesto **10** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 1.31-1.43 (m, 1H), 2.26 (dt, J=13.2, 9.1 Hz, 1H), 2.36-2.48 (m, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.57 (m, J=10.6 Hz, 1H), 3.76-3.91 (m, 2H), 4.01-4.14 (m, 2H), 4.18 (d, J=4.1 Hz, 1H), 4.37 (ddd, J=8.8, 4.1, 2.4 Hz, 1H), 4.90 (q, J=9.0 Hz, 1H), 5.00 (dt, J=10.2, 3.7 Hz, 1H), 5.33 (ddd, J=12.2, 8.8, 3.9 Hz, 1H), 5.60 (d, J=2.9 Hz, 1H), 5.81 (d, J=9.0 Hz, 1H), 6.37 (br s, 2H), 6.55 (d, J=3.3 Hz, 1H), 6.87 (br s, 2H), 7.23 (d, J=3.7 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 10.64 (br s, 1H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d6) δ ppm 53.49 (s, 1P), 55.64 (s, 1P); ESI-MS: m/z 717.1 [M+H]<sup>+</sup>.

Compuesto **11**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 1.31-1.42 (m, 1H), 2.22 (dt, J=13.3, 8.7 Hz, 1H), 2.52-2.60 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.71-3.80 (m, 2H), 3.83-3.90 (m, 2H), 4.12 (br q, J=2.0 Hz, 1H), 4.31 (d, J=3.7 Hz, 1H), 4.41 (dd, J=8.0, 4.7 Hz, 1H), 4.82 (dt, J=9.0, 4.1 Hz, 1H), 4.92 (q, J=9.0 Hz, 1H), 5.32 (ddd, J=11.0, 9.4, 4.1 Hz, 1H), 5.45 (br s, 1H), 5.81 (d, J=9.0 Hz, 1H), 6.45 (br s, 2H), 6.59 (d, J=3.7 Hz, 1H), 7.05 (br s, 2H), 7.29 (d, J=3.3 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 10.56 (s, 1H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d6) δ ppm 54.03 (s, 1P), 56.86 (s, 1P); ESI-MS: m/z 717.1 [M+H]<sup>+</sup>.

Compuesto **12**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 1.21-1.33 (m, 1H), 2.20-2.39 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.46-3.53 (m, 1H), 3.65 (br d, J=11.0 Hz, 1H), 3.92 (d, J=4.4 Hz, 1H), 3.99 (br t, J=11.0 Hz, 1H), 4.11-4.26 (m, 2H), 4.34 (dd, J=10.5, 3.9 Hz, 1H), 4.92 (q, J=9.9 Hz, 1H), 5.23 (dd, J=8.8, 3.7 Hz, 1H), 5.36 (ddd, J=12.7, 8.7, 4.3 Hz, 1H), 5.81 (d, J=9.0 Hz, 1H), 6.46 (br s, 2H), 6.65 (d, J=3.5 Hz, 1H), 7.34 (d, J=3.5 Hz, 1H), 7.31 (br s, 2H), 8.08 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 10.56 (s, 1H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d6) δ ppm 56.36 (s, 1P), 59.35 (s, 1P); ESI-MS: m/z 717.1 [M+H]<sup>+</sup>.

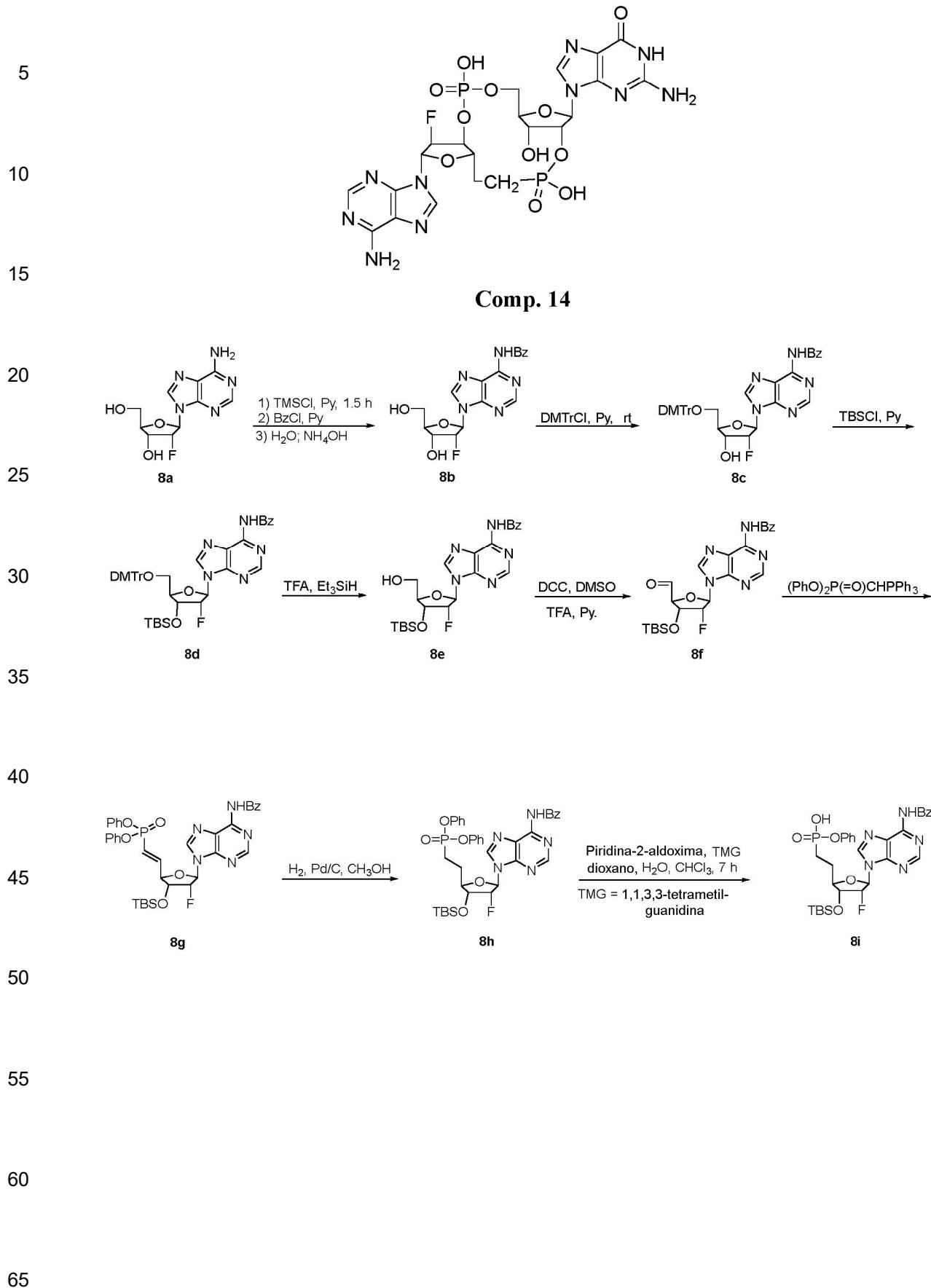
Compuesto **13**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 1.32 (br t, J=8.8 Hz, 1H), 2.24-2.41 (m, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.49-3.59 (m, 1H), 3.68 (br d, J=11.4 Hz, 1H), 3.85 (q, J=11.0 Hz, 1H), 3.93-4.05 (m, 2H), 4.95 (br s, 1H), 4.36 (dd, J=9.8, 4.1 Hz, 1H), 4.97 (dd, J=8.6, 4.1 Hz, 1H), 4.93 (q, J=9.0 Hz, 1H), 5.36-5.50 (m, 1H), 5.80 (d, J=9.0 Hz, 1H), 6.49 (br s, 2H), 6.74 (d, J=3.7 Hz, 1H), 7.50 (d, J=3.7 Hz, 1H), 7.83 (br s, 2H), 8.01 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 10.57 (s, 1H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, DMSO-d6) δ ppm 54.46 (s, 1P), 58.63 (s, 1P), 58.66 (s, 1P); ESI-MS: m/z 717.1 [M+H]<sup>+</sup>.

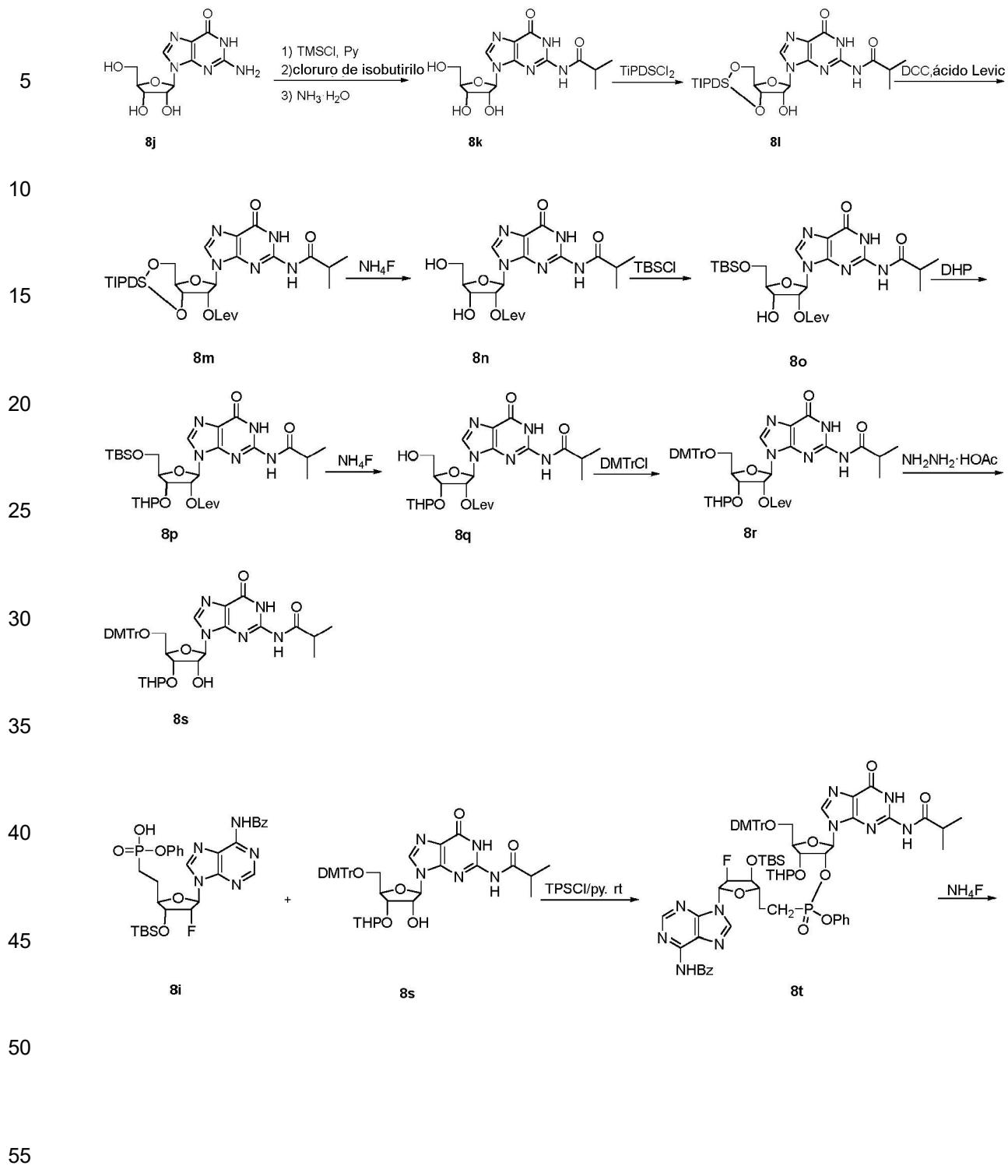
El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 8 describe una ruta posible para la preparación del compuesto **14** y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

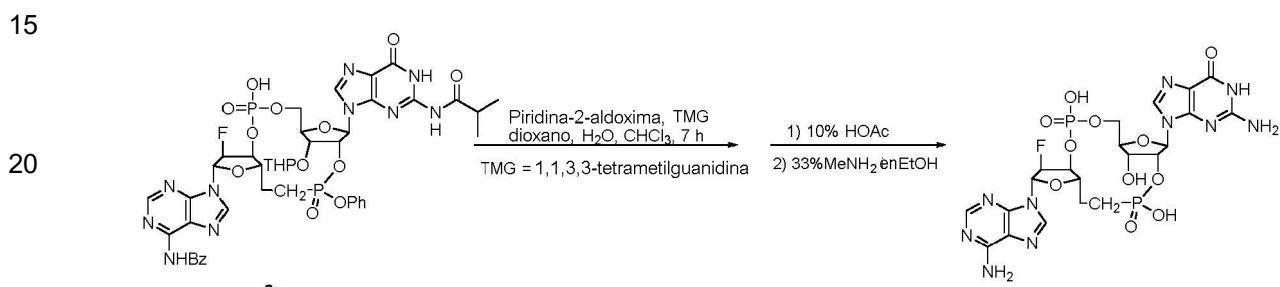
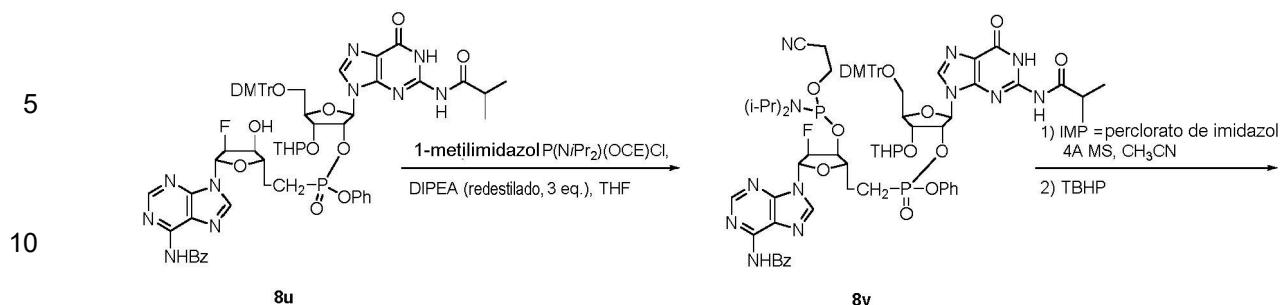
55

60

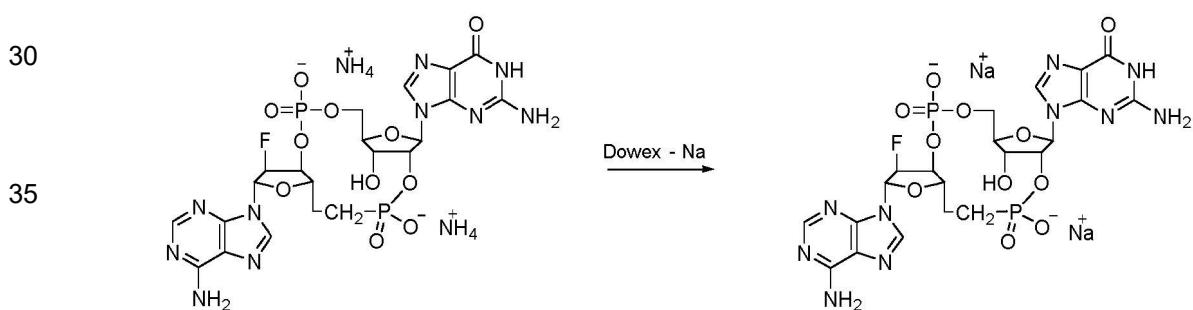
65

Ejemplo de referencia 8





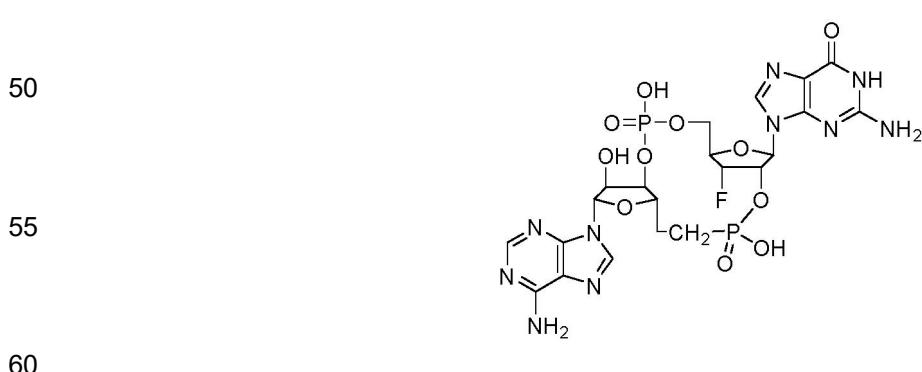
Comp. 14, sal de amonio



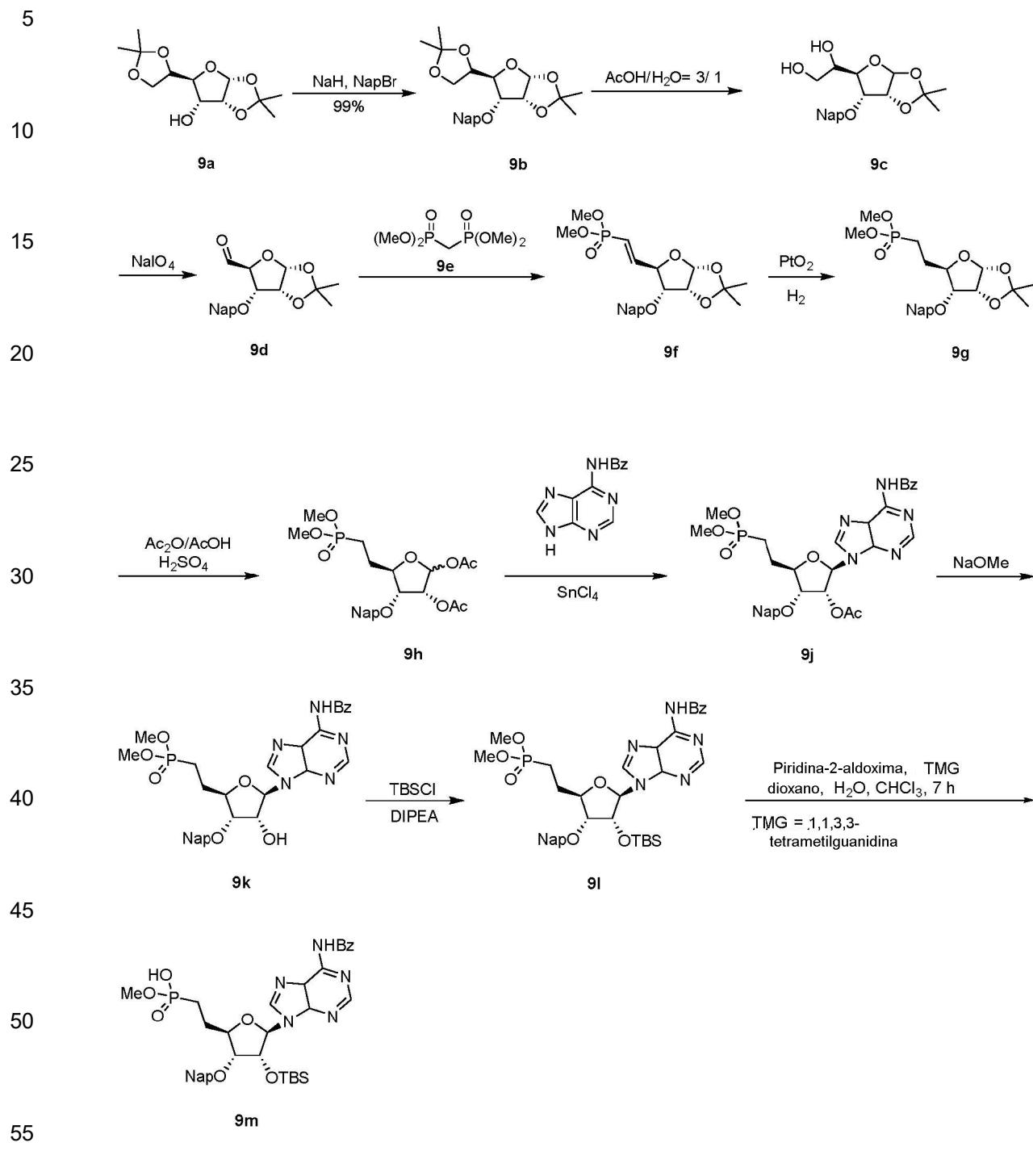
El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 9 describe una ruta posible para la preparación del compuesto 15 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

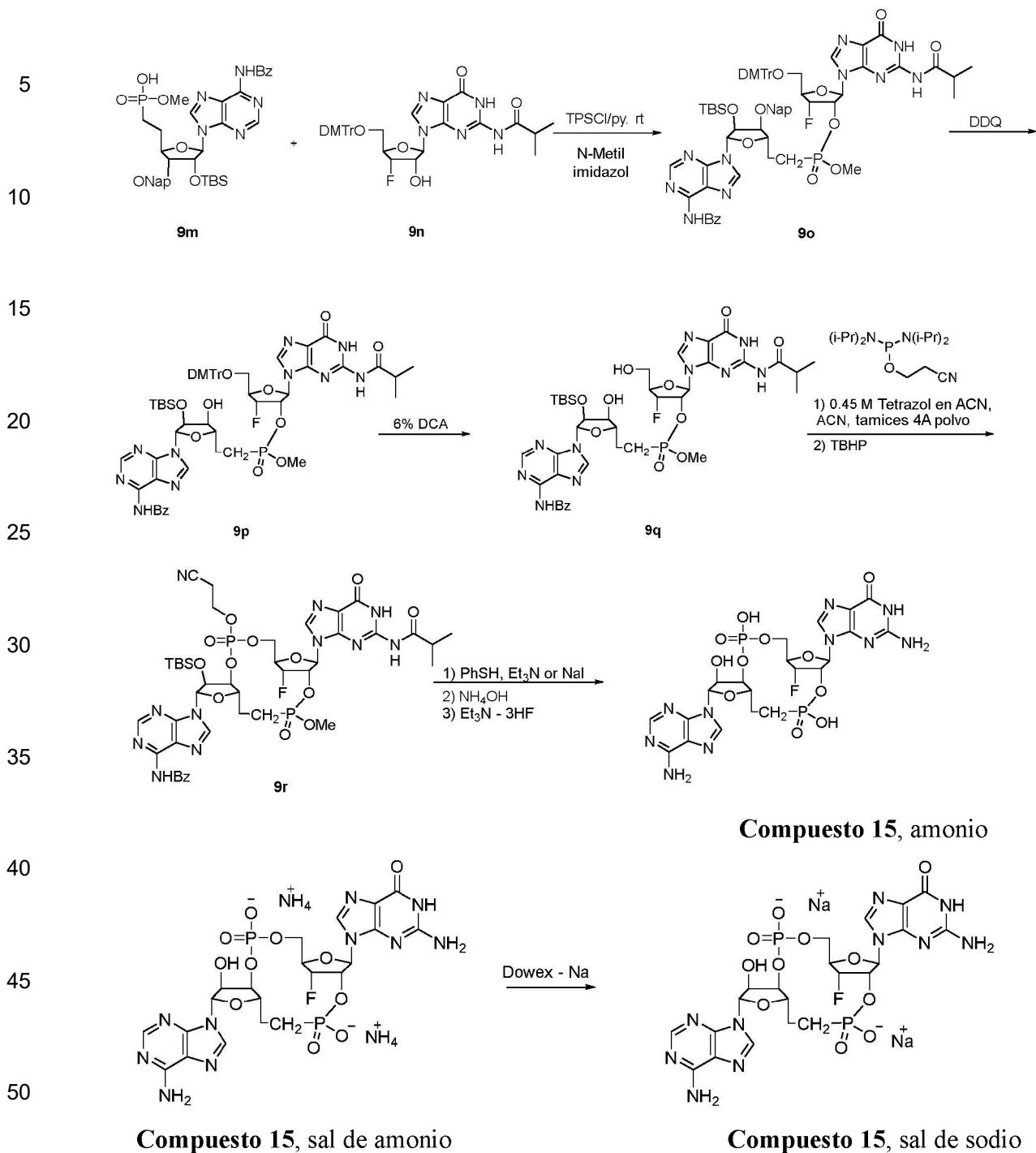
45

Ejemplo de referencia 9

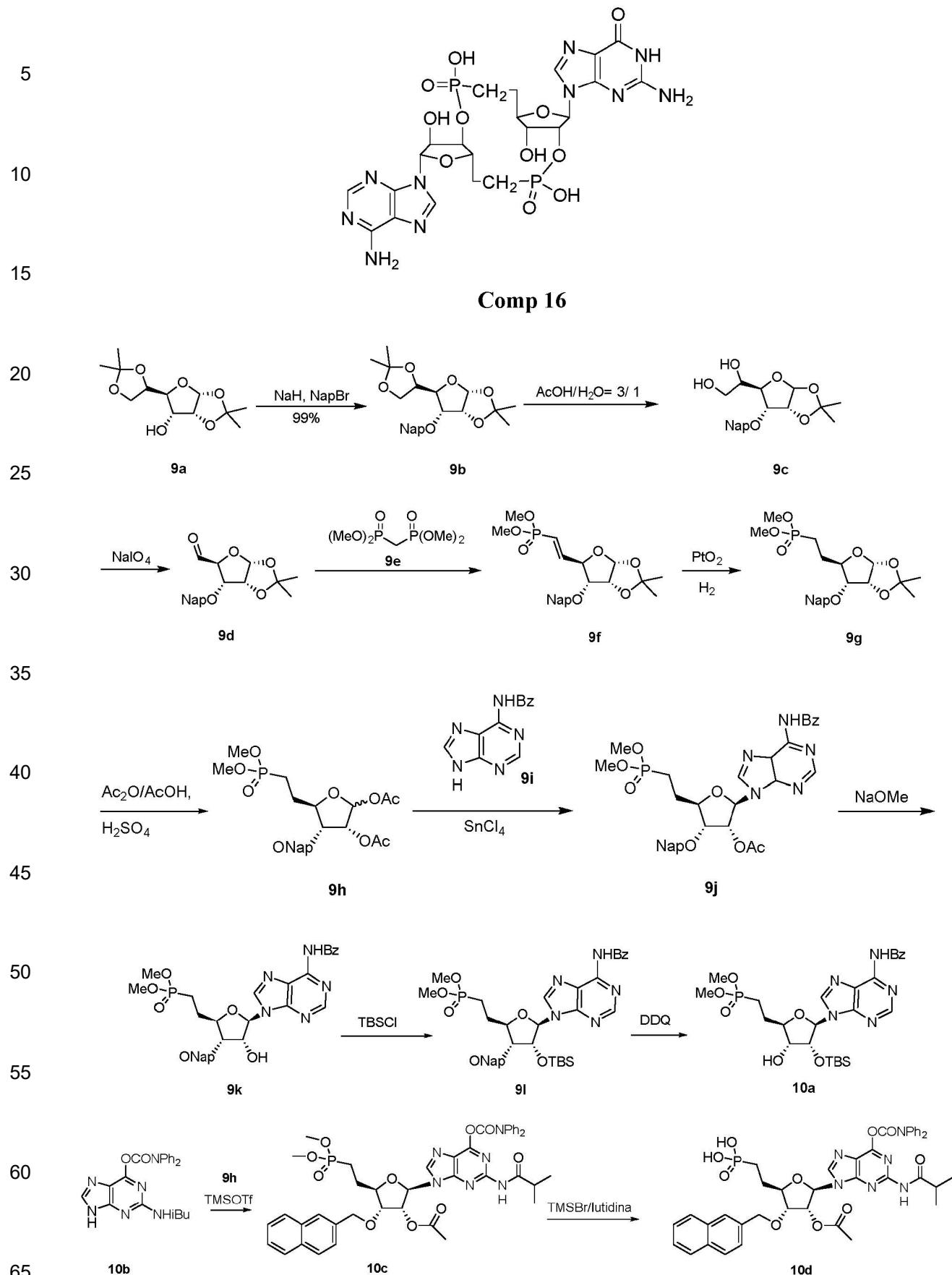


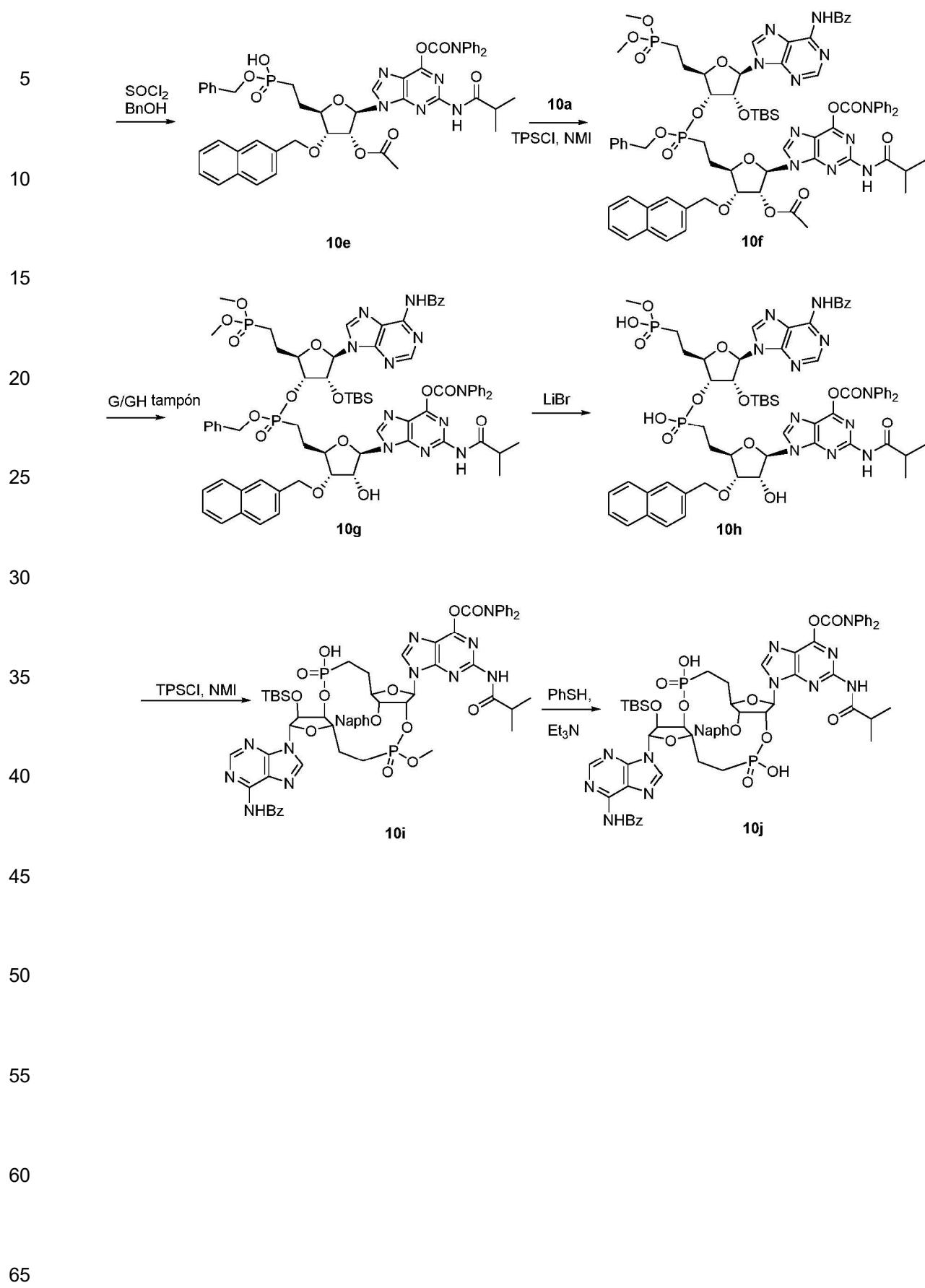
## Comp. 15

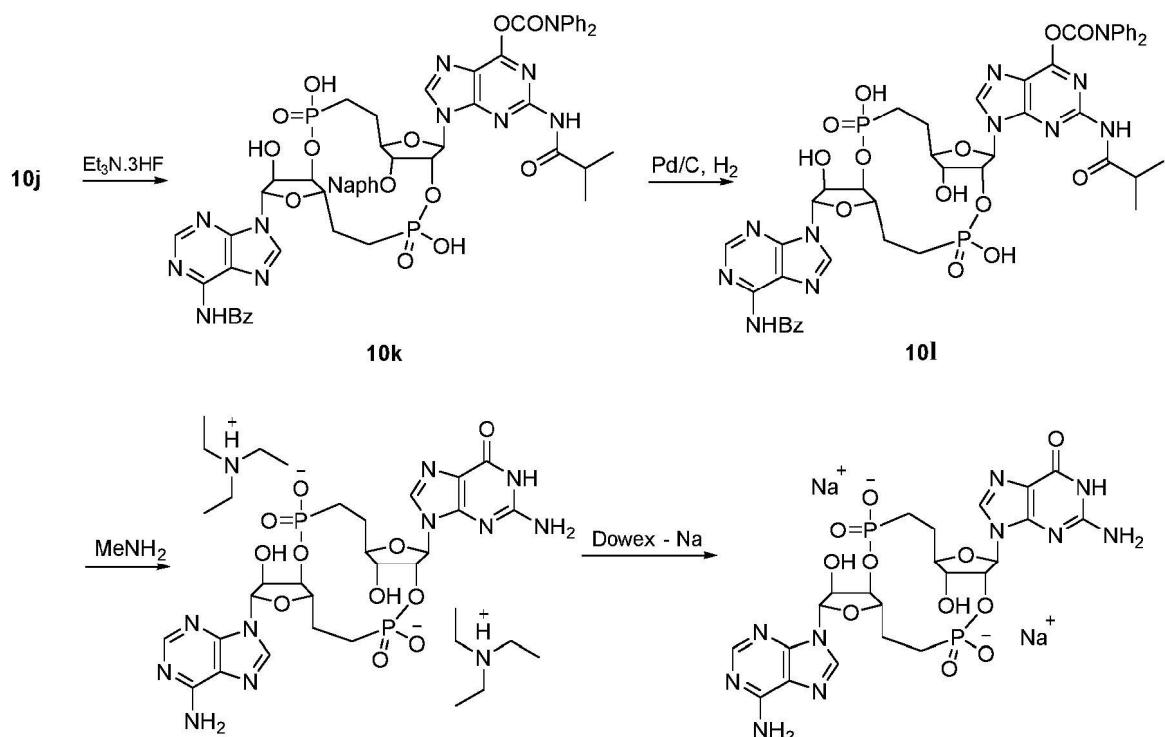




55 El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 10 describe una ruta posible para la preparación del compuesto **16** y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Ejemplo de referencia 10

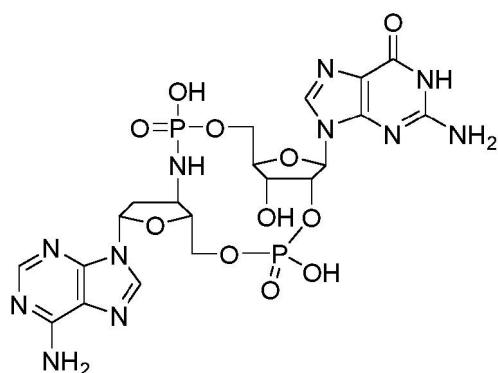




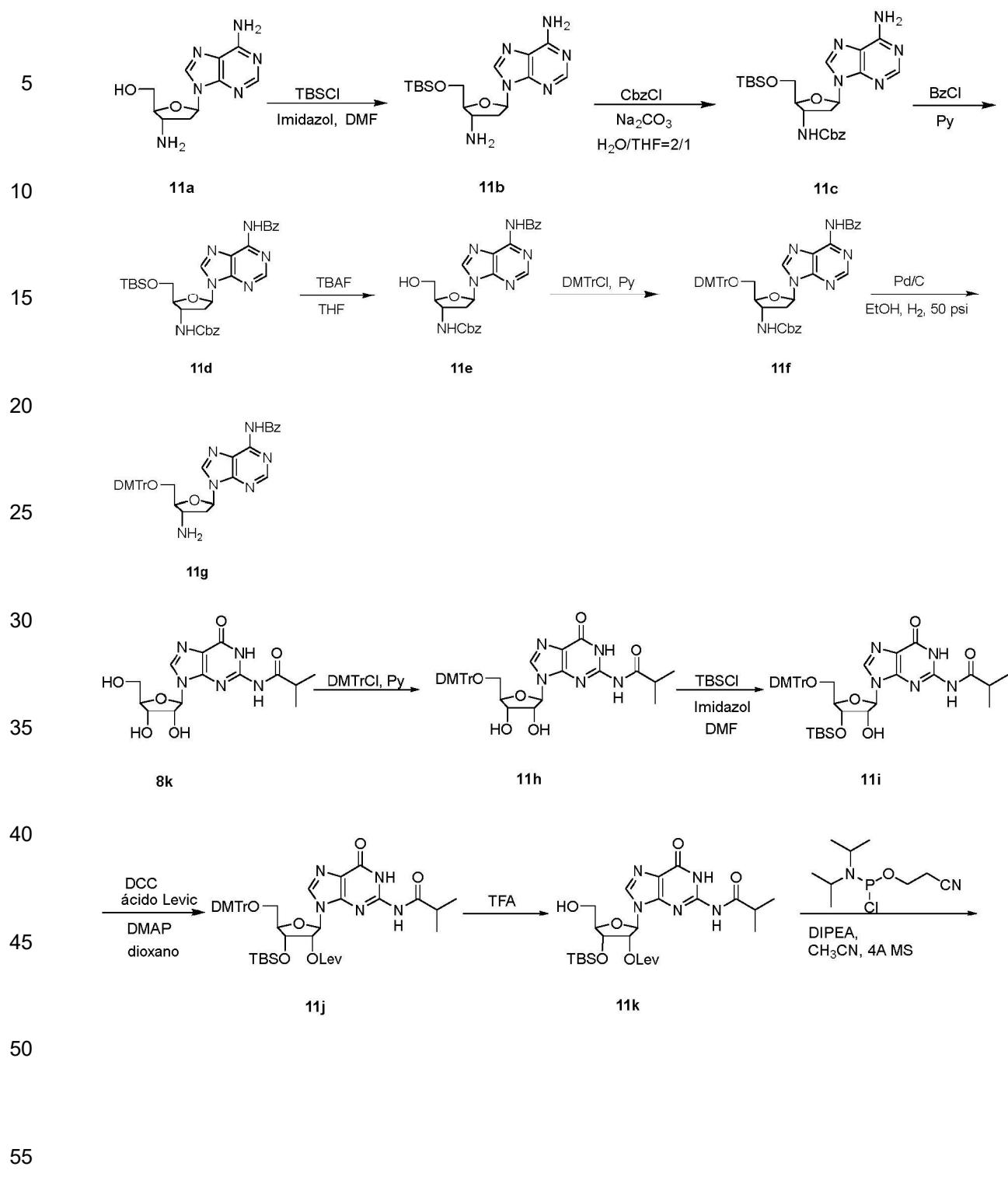
### Compuesto 16, sal de trietilamonio

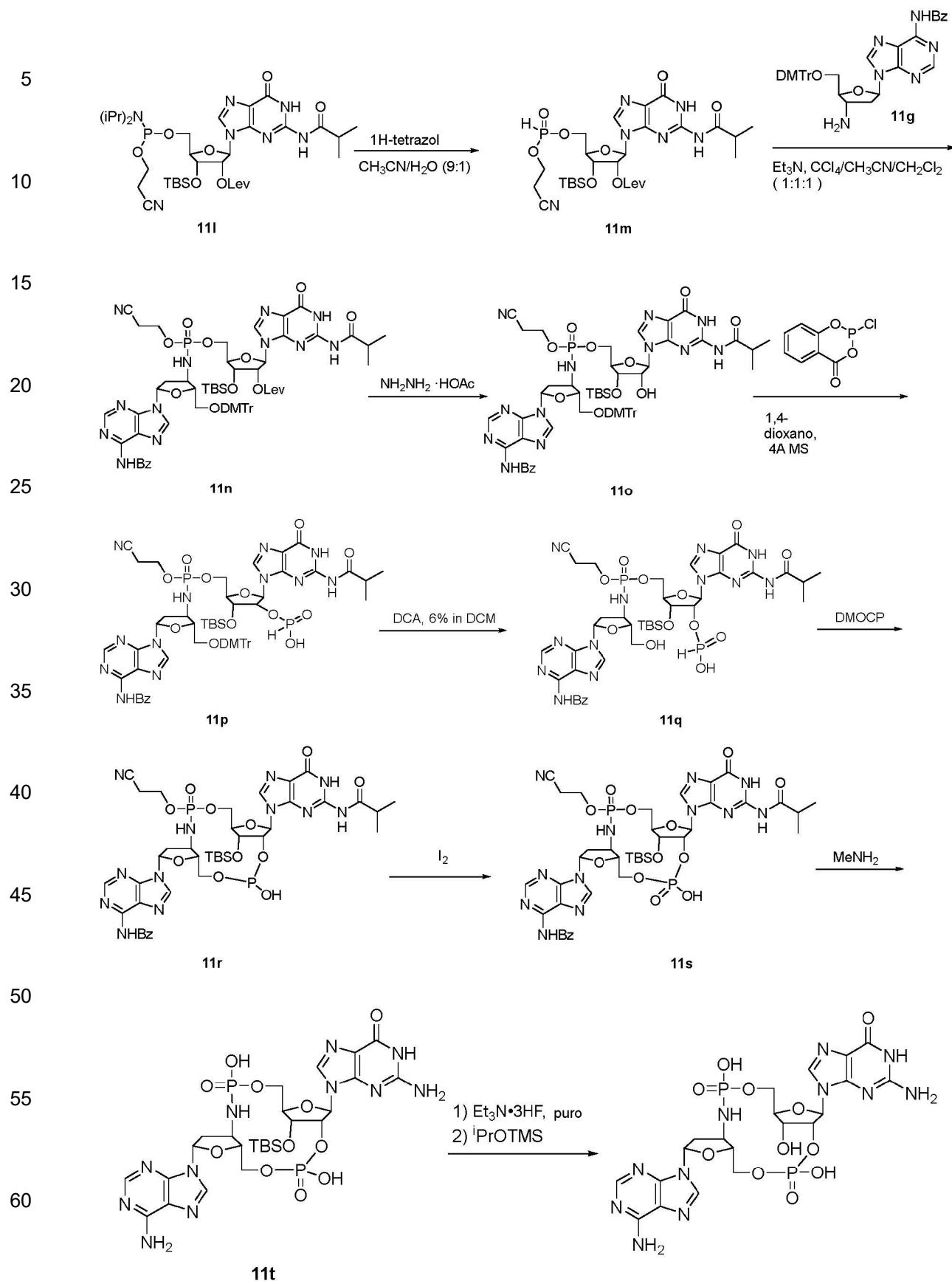
### Ejemplo de referencia 11

### Compuesto 16, sal de sodio

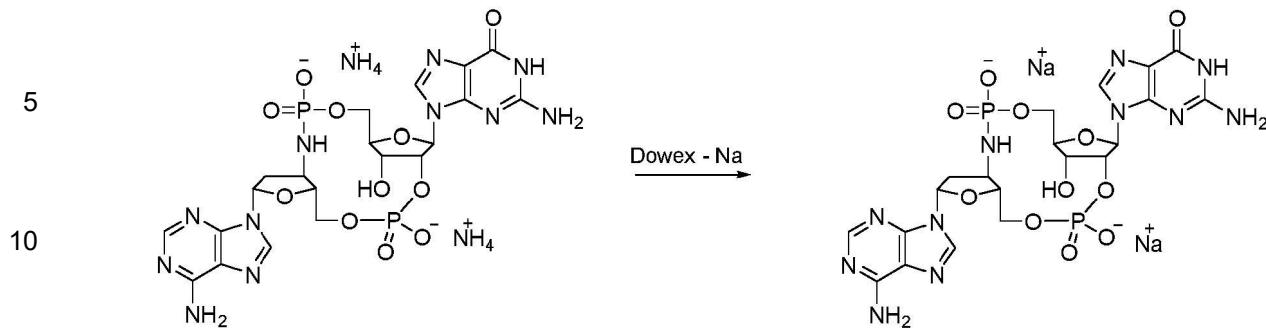


Comp 17





Compuesto 17, sal de amonio



Paso 1: Preparación del **compuesto 11b**

20 A una solución del compuesto **11a** (4,1 g, 16,383 mmol, 1,0 eq) en piridina (50 ml) se le añadió 4-dimetilaminopiridina (0,4 g, 3,277 mmol, 0,2 eq) y cloruro de terc-butildimetilsililo (3,704 g, 24,575 mmol, 1,5 eq) a 25° C. Luego, la mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 12 h. El solvente se concentró a presión reducida para dar un residuo que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 50/1 a 10/1) para dar el compuesto **11b** (2,86 g, 48% de rendimiento) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.32 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.47 (dd, J=5.2, 7.2 Hz, 1H), 4.31-4.18 (m, 2H), 4.06-3.96 (m, 1H), 3.94-3.84 (m, 1H), 3.18-3.06 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.03 (d, J=9.6 Hz, 6H); ESI-MS m/z 365.1 [M+1]<sup>+</sup>.

25

Paso 2: Preparación del **compuesto 11c**

30 A una solución del compuesto **11b** (3,5 g, 9,602 mmol, 1,0 eq) en agua/THF (v/v 2/1, 150 ml) se le añadió carbonato de sodio (1,348 g, 12,482 mmol, 1,3 eq) y cloruro de benciloxicarbonilo (2,129 g, 12,482 mmol, 1,3 equiv.). La mezcla se agitó a 25° C durante 24 h. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de NH<sub>4</sub>Cl (ac.), luego se diluyó con EtOAc (50 ml). La porción orgánica se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a EtOAc) para proporcionar el compuesto **11c** (2,72 g, 57% de rendimiento) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.34 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.43-7.29 (m, 5H), 6.42 (t, J=5.8 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.19-4.99 (m, 3H), 4.53 (t, J=6.0 Hz, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.99-3.77 (m, 2H), 2.86-2.73 (m, 1H), 2.60-2.44 (m, 1H), 0.91 (s, 9H), 0.09 (s, 6H); ESI-MS m/z 521.1 [M+Na]<sup>+</sup>.

35

Paso 3: Preparación del **compuesto 11d**

40 A una solución del compuesto **11c** (2,7 g, 5,415 mmol, 1,0 eq) en piridina (30 ml) se le añadió cloruro de benzoílo (1,142 g, 8,122 mmol, 1,5 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 12 h. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de agua (5 ml), luego se añadió NH<sub>4</sub>OH (5 ml). La mezcla se agitó a 25° C durante 1 hora. La mezcla de la reacción se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a EtOAc) para proporcionar el compuesto **11d** (2,42 g, 74% de rendimiento) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.03 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.02 (d, J=7.6 Hz, 2H), 7.66-7.57 (m, 1H), 7.56-7.47 (m, 2H), 7.42-7.30 (m, 5H), 6.62-6.37 (m, 1H), 5.24-4.98 (m, 3H), 4.55 (t, J=6.0 Hz, 1H), 4.24-4.03 (m, 1H), 4.02-3.76 (m, 2H), 2.97-2.73 (m, 1H), 2.70-2.46 (m, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.09 (s, 6H); ESI-MS m/z 603.2 [M+1]<sup>+</sup>.

45

Paso 4: Preparación del **compuesto 11e**

55 A una solución del compuesto **11d** (2,4 g, 3,982 mmol, 1,0 eq) en THF (20 ml) se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en THF, 19,91 ml, 19,909 mmol, 5,0 eq) a 25° C. La mezcla se agitó a 25° C durante 2 h. La mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se disolvió en EtOAc (50 ml), se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (acetona/EtOAc = 3/1 a 1/1) para proporcionar el compuesto **11e** (1,89 g, 97% de rendimiento) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.72 (s, 2H), 8.09 (d, J=7.6 Hz, 2H), 7.78-7.47 (m, 3H), 7.44-7.20 (m, 5H), 6.53 (t, J=5.6 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.60 (s, 1H), 4.14-3.99 (m, 1H), 3.94-3.64 (m, 2H), 2.91 (m, 1H), 2.67-2.47 (m, 1H); LCMS: ESI-MS m/z 489.1 [M+1]<sup>+</sup>.

60

Paso 5: Preparación del **compuesto 11f**

A una solución del compuesto **11e** (1,4 g, 2,866 mmol, 1,0 eq) en piridina (20 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1,457 g, 4,299 mmol, 1,5 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 2 h. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de MeOH (5 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min. La mezcla se diluyó con EA (50 ml), se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (éter de petróleo/EtOAc = 10/1 a EtOAc) para proporcionar el compuesto **11f** (2,03 g, 89% de rendimiento) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.97 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.02 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.67-7.58 (m, 1H), 7.58-7.48 (m, 2H), 7.45-7.14 (m, 15H), 6.78 (m, 4H), 6.44 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.94 (s, 1H), 4.59 (s, 1H), 3.76 (s, 6H), 3.45 (s, 2H), 3.11-2.94 (m, 1H), 2.62 (s, 1H); ESI-MS m/z 791.2 [M+1]<sup>+</sup>.

5  
10Paso 6: Preparación del **compuesto 11g**

A una solución del compuesto **11f** (2,03 g, 2,567 mmol, 1,0 equiv.) en MeOH (200 ml) se le añadió Pd/C al 10% (2,0 g) en atmósfera de argón. Luego, la mezcla de la reacción se reemplazó con una atmósfera de hidrógeno (3x). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 18 h (50 psi). La mezcla de la reacción se filtró y la torta del filtro se lavó con MeOH (100 ml x 3). La capa orgánica se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 100/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **11g** (1,24 g, 74% de rendimiento) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.10 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.00 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.54-7.46 (m, 2H), 7.42-7.33 (m, 2H), 7.30-7.15 (m, 8H), 6.78 (d, J=8.4 Hz, 4H), 6.42 (dd, J=3.6, 6.8 Hz, 1H), 3.91-3.80 (m, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.40 (m, 2H), 2.82 (m, 1H), 2.45-2.30 (m, 1H); LCMS: ESI-MS m/z 657.2 [M+1]<sup>+</sup>.

15  
20Paso 7: Preparación del **compuesto 11h**

A una solución del compuesto **8k** (16,50 g, 46,698 mmol, 1,00 eq) en piridina (200 ml) se le añadió 4,4'-(cloro(fenil)metileno)bis(metoxibenceno) (23,734 g, 70,048 mmol, 1,50 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante la noche. La mezcla de la reacción se inactivó con metanol (10 ml) y luego se concentró para proporcionar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 50/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **11h** (23,9 g, 78% de rendimiento) como un sólido amarillo. LCMS: ESI-MS: m/z 656.1 [M+H]<sup>+</sup>.

30

Paso 8: Preparación del **compuesto 11i**

A una solución del compuesto **11h** (23,9 g, 36,450 mmol, 1,00 eq) en N,N-dimetilformamida (120 ml) se le añadió terc-butilclorodimetilsilano (8,241 g, 54,675 mmol, 1,50 eq) y 1H-imidazol (6,204 g, 91,124 mmol, 2,50 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante la noche. La mezcla de la reacción se inactivó con metanol (5 ml) y se concentró para proporcionar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (agua (0,225% de ácido fórmico-CH<sub>3</sub>CN) para proporcionar el compuesto **11i** (6,7 g, 24% de rendimiento) como un sólido amarillo. LCMS: ESI-MS: m/z 770.3 [M+ H]<sup>+</sup>.

40

Paso 9: Preparación del **compuesto 11j**

A una solución del compuesto **11i** (5,000 g, 6,494 mmol, 1,00 eq) en 1,4-dioxano (50 ml) se le añadió DMAP (79,334 mg, 0,649 mmol, 0,1 eq), N,N'-metanodilidendifcilohexanamina (4,020 g, 19,482 mmol, 3 eq) y ácido 4-oxopentanoico (1,508 g, 12,988 mmol, 2,0 eq) a 25° C. La mezcla se agitó a 25° C durante 3 h. La mezcla de la reacción se filtró y la torta del filtro se lavó con EtOAc (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se disolvió en EtOAc (100 ml), se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 100/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **11j** (5,1 g, 90% de rendimiento) como una espuma blanca. LCMS: ESI-MS: m/z 868.4 [M+H]<sup>+</sup>.

45  
50Paso 10: Preparación del **compuesto 11k**

A una solución del compuesto **11j** (5,1 g, 5,875 mmol, 1,00 equiv.) en DCM (12 ml) se le añadió ácido 2,2,2-trifluoroacético (300 ul) y trietilsilano (6 ml). La mezcla se agitó a 25° C durante 10 min. La mezcla de la reacción se inactivó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20 ml) y luego se diluyó con DCM (30 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (DCM/MeOH = 50/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **11k** (3,1 g, 93% de rendimiento) como un sólido amarillo. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 12.11 (s, 1H), 11.64 (s, 1H), 8.42-8.22 (m, 1H), 6.00 (d, J=6.8 Hz, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.54 (dd, J=5.0, 6.7 Hz, 1H), 5.26 (t, J=5.2 Hz, 1H), 4.55 (dd, J=2.4, 4.9 Hz, 1H), 3.98 (br d, J=2.4 Hz, 1H), 3.67 (td, J=4.9, 11.9 Hz, 1H), 3.61-3.51 (m, 1H), 2.77 (spt, J=6.8 Hz, 1H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.11 (d, J=6.6 Hz, 6H), 0.89 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.06 (s, 3H).

65

Paso 11: Preparación del **compuesto 11l**

5 A una solución del compuesto **11k** (3,1 g, 5,480 mmol, 1,00 eq) en THF (40 ml) se le añadió N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (4,250 g, 32,880 mmol, 6,0 eq) y 3-((cloro(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo (3,891 g, 16,440 mmol, 3,0 eq) a 0° C. La mezcla se agitó a 0° C durante 2 h. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de MeOH (3 ml), luego se diluyó con EA (50 ml). La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (40 ml) y salmuera (40 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna (DCM/EtOAc = 10/1 a 1/1) para proporcionar el compuesto **11l** (3,1 g, 74% de rendimiento) como un aceite incoloro. LCMS: ESI-MS: m/z 683.1 [M-N(iPr)<sub>2</sub>+18]<sup>+</sup>.

10 Paso 12: Preparación del **compuesto 11m**

15 A una solución del compuesto **11l** (2,1 g, 2,742 mmol, 1,0 eq) en acetonitrilo (16 ml) se le añadió una solución de 1H-tetrazol (0,45 M) en acetonitrilo/agua (9/1, 18/2 ml) a 25° C. La solución se agitó a 25° C durante 2 h. La mezcla de la reacción se enfrió a 0° C, se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó sucesivamente con agua fría (20 ml), bicarbonato de sodio al 5% frío (20 ml), agua fría (20 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar el compuesto **11m** (1,62 g, 87% de rendimiento) como un aceite incoloro. <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 11.43 (s, 1P), 7.10 (s, 1P); LCMS: ESI-MS m/z 683.1 [M+1]<sup>+</sup>.

20 Paso 13: Preparación del **compuesto 11n**

25 Se añadió una solución del compuesto **11m** (1,2 g, 1,827 mmol, 1,0 eq) en una mezcla de acetonitrilo/diclorometano/tetraclorometano (1/1/1, 30 ml) y trietilamina (900  $\mu$ L) a un matraz sellado que contenía el compuesto **11m** (1,62 g, 2,375 mmol, 1,3 equiv.). La solución resultante se agitó a 25° C durante 2 h. La mezcla de la reacción se concentró hasta la sequedad a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH = 100/1 a 100/2) para proporcionar el compuesto **11n** (1,21 g, 50% de rendimiento) como una espuma blanca. <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 9.13 (s, 1P), 8.73 (s, 1P); LCMS: ESI-MS m/z 1337.5 [M+1]<sup>+</sup>.

30 Paso 14: Preparación del **compuesto 11o**

35 A una solución del compuesto **11n** (1,1 g, 0,822 mmol, 1,0 eq) en MeCN (30 ml) se le añadió acetato de hidrazina (757,462 mg, 8,225 mmol, 10,0 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C. durante 2 h. Luego, la mezcla de la reacción se diluyó con EA (50 ml), se lavó con agua (50 ml) y salmuera (30 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante chromatografía en columna ultrarrápida (DCM/MeOH = 100/1 a 100/5) para proporcionar el compuesto **11o** (833 mg, 82% de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: ESI-MS m/z 1261.2 [M+23]<sup>+</sup>.

40 Paso 14: Preparación del **compuesto 11p**

45 A una solución del compuesto **11o** (653 mg, 0,527 mmol, 1,0 eq) y tamices moleculares 4 Å en 1,4-dioxano (9,0 ml) y piridina (3,0 ml) se le añadió una solución de 2-cloro-4H-1, 3,2-benzodioxafosforin-4-ona (160,068 mg, 0,790 mmol, 1,5 eq) en 1,4-dioxano (5 ml). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de agua/piridina (1/1, 5 ml) y la mezcla resultante se vertió en una solución de NaHCO<sub>3</sub> (20 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (30 x 3 ml) y las capas se repartieron. Los extractos de EtOAc combinados se concentraron hasta la sequedad a presión reducida para dar el compuesto **11p** (723 mg, bruto) como una espuma incolora, que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.

50 Paso 15: Preparación del **compuesto 11q**

55 A una solución del compuesto **11p** (723 mg, bruto) en DCM (5 ml) se le añadió agua y DCA (6% en DCM, 5 ml). La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 30 min. La mezcla de la reacción se inactivó mediante la adición de piridina (3 ml) con agitación durante 10 min. La mezcla de la reacción se concentró hasta la sequedad a presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (columna: Waters Xbridge 150 x 25 5u; fase móvil: agua (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM)-ACN del 22% al 42%, caudal: 25 ml/min, tiempo de gradiente: 8 min) para proporcionar el compuesto **11q** (197 mg, 35% de rendimiento en dos pasos) como un sólido blanco. <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) 9.23 (s, 1P), 8.62 (s, 1P), 4.48 (s, 1P); LCMS: ESI-MS m/z 1001.5 [M+1]<sup>+</sup>.

60 Paso 16: Preparación del **compuesto 11r**

65 A una solución del compuesto **11q** (197 mg, 0,197 mmol, 1,0 eq) y tamices moleculares 4 Å en piridina (60 ml) se le añadió 2-óxido de 2-cloro-5,5-dimetil-1,3,2-dioxafosfinano (127,131 mg, 0,689 mmol, 3,5 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 25° C durante 1 h. La mezcla de la reacción (0,00328 M en Py, 60 ml), que contenía el compuesto **11r**, se usó para el paso siguiente sin purificación adicional.

Paso 17: Preparación del compuesto **11s**

Se inactivó una solución del compuesto **11r** (0,00328 M en Py, 60 ml) mediante la adición de agua (36,49 mg, 1,97 mmol, 10,0 eq), luego se añadió  $I_2$  (250 mg, 0,985 mmol, 5,0 eq) a la solución. La mezcla se agitó a 25° C durante 1 h. Luego, esta mezcla se inactivó mediante la adición de una solución acuosa de  $Na_2SO_3$  (2 ml), se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (columna: Waters Xbridge 150\*25 5u; fase móvil: agua ( $NH_4HCO_3$  10 mM)-ACN del 28% al 48%, caudal: 25 ml/min, tiempo de gradiente: 8 min) para proporcionar el compuesto **11a** (68 mg, 35% de rendimiento en dos pasos) como un sólido blanco. LCMS: ESI-MS m/z 999.1 [M+1]<sup>+</sup>.

Paso 18: Preparación del compuesto **11t**

Se agitó el compuesto **11s** (35 mg, 0,035 mmol, 1,0 eq) en una solución de  $MeNH_2$  (33% en EtOH, 2 ml) a 25° C durante 12 h. La mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto **11t** (bruto, 32 mg) como un sólido amarillo.

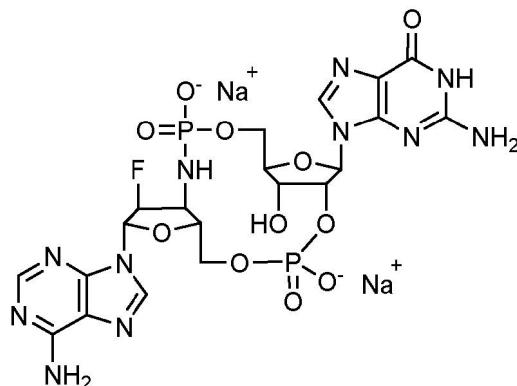
Paso 18: Preparación del compuesto **17**

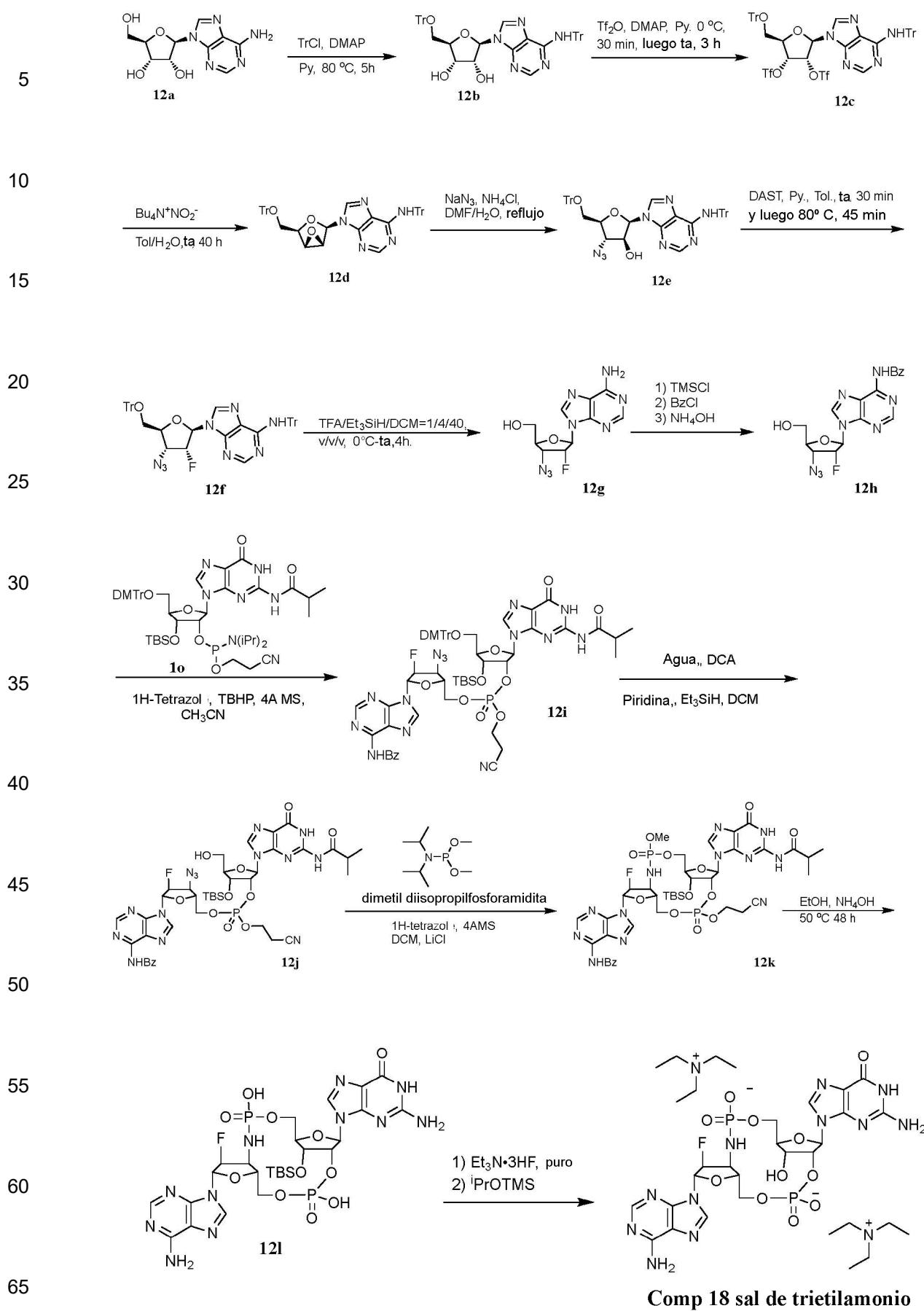
A una solución del compuesto **11t** (32 mg, bruto) en piridina (2 ml) se le añadió trietilamina (209,805 mg, 2,073 mmol, 50 eq) y trihidrofluoruro de trietilamina (167,124 mg, 1,037 mmol, 25 eq) a 25° C. La mezcla de la reacción se agitó a 50° C durante 12 h. A la mezcla de la reacción se le añadió THF (1 ml) e isopropoxitrimetilsilano (548,516 mg, 4,147 mmol, 100 eq) a 25° C y la mezcla se agitó durante 12 h. La mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa (columna: Agela Durashell C18 150\*25 5u; fase móvil: agua (0,05% hidróxido amónico v/v)-ACN del 0% al 15%, caudal: 35 ml/min, Gradiente Tiempo: 10 min) para proporcionar el compuesto **17** como una sal de amonio (9,5 mg, 35% de rendimiento en dos pasos) como un sólido blanco.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ ) 8.66-7.98 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.04-5.50 (m, 2H), 4.60 (s, 1H), 4.42-3.93 (m, 7H), 2.76 (s, 1H), 2.44 (s, 1H);  $^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ ) 7.62 (s, 1P), 7.49 (s, 1P), -3.40 (s, 1P).

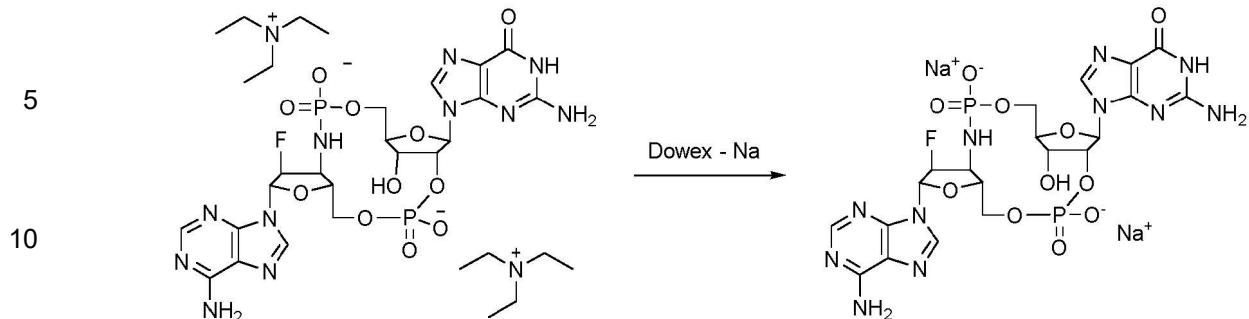
Paso 19: Preparación de la sal de sodio del compuesto **17**

Se añadió un volumen de 5 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 9,5 mg de sal de amonio del compuesto **17**) y se lavó con agua desionizada (2x). Luego, a la resina se le añadió  $H_2SO_4$  al 15% en agua DI (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con  $H_2SO_4$  al 15% en agua DI y se lavó con  $H_2SO_4$  al 15% (por lo menos 4 CV), y luego con agua DI hasta pH neutro. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió una solución acuosa de  $NaOH$  al 15% (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con  $NaOH$  acuoso al 15% (por lo menos 4 CV), y luego con agua hasta pH neutro (por lo menos 4 CV). La sal de amonio del compuesto **17** se disolvió en agua DI (9,5 mg en 2 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua DI. Un producto eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para proporcionar la sal de sodio del compuesto **17** (7,4 mg, 98% de pureza, 71,819% de rendimiento) como un sólido blanco.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ ) 8.31 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 6.32 (d,  $J=6.4$  Hz, 1H), 5.95 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 5.69 (m, 1H), 4.66 (d,  $J=4.0$  Hz, 1H), 4.40-4.31 (m, 2H), 4.24-4.06 (m, 5H), 2.89-2.84 (m, 1H), 2.51-2.46 (m, 1H);  $^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ ) 7.56 (s, 1P), -1.86 (s, 1P); LCMS: ESI-MS m/z 657.8 [M+1]<sup>+</sup>.

## Ejemplo de referencia 12





15 **Comp 18 sal de trietilamonio**

## Comp 18 sal de sodio

Paso 1: Preparación del **compuesto 12b**

20 A una solución del compuesto **12a** (7,8 g, 29,187 mmol) y DMAP (2,995 g, 24,517 mmol) en piridina (240 ml) se le añadió TrCl (27,665 g, 99,236 mmol). Después de calentar la mezcla de la reacción a 80° C durante 5 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con EtOH (150 ml). La mezcla de la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:EA=0/1~1:1) para dar el compuesto **12b** como un sólido blanco (10,45 g, 13,899 mmol). ESI-MS: m/z 774.1 [M+Na]<sup>+</sup>.

25 **Paso 2: Preparación del compuesto 12c**

30 Se disolvieron el compuesto **12b** (11,5 g, 15,295 mmol) y DMAP (4,671 g, 38,238 mmol) en piridina (300 ml). Esta solución se enfrió a 0° C y se añadió gota a gota una solución de anhídrido trílico (20,672 ml, 122,362 mmol). La mezcla de la reacción se mantuvo a 0° C durante 30 min y luego se dejó calentar a temperatura ambiente durante un período de 3 h. La mezcla de la reacción se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 ml) y se extrajo con agua (300 ml a 0° C). Los solventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo (PE)/EtOAc=1:0-1:1) para dar el compuesto **12c** como un sólido amorfó (11 g, 10,827 mmol). ESI-MS: m/z 1037.8 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.89 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.39-7.29 (m, 12H), 7.28-7.17 (m, 18H), 6.98 (s, 1H), 6.45 (t,  $J$ =5.2 Hz, 1H), 6.21 (d,  $J$ =6.0 Hz, 1H), 5.86-5.81 (m, 1H), 4.48 (q,  $J$ =3.6 Hz, 1H), 3.69 (dd,  $J$ =4.3, 11.2 Hz, 1H), 3.36 (dd,  $J$ =4.0, 11.2 Hz, 1H).

35 **Paso 3: Preparación del compuesto 12d**

40 Se disolvió el compuesto **12c** (9,5 g, 9,350 mmol) en tolueno (200 ml) que contenía nitrito de tetrabutilamonio (21,579 g, 74,804 mmol) y agua (26 ml). Después de agitar vigorosamente la mezcla de la reacción durante 40 h, la mezcla se extrajo con  $t\text{-BuOCH}_3$  (200 ml) y agua (2 x 100 ml). Luego, las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida para dar el producto bruto. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (PE/EtOAc=1:0~2:1) para dar el compuesto **12d** como un sólido amorfó blanco (3,87 g, 5,274 mmol). ESI-MS: m/z 756.0 [M+Na]<sup>+</sup>.

45 **Paso 4: Preparación del compuesto 12e**

50 Se calentó a reflujo (100° C) durante 1 h una mezcla del compuesto **12d** (3,87 g, 5,274 mmol),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,564 g, 10,547 mmol),  $\text{NaN}_3$  (2,1 g, 32,303 mmol), DMF (16 ml) y agua (2,4 ml). Luego, la mezcla de la reacción se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) y agua (100 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 x 100 ml), se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhídrico, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (PE/EtOAc 1:0~3:1) para dar el compuesto **12e** como un sólido amorfó blanco (2,86 g, 3,681 mmol), además del otro isómero (500 mg, 0,245 mmol). ESI-MS: m/z 799.1 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 8.00 (d,  $J$ =9.3 Hz, 2H), 7.33 (dt,  $J$ =1.5, 7.2 Hz, 12H), 7.26-7.17 (m, 18H), 7.05 (s, 1H), 6.05 (d,  $J$ =5.2 Hz, 1H), 5.53 (br d,  $J$ =8.8 Hz, 1H), 4.58-4.49 (m, 1H), 4.43 (t,  $J$ =6.0 Hz, 1H), 3.91-3.83 (m, 1H), 3.49-3.39 (m, 1H), 3.27 (dd,  $J$ =4.3, 10.5 Hz, 1H).

55 **Paso 5: Preparación del compuesto 12f**

60 Se añadió gota a gota una solución de DAST (3,798 g, 23,561 mmol) a una solución de **12e** (2,86 g, 3,681 mmol) en tolueno (50 ml) y piridina (5,359 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, la mezcla de la reacción se calentó a 80° C durante 1 h y luego se diluyó con EtOAc (70 ml). La capa orgánica se lavó sucesivamente con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso al 7% (100 ml), agua (100 ml), se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhídrico, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de

5 sílice (PE/EtOAc=1:0-5:1) para proporcionar el compuesto **12f** como un sólido amorfó amarillento (2,24 g, 2,876 mmol). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.97 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.40-7.30 (m, 14H), 7.25-7.17 (m, 16H), 6.11 (d, J=19.6 Hz, 1H), 5.93-5.76 (m, 1H), 4.79-4.68 (m, 1H), 4.29-4.22 (m, 1H), 3.57 (dd, J=3.0, 10.9 Hz, 1H), 3.33 (dd, J=4.0, 11.0 Hz, 1H).

10 5 Paso 6: Preparación del **compuesto 12g**

15 A una solución del compuesto **12f** (1,7 g, 2,183 mmol) en DCM a 0° C se le añadió TFA, Et<sub>3</sub>SiH y DCM (24 ml). Después de agitar la solución a 25° C durante 2 h, la mezcla de la reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (30 ml), se diluyó con DCM (20 ml) y se extrajo con DCM (50 ml x 2). Luego, las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 1:0 a 10:1) para dar el compuesto **12g** como un sólido blanco (440 mg, 1,495 mmol). ESI-MS: m/z=295.0 [M+1]<sup>+</sup>.

20 15 Paso 7: Preparación del **compuesto 12h**

25 A una solución del compuesto **12g** (440 mg, 1,196 mmol) en piridina se añadió clorotrimetilsilano a temperatura ambiente. Después de 2 h, la mezcla se enfrió a 0° C y se añadió gota a gota BzCl. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, la mezcla de la reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó con agua a 0° C. Luego se añadió NH<sub>4</sub>OH y la mezcla de la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se diluyó con DCM (50 ml) y se extrajo con DCM (20 ml). Luego, las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre NaSO<sub>4</sub>, se filtraron y el filtrado se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH: 1/0 a 10/1) para proporcionar el compuesto **12h** como un sólido amarillo (372 mg). ESI-MS: m/z=399.1 [M+1]<sup>+</sup>.

30 25 Paso 8: Preparación del **compuesto 12i**

35 Se agitó una solución del compuesto **12h** (372 mg, 0,934 mmol) y MS 4Å (3 g) en CH<sub>3</sub>CN (30 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 min. Se añadió 1H-tetrazol (12,451 ml, 5,603 mmol). Después de 10 min, se añadió una solución del compuesto **1o** en CH<sub>3</sub>CN (5 ml) (ChemGenes Corporation) (1,268 g, 1,307 mmol). La mezcla se agitó a 26° C durante 1 h. Luego se añadió hidroperóxido de t-butilo (0,934 ml, 4,669 mmol). Después de agitar a 26° C durante 1 h, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 1:0 a 10:1) para dar el compuesto **12i** como un sólido amarillo (1,15 g). ESI-MS: m/z=1283.7 [M+1]<sup>+</sup>.

40 35 Paso 9: Preparación del compuesto **12j**

45 A una solución del compuesto **12i** (1,15 g, 0,896 mmol) en agua y DCM se le añadió ácido dicloroacético (406,140 mg, 8,961 mmol) a temperatura ambiente. Luego se añadió trietilsilano (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 48 h, se añadió piridina (0,289 ml, 3,584 mmol). Después de agitar durante 10 min, la mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH=10:1) para proporcionar el compuesto **12j** como un sólido blanco (607 mg). ESI-MS: m/z=981.4[M+1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.76 (d, J=8 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.12-7.96 (m, 3H), 7.64-7.57 (m, 1H), 7.55-7.47 (m, 2H), 6.39-6.20 (m, 1H), 6.02-5.95 (m, 1H), 4.77-4.62 (m, 1H), 4.47 (br s, 1H), 4.43-4.29 (m, 1H), 4.28-4.16 (m, 2H), 4.15-4.06 (m, 2H), 4.15-4.06 (m, 1H), 4.15-4.06 (m, 1H), 4.05-3.96 (m, 1H), 3.96-3.87 (m, 1H), 3.67 (br t, J=12.0 Hz, 1H), 3.47-3.37 (m, 1H), 2.73-2.58 (m, 3H), 1.28-1.13 (m, 7H), 0.88 (d, J=14 Hz, 9H), 0.12-0.04 (m, 6H).

50 50 Paso 10: Preparación del **compuesto 12k**

55 A una solución del compuesto **12j** (607 mg, 0,619 mmol), 1H-tetrazol (1,031 ml, 0,464 mmol), LiCl (131,162 mg, 3,094 mmol) y MS 4Å en DCM (68 ml) se le añadió dimetil diisopropilfosforamidita (125,54 mg, 0,650 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 72 h, la mezcla se filtró y purificó mediante HPLC preparativa (columna: Phenomenex Gemini C18 250\*50 10u; fase móvil: agua (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM)-ACN del 28% al 58%, caudal: 22 ml/min) para proporcionar el compuesto **12k** como un sólido blanco (160 mg). ESI-MS: m/z=978.2 [M+1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.81 (s, 1H), 8.30-8.21 (m, 3H), 8.06 (s, 1H), 7.75-7.65 (m, 3H), 6.53 (d, J=17.2 Hz, 1H), 6.24 (d, J=8.4 Hz, 1H), 5.46-5.28 (m, 1H), 5.08-4.97 (m, 1H), 5.02 (dt, J=3.8, 8.4 Hz, 1H), 4.76 (d, J=3.2 Hz, 1H), 4.51-4.36 (m, 2H), 4.29-4.18 (m, 1H), 3.86 (d, J=11.2 Hz, 3H), 2.80-2.69 (m, 1H), 1.28-1.24 (m, 6H), 1.00 (s, 9H), 0.32 (s, 3H), 0.27-0.24 (m, 3H).

60 60 Paso 11: Preparación del **compuesto 12l**

65 A una solución del compuesto **12k** (160 mg, 0,164 mmol) en EtOH (10 ml) se le añadió NH<sub>4</sub>OH concentrado (10 ml) mientras se agitaba. Después de agitar la mezcla de la reacción a 50° C durante 2 días, se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto **12l** como un sólido bruto blanco (125 mg). El producto bruto se usó

en el paso siguiente sin purificación adicional. ESI-MS: m/z=790.5 [M+1]<sup>+</sup>.

5 **Paso 12: Preparación de la sal de trietilamonio del compuesto 18**

10 Se agitó una solución del compuesto **12I** (125 mg, 0,158 mmol), trietilamina (961,056 mg, 9,498 mmol) y fluoruro de trietilamonio (765,545, 4,749 mmol) en piridina (4 ml) a 50° C durante 5 h. Luego se añadió a la mezcla de la reacción isopropoxitrimetilsilano (3,141 g, 23,744 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por HPLC preparativa (columna: Agela Durashell C18 150\*25 5u; fase móvil: agua (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>CN del 0% al 15%, caudal: 35 ml/min) para proporcionar el compuesto 5 como su sal de trietilamonio (70 mg, 0,080 mmol) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 8.54-7.99 (m, 2H), 7.78 (br s, 1H), 6.25 (br s, 1H), 5.90-5.80 (m, 1H), 5.85 (br s, 1H), 5.71 (br s, 1H), 5.32-5.03 (m, 1H), 4.55 (br s, 1H), 4.32-4.01 (m, 6H), 3.94 (br s, 1H). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) 6.42 (br s, 1P), -3.47 (br s, 1P).

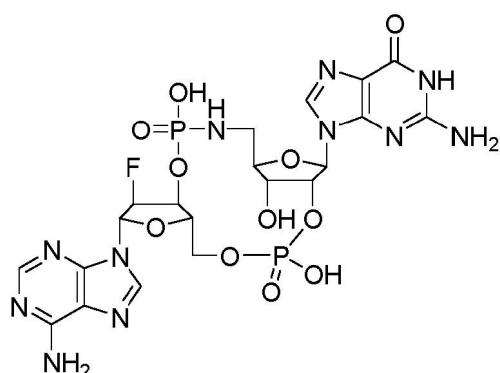
15 **Paso 13: Preparación de la sal de sodio de trietilo del compuesto 18**

20 Se añadió un volumen de 70 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 70 mg de sal de trietilamonio del compuesto **18**) que luego se lavó con agua desionizada (2x). Se añadió a la resina un volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada (100 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min, luego se decantó (1x).

25 La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada y se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna) y luego con agua desionizada hasta que la resina tuvo un pH neutro. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió una solución de NaOH al 15% en agua desionizada (100 ml). La mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en agua desionizada (por lo menos 4 volúmenes de columna), y luego con agua hasta pH neutro (por lo menos 4 volúmenes de columna). La sal de trietilamonio del compuesto 18 se disolvió en agua desionizada (70 mg en 50 ml), luego se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua DI. El compuesto 18 eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para dar la **sal de sodio de trietilo del compuesto 18** (49,9 mg, 0,068 mmol). ESI-MS: m/z=675.8 [M+1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 8.39-8.06 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 6.28 (d, J=13.6 Hz, 1H), 5.86 (d, J=0.0 Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 5.35-5.08 (m, 1H), 4.56 (d, J=4.5 Hz, 1H), 4.33-4.06 (m, 6H), 3.99 (d, J=10.4 Hz, 1H). <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O) -200.54 (s, 1F). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) 6.48 (s, 1P), -2.71 (s, 1P).

35 El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 13 describe una ruta posible para la preparación del compuesto **19** y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Ejemplo de referencia 13

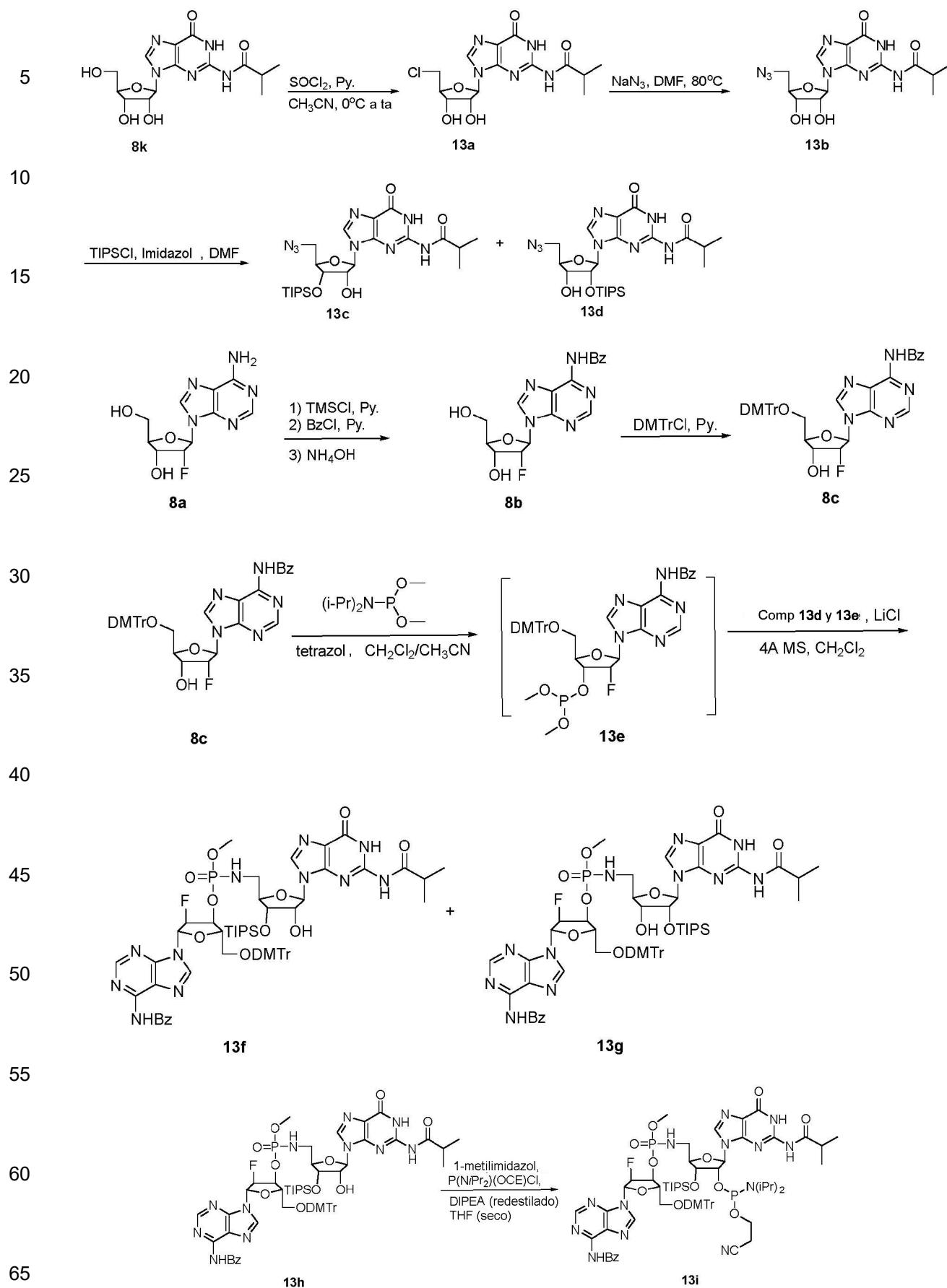


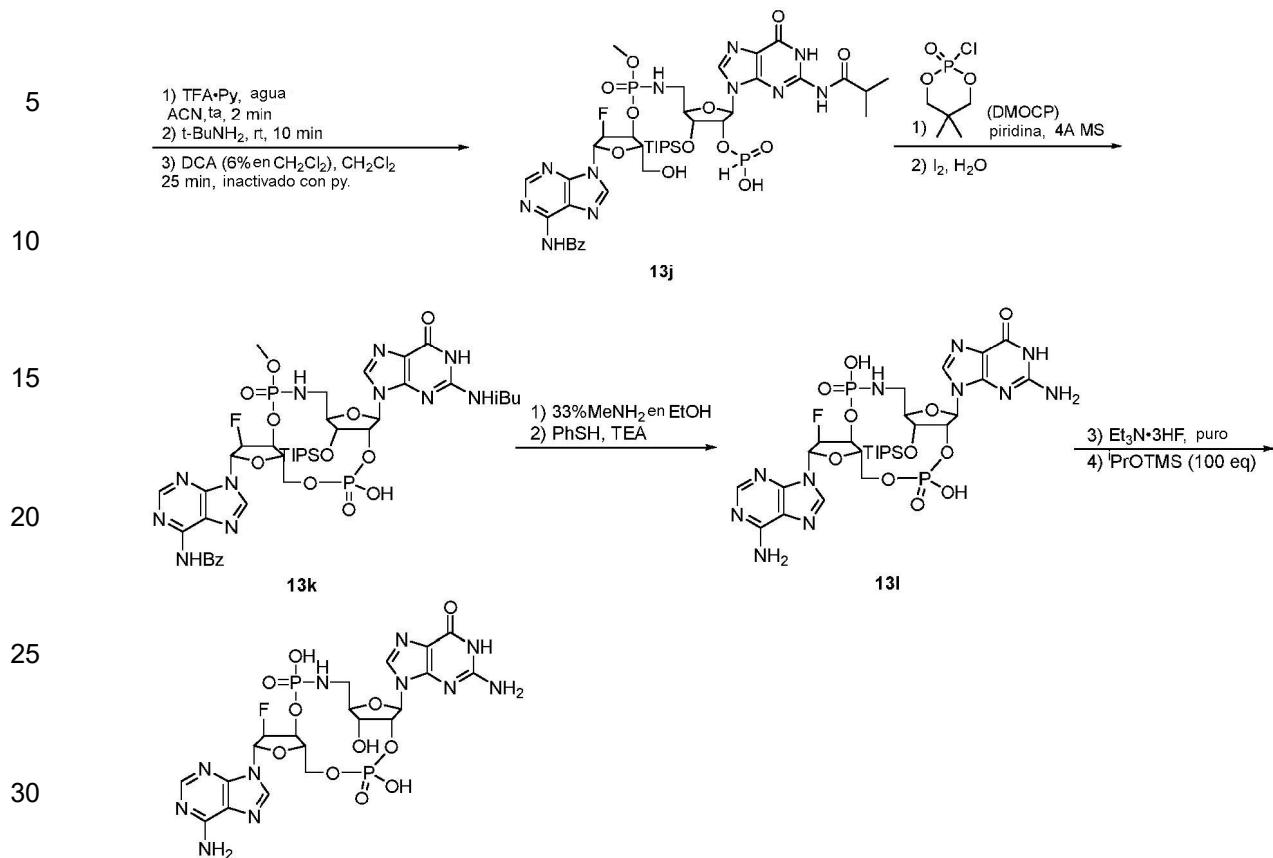
**Comp 19**

55

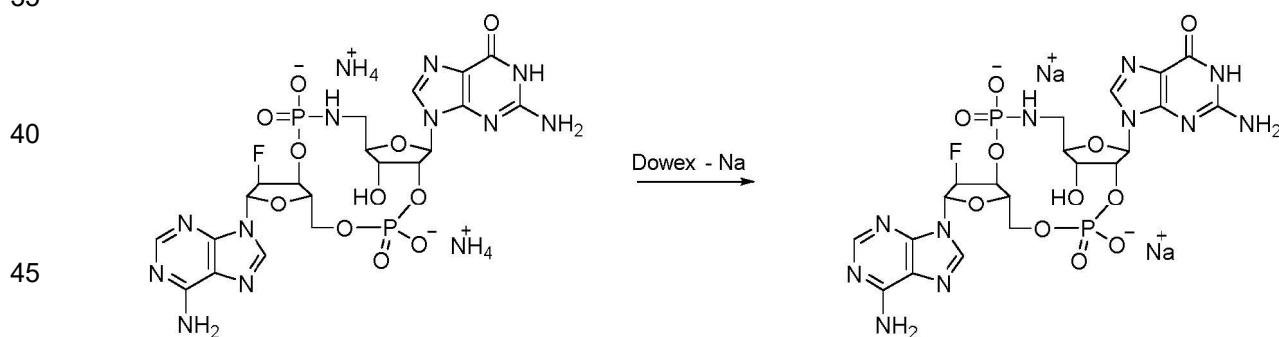
60

65





### Compuesto 19, sal de amonio

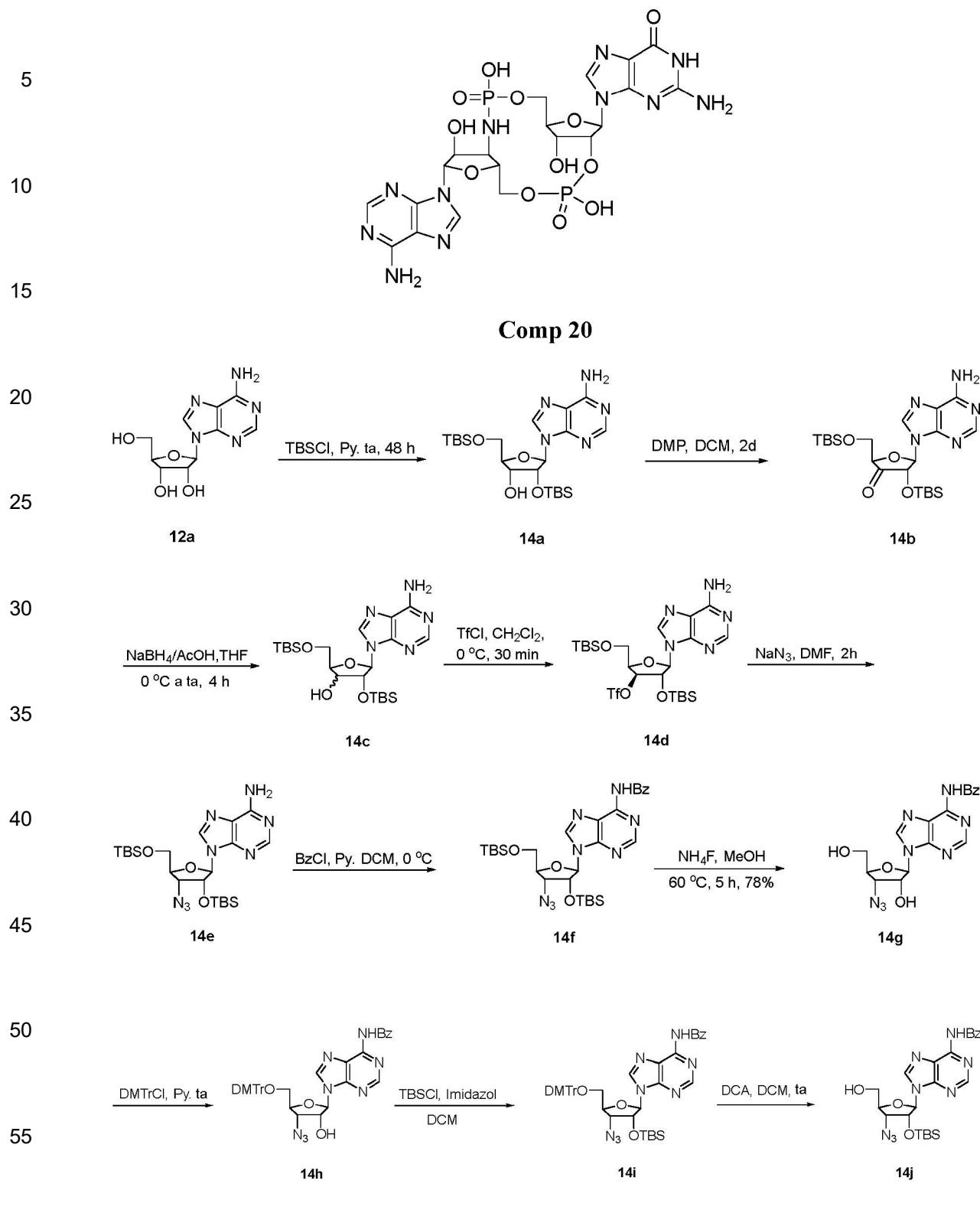


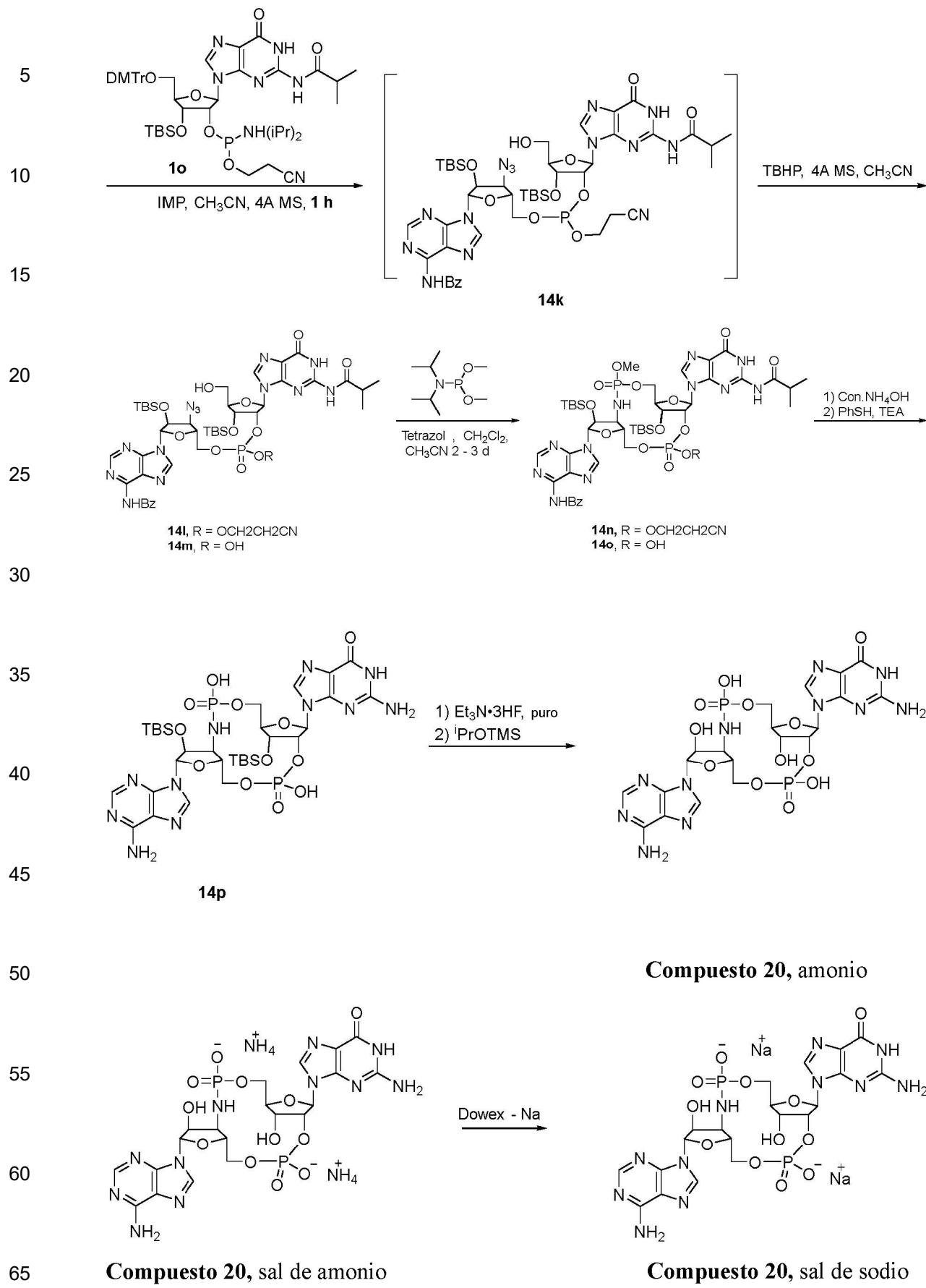
### Compuesto 19, sal de amonio

### Compuesto 19, sal de sodio

El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 14 describe una ruta posible para la preparación del compuesto **20** y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

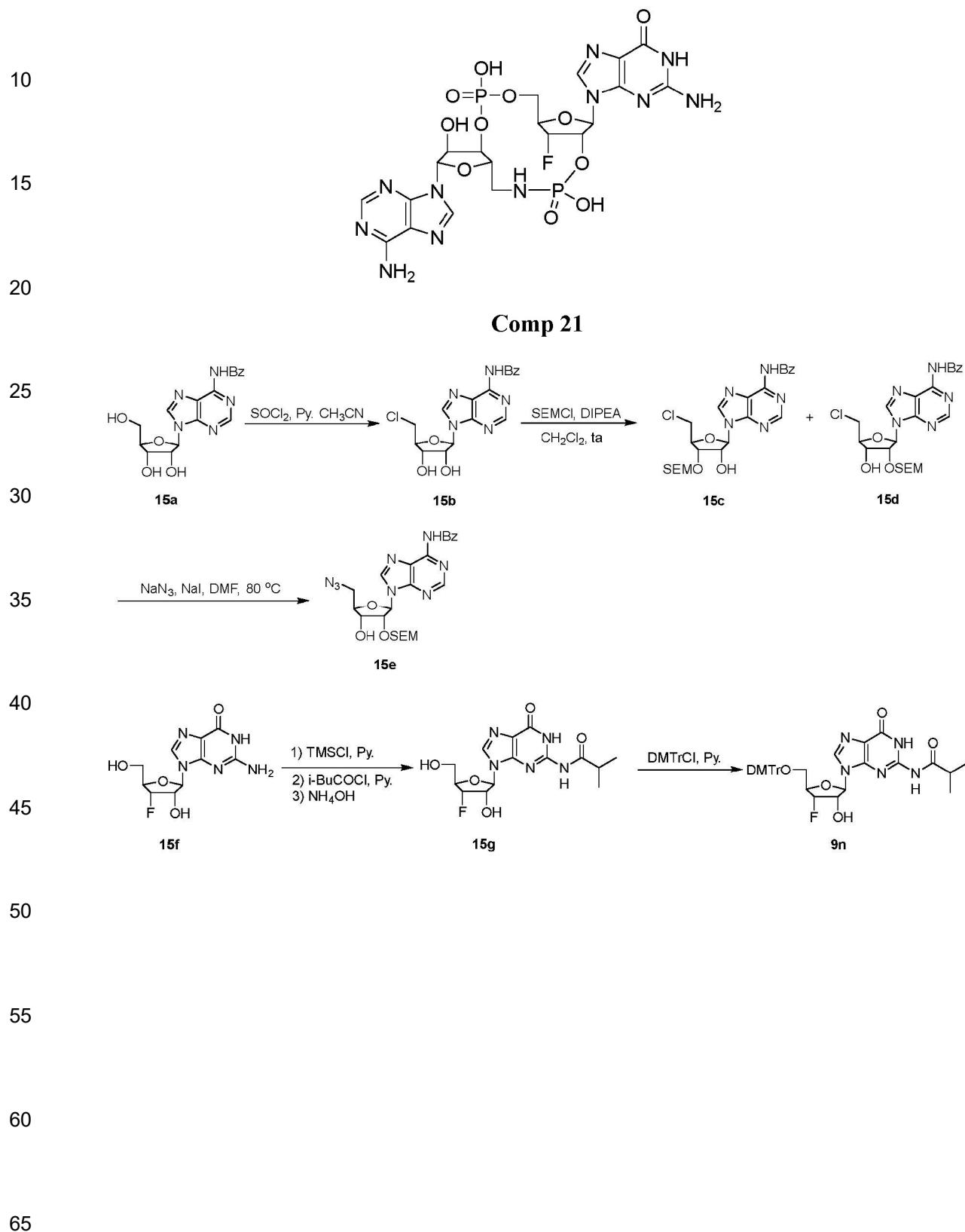
### Ejemplo de referencia 14

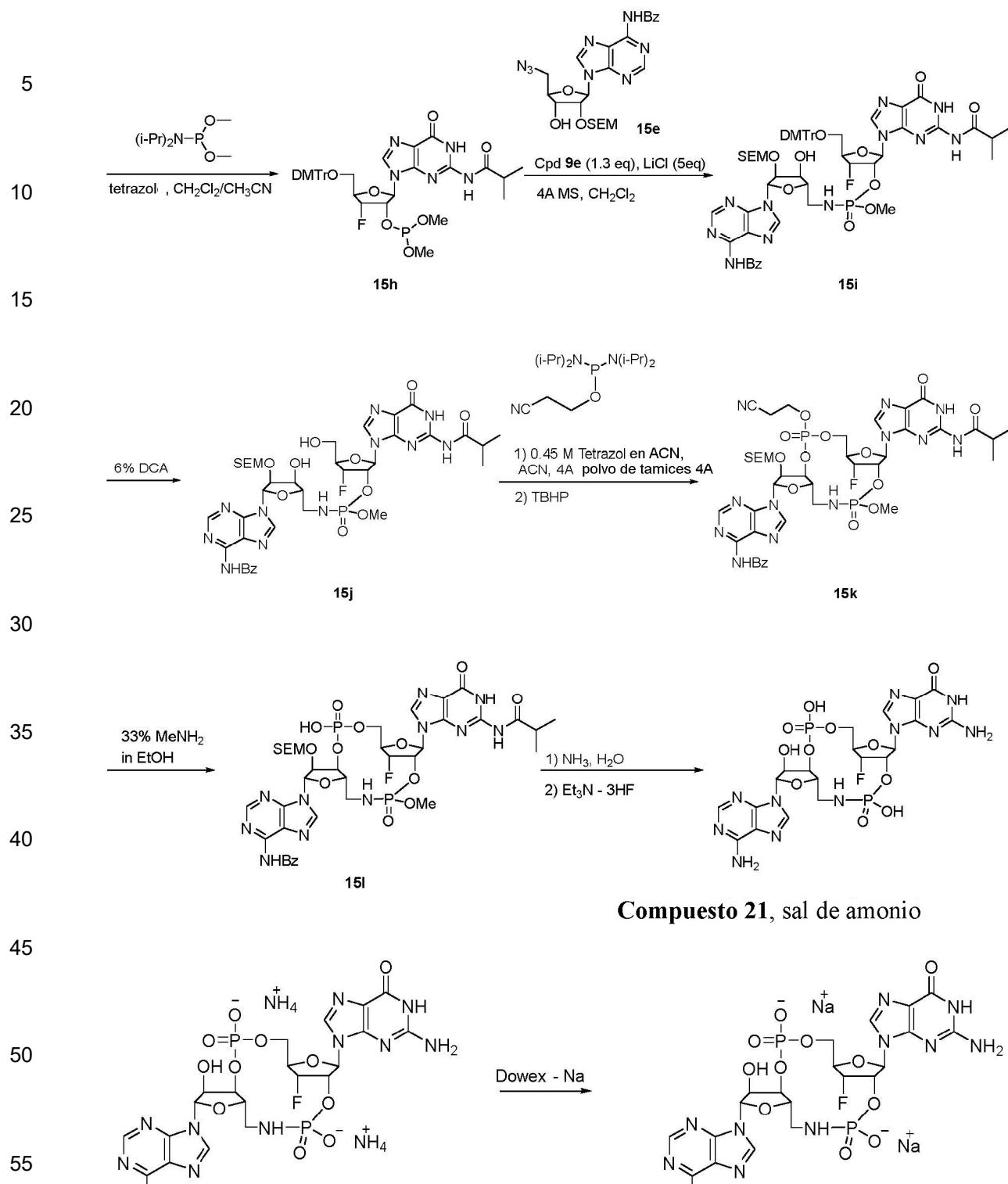




El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 15 describe una ruta posible para la preparación del compuesto **21** y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

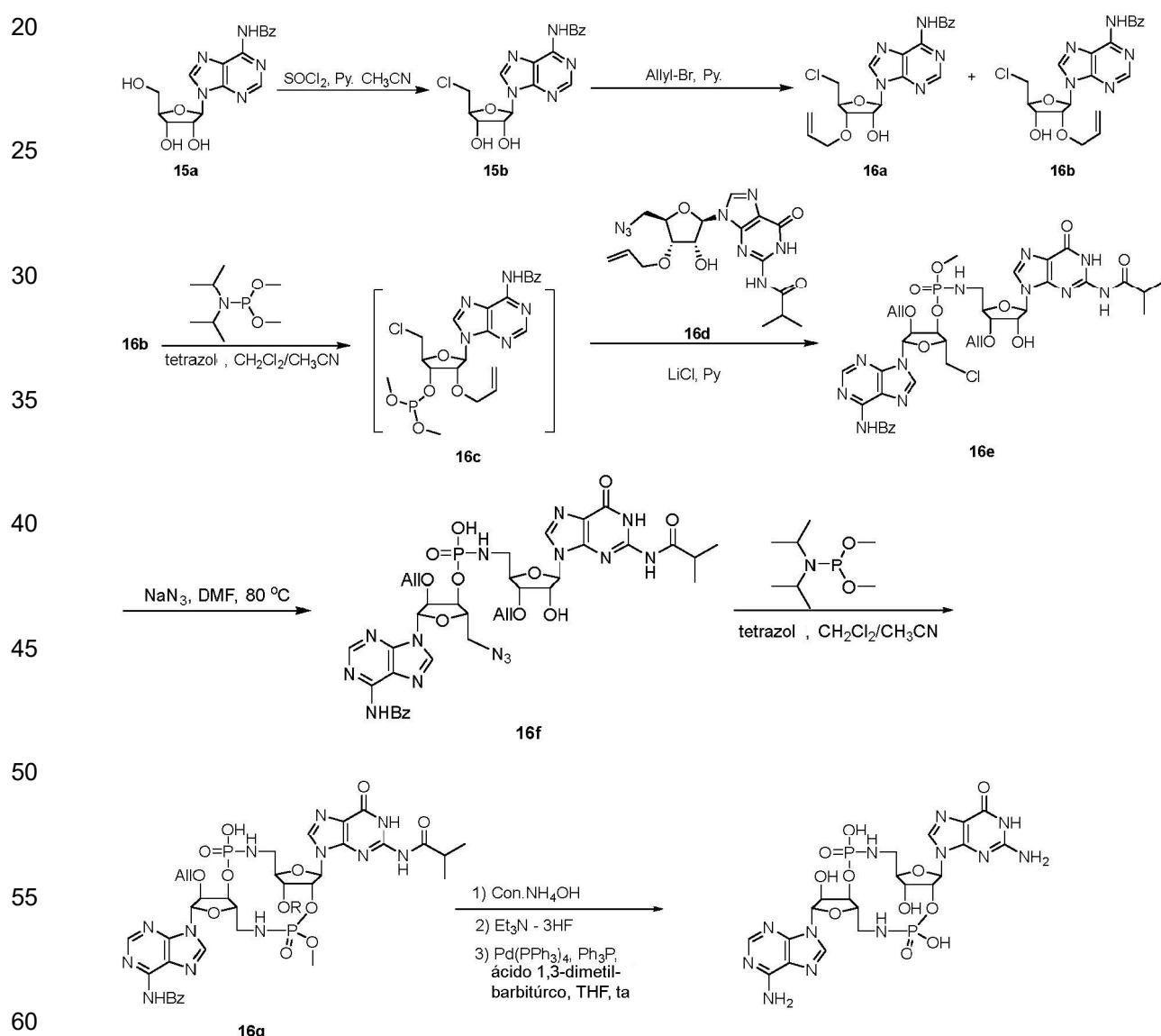
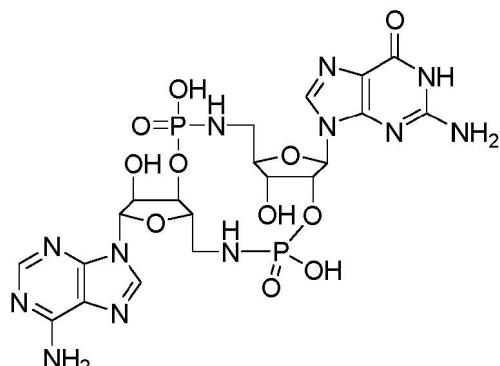
5 Ejemplo de referencia 15

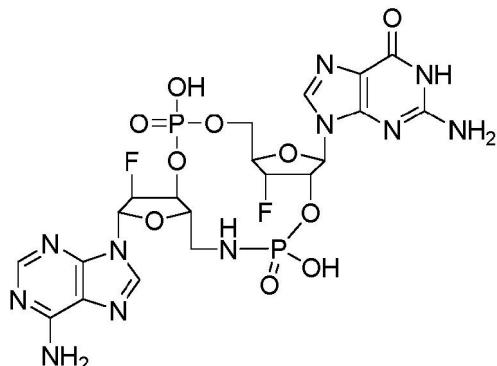
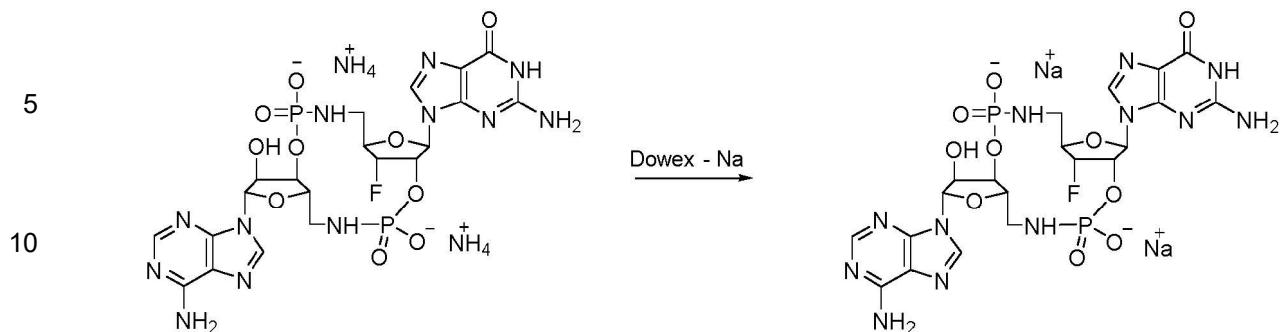


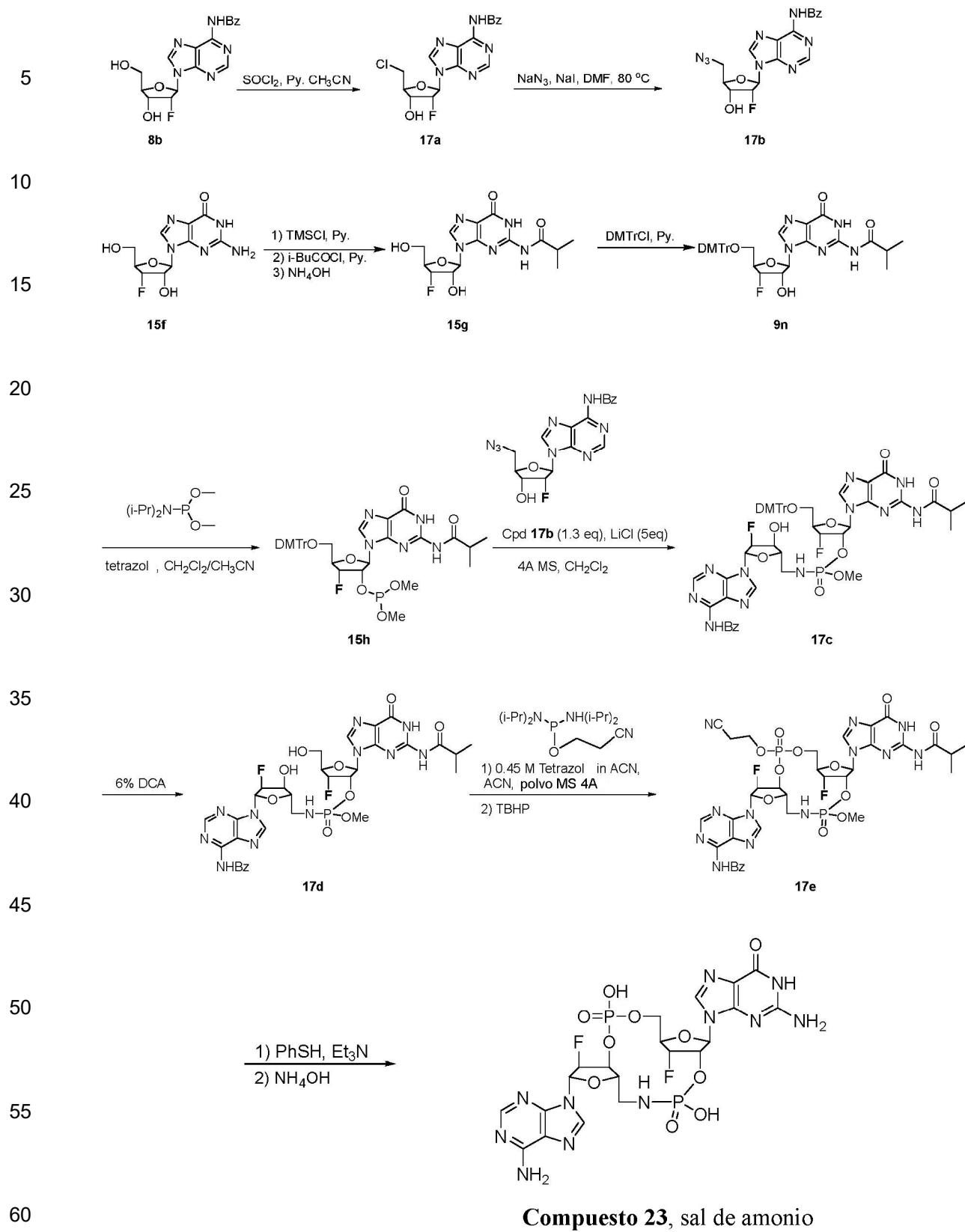


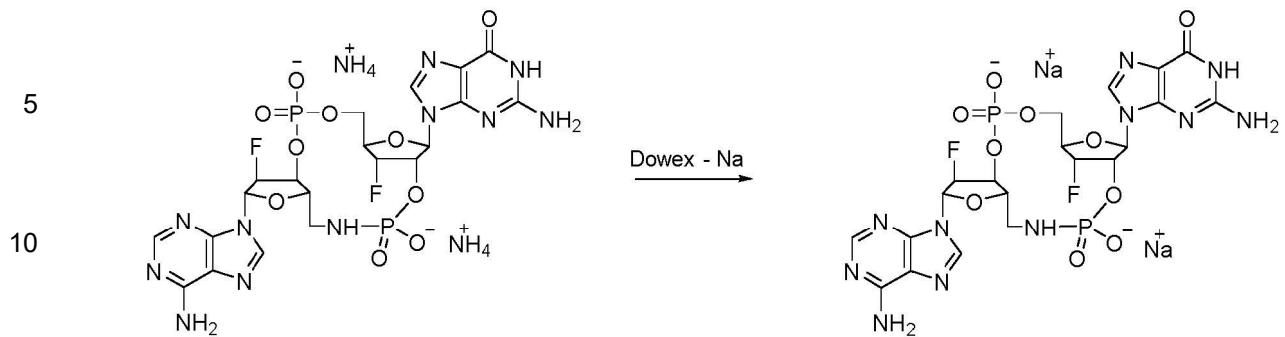
El esquema de reacción ilustrado en el Ejemplo de referencia 16 describe una ruta posible para la preparación del compuesto **22** y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

65 Ejemplo de referencia 16

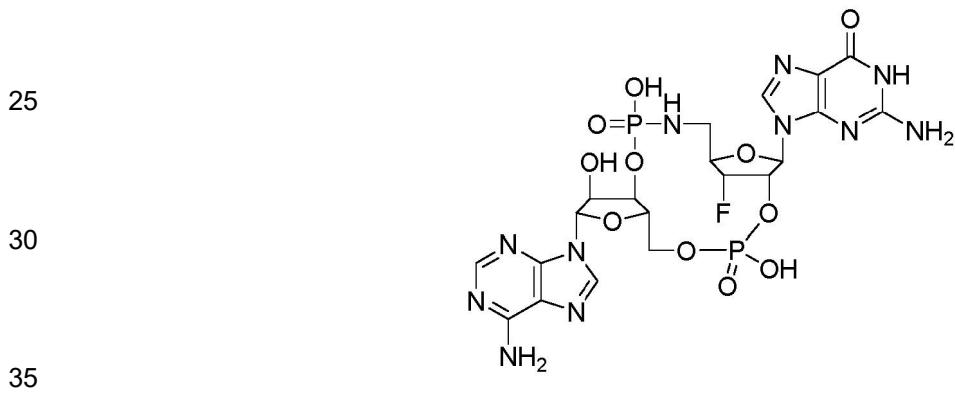


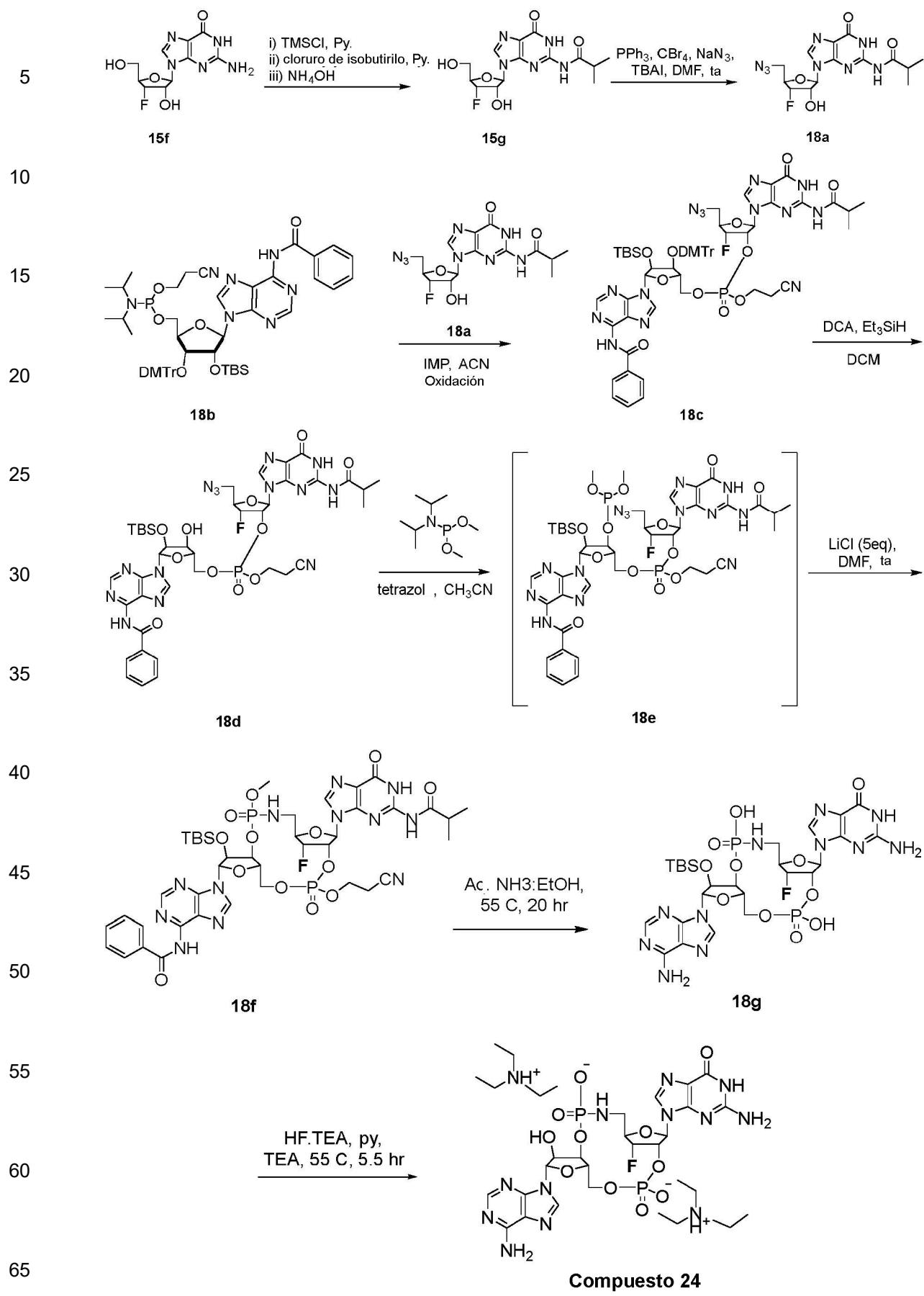


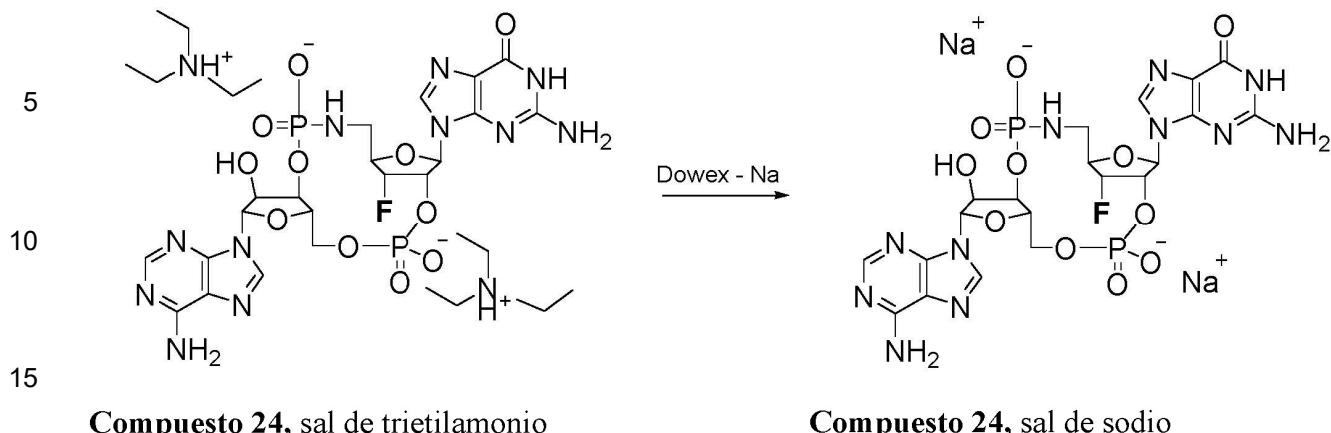




20 Ejemplo de referencia 18





20 Paso 1: Preparación del **compuesto 15g**

Se coevaporó 3'-fluoroguanosina, compuesto **15f** (2,0 g, 7,01 mmol) con tolueno anhídrico (3 x 20 ml), luego se suspendió en piridina anhídrica (35 ml). A esto se le añadió clorotrimetilsilano (8,0 ml, 63,09 mmol) a 0°C. Despues de agitar la mezcla de la reacción a t a durante 2 h, la reacción se enfrió a 0°C. Luego se añadió cloruro de isobutirilo (1,46 ml, 14,02 mmol). Despues de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla de la reacción se enfrió a 0°C, luego se añadieron agua (15 ml) y NH<sub>3</sub> ac. (15 ml). La mezcla de la reacción se agitó durante 30 min, luego se evaporó hasta la sequedad para proporcionar un residuo bruto que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (N 0-20% MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v) para proporcionar el compuesto **15g** (1,8 g) como un sólido blanco. LCMS: m/z 355.95 (M+1)<sup>+</sup>.

30 Paso 2: Preparación del **compuesto 18a**

Se coevaporó 3'-fluoro-N-isobutiril guanosina, **15g** (830 mg, 2,35 mmol) con tolueno anhídrico (2 x 20 ml) y se disolvió en DMF anhídrico (14 ml). Se añadieron trifenilfosfina (925 mg, 3,52 mmol), Na<sub>3</sub> (458 mg, 7,05 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (173 mg, 0,470 mmol) y CBr<sub>4</sub> (1,16 g, 3,52 mmol) a temperatura ambiente. Despues de agitar la mezcla de la reacción durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se evaporó hasta la sequedad y la mezcla de la reacción bruta resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (0-20% de MeOH en DCM, v/v) para proporcionar el compuesto **18a** (780 mg) como un polvo sólido blanco. ESI-MS: m/z 381.00 [M+H]<sup>+</sup>.

40 Paso 3: Preparación del **compuesto 18c**

Se agitó una solución del compuesto **18a** (800 mg, 2,10 mmol), polvo de tamices moleculares 4Å (3g) y perclorato de 1H-imidazol (3,52 g, 21,0 mmol) en CH<sub>3</sub>CN seco (80ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de Ar<sub>(g)</sub> durante 10 min. Se añadió Amidita **18b** (disponible comercialmente, 2,1 g, 2,10 mmol) en CH<sub>3</sub>CN seco (10 ml). Despues de agitar la mezcla de la reacción a temperatura ambiente durante 50 min, se añadió hidroperóxido de terc-butilo (5,5 M, 1,90 ml, 10,5 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó durante 1 h. La mezcla de la reacción se diluyó con EtOAc (150 ml), se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. (1x30 ml) y NaCl sat. ac. (1 x 30 ml), y la fase orgánica se evaporó hasta la sequedad a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 0-15% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v/v) para proporcionar el dímero **18c** (2,1 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 1283.30 [M+H]<sup>+</sup>.

55 Paso 4: Preparación del **compuesto 18d**

Se disolvió el compuesto **18c** (1,1 g, 0,86 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (24 ml). A la mezcla se le añadió trietilsilano (0,7 ml, 5,14 mmol) y ácido dicloroacético (0,43 ml, 5,14 mmol). Despues de agitar la mezcla de la reacción durante 35 min, la mezcla se inactivó con piridina (0,83 ml, 10,28 mmol) y se evaporó hasta la sequedad. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (20-80% de acetona en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v) para proporcionar el dímero **18d** (0,75 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 981.15 [M+H]<sup>+</sup>.

60 Pasos 5 y 6: Preparación del **compuesto 18f**

El compuesto **18d** (570 mg, 0,581 mmol) se coevaporó con tolueno anhídrico (2 x 20 ml) y se disolvió en CH<sub>3</sub>CN anhídrico (10 ml). Se añadieron polvo de tamices moleculares de 4Å (2 g) y tetrazol (8 ml, 3,48 mmol, 0,45 M en CH<sub>3</sub>CN), y se burbujeó Ar<sub>(g)</sub> en la mezcla de la reacción durante 2 min, luego se dejó agitar durante 10 min. ta. Se

añadió dimetil-N,N-diisopropilfosforamidita (0,3 ml, 1,16 mmol). Después de agitar la mezcla de la reacción durante 1 h a t a, la mezcla de la reacción se filtró y el filtrado se diluyó con EtOAc (150 ml), luego se lavó secuencialmente con NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. (1 x 30 ml) y NaCl sat. ac. (1 x 30 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> (agitando durante 10 min), se filtró y el filtrado se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. El compuesto bruto **18e** se usó en el

5 paso siguiente sin purificación adicional.

Paso 6: se disolvió el compuesto **18e** (0,581 mmol) en piridina anhidra (25 ml) y se añadió LiCl (150 mg, 3,48 mmol). Después de agitar la mezcla de la reacción a 50° C durante 5,5 h, la mezcla de la reacción se diluyó con EtOAc (300 ml) y se lavó con agua (1 x 25 ml). La fase acuosa se volvió a extraer con EtOAc (1 x 30 ml). Las fases 10 orgánicas combinadas se concentraron hasta la sequedad y se purificaron mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 0-15% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v/v) para proporcionar el compuesto **18f** (150 mg) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 1031.15 [M+H]<sup>+</sup>.

15 Paso 7: Preparación del **compuesto 18g**

El compuesto **18f** (125 mg, 0,121 mmol) se disolvió en NH<sub>3</sub>:EtOH acuoso (8 ml, 3:1, v/v). Después de agitar la reacción durante 20 h a 55° C, la mezcla se concentró hasta la sequedad. El precipitado resultante se purificó por 20 HPLC preparativa (fase móvil: Tampón A: TEAA 50 mM en agua, Tampón B: TEAA 50 mM en CH<sub>3</sub>CN de un gradiente del 25-65% en 20 min) para proporcionar el compuesto **18g** (58 mg) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 790.25 [M+H]<sup>+</sup>.

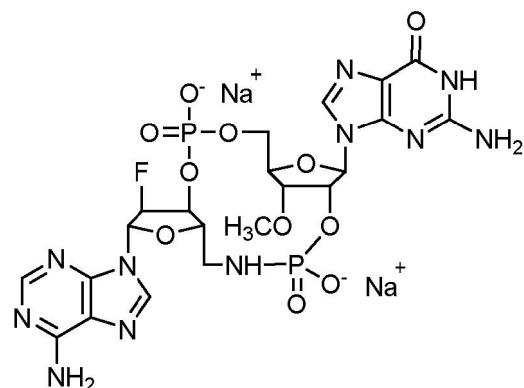
25 Paso 8: Preparación del **compuesto 24**

Se disolvió el compuesto **18g** (12 mg, 0,021 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 ml). A esto se le añadió 25 fluoruro de tetrabutilamonio (0,15 ml, TBAF 1M en THF). Después de agitar la reacción durante 2 h a t a, la mezcla de la reacción se concentró hasta la sequedad y se purificó por HPLC preparativa (fase móvil: tampón A: TEAA 50 mM en agua, tampón B: TEAA 50 mM en CH<sub>3</sub>CN del 0-25% de gradiente en 20 min) para proporcionar el compuesto 24 (2,5 mg) como su **sal TEA**. ESI-S: m/z 674.1 [M-1]<sup>-</sup>.

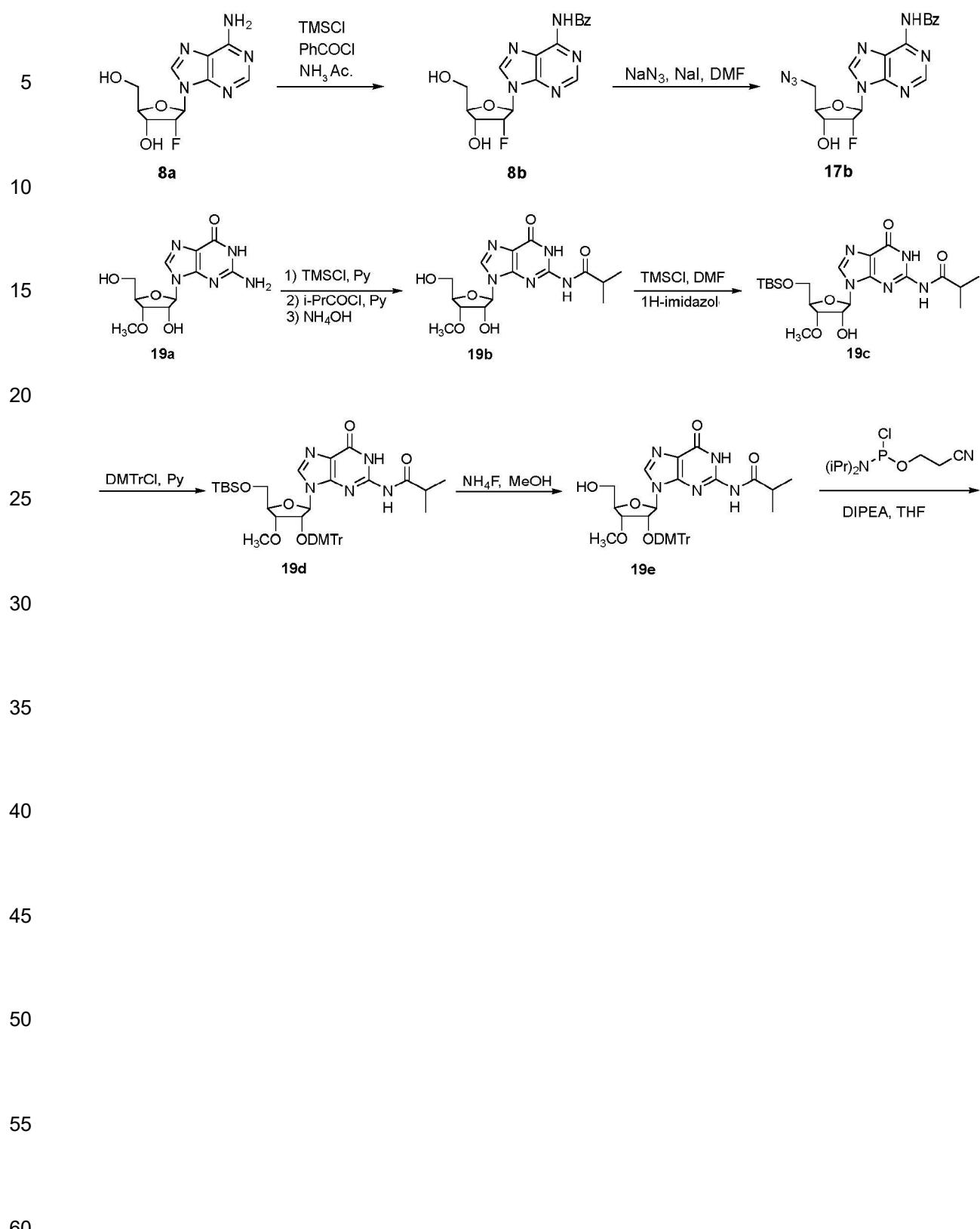
30 Paso 9: Preparación de la **sal de sodio del compuesto 24**

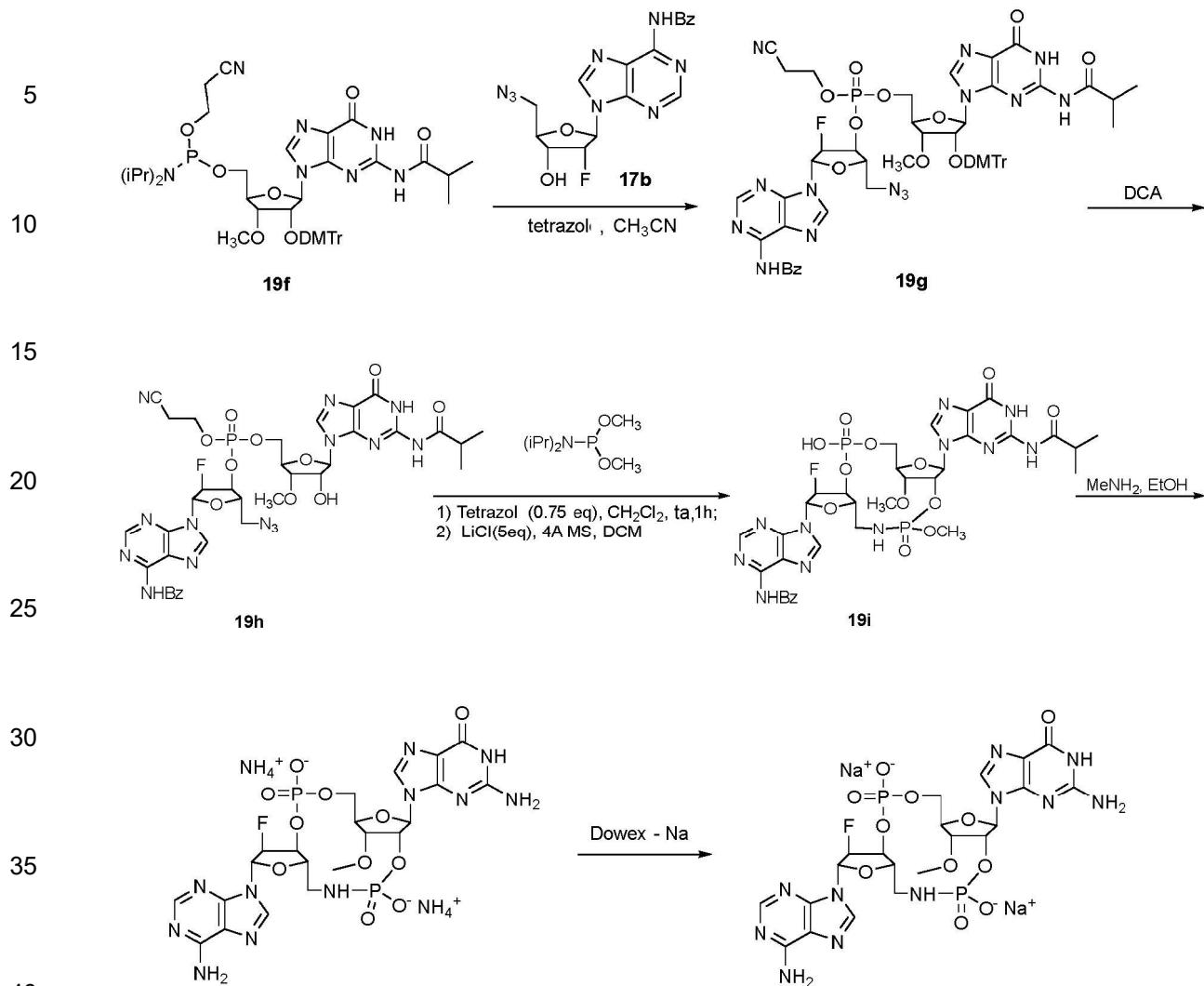
Se añadió un volumen de 3 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 2,5 mg de la **sal TEA del compuesto 24**) y se lavó con agua desionizada (2x). A la resina se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada y se lavó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% (por lo menos 4 CV), y luego con agua desionizada hasta pH neutro. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió solución acuosa de NaOH al 15% (50 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con solución acuosa de NaOH al 15% (por lo menos 4 CV), y luego con agua hasta pH neutro (por lo menos 4 CV). La **sal de TEA del compuesto 24** (2,5 mg) se disolvió en agua desionizada (2 ml) y se añadió a la parte 40 superior de la columna y se eluyó con agua desionizada. El compuesto se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liophilizó para dar el **compuesto sal de Na4** objetivo (2,0 mg) como una espuma blanca. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.23 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.95 (d, J=8.4 Hz, 1H), 5.42-5.58 (m, 1H), 5.12 (d, J=4 Hz, 0.5H), 5.01 (d, J=4 Hz, 0.5H), 4.62-4.70 (m, 1H), 4.50-4.58 (m, 0.5H), 4.46-4.51 (m, 0.5H), 4.40-4.43 (m, 1H), 4.30-4.40 (m, 2H), 3.92-4.02 (m, 1H), 3.15-3.25 (m, 2H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.95, -2.76; <sup>19</sup>F NMR (379 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -195.59 (quinteto); ESI-MS: m/z 674.1 [M-1]<sup>-</sup>.

45 Ejemplo de referencia 19



Comp 25





### Compuesto 19 sal de amonio

### Compuesto 19 sal de sodio

### Paso 1: Preparación del compuesto 8b

A una solución del compuesto **8a** (5,0 g, 18,57 mmol) en piridina (100 ml) se le añadió clorotrimetilsilano (18,16 g, 167,14 mmol) a temperatura ambiente. Después de 1,5 h, se añadió gota a gota a temperatura ambiente cloruro de benzoílo (7,83 g, 55,71 mmol). La mezcla final se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se inactivó con agua (50 ml) a 0° C y se añadió gota a gota NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (50 ml) a 0° C. La mezcla de la reacción se concentró y purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM /MeOH=10/1) para dar el compuesto **8b** (5,2 g) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD and DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.73 (d, J=0.8 Hz, 2H), 8.09-8.02 (m, 2H), 7.68-7.65 (m, 1H), 7.59-7.55 (m, 2H), 6.47-6.42 (m, 1H), 5.56-5.41 (m, 1H), 4.71-4.64 (m, 1H), 4.17-4.15 (m, 1H), 3.98-3.94 (m, 1H), 3.81-3.77 (m, 1H).

## 55 Paso 2: Preparación del compuesto 17b

El compuesto **8b** (1 g, 2,68 mmol) se coevaporó con tolueno anhídrico (2 x 20 ml) y se disolvió en DMF anhídrico (16 ml). Se añadieron a temperatura ambiente trifenilfosfina (1,05 g, 4,02 mmol),  $\text{NaN}_3$  (650 mg, 10,00 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (197,87 mg, 0,54 mmol), tetrabromuro de carbono (1,33 g, 4,02 mmol). Despues de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se evaporó hasta la sequedad y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH=10/1) para dar el compuesto **17b** (890 mg) como un polvo sólido blanco.

Paso 3: Preparación del **compuesto 19b**

5 A una solución del **compuesto 19a** (5,0 g, 16,82 mmol) en piridina (72 ml) se le añadió clorotrimetilsilano (16,45 g, 151,38 mmol) a temperatura ambiente. Después de 1,5 h, se añadió gota a gota a temperatura ambiente cloruro de isobutirilo (5,38 g, 50,46 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, la mezcla de la reacción se inactivó con agua (50 ml) a 0° C y se añadió gota a gota NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (50 ml) a 0° C. La mezcla de la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 10/1) para dar el compuesto **19b** (5,28 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 368.1 [M+1]<sup>+</sup>.

Paso 4: Preparación del **compuesto 19c**

10 A una solución del compuesto **19b** (1 g, 2,72 mmol) y 1H-imidazol (315,04 mg, 4,63 mmol) en DMF (15 ml) se le añadió TBSCl (656,46 mg, 4,36 mmol) a 0° C. Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se inactivó con MeOH (27 ml) y se concentró hasta obtener un residuo. El residuo se disolvió en DCM (35 ml), se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/MeOH=20/1) para proporcionar el compuesto **12c** (1,19 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 482.2 [M+1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.02 (d, J=5.6 Hz, 1H), 5.76 (d, J=4.4 Hz, 1H), 4.55 (t, J=4.4 Hz, 1H), 4.13 (d, J=3.2 Hz, 1H), 3.93-3.80 (m, 2H), 3.72 (d, J=9.6 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 1.16 (d, J=6.8 Hz, 6H), 0.81 (s, 9H), 0.00 (d, J=2.4 Hz, 6H).

15

Paso 5: Preparación del **compuesto 19d**

20 A una solución del compuesto **19c** (1,19 g, 2,47 mmol) en Py (12 ml) se le añadió 4,4'-(cloro(fenil)metileno)bis(metoxibenceno) (1,67 g, 4,94 mmol) y DMAP (0,33 g, 2,72 mmol), a temperatura ambiente. Después de agitar a 50° C durante la noche, la mezcla de la reacción se inactivó con agua y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con agua, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se filtraron, y se concentró el filtrado. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (diclorometano:metanol = 20:1) para proporcionar el compuesto **19d** (1,37 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z=784.5 [M+1]<sup>+</sup>.

25

Paso 6: Preparación del **compuesto 19e**

30 A una solución del compuesto **19d** (1,37 g, 1,75 mmol) en THF (5 ml) se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (7,86 ml, 7,86 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla de la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua. Luego, las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se filtraron y se concentraron hasta obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 20:1) para dar el compuesto **19e** (1,01 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z=670.1 [M+1]<sup>+</sup>.

35

Paso 7: Preparación del **compuesto 19f**

40 A una solución del compuesto **19e** (500 mg, 0,75 mmol) y DIPEA (289,469 mg, 2,240 mmol) en THF (1,88 ml) se le añadió 3-((cloro(diisopropilamino)fosfanil)oxi)propanonitrilo (530,10 mg, 2,240 mmol) a 15° C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, se añadió agua a la mezcla de la reacción y luego la mezcla se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se filtraron y se concentraron hasta obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo:acetato de etilo = 1:2) para dar el compuesto **19f** (411 mg). ESI-MS: m/z=787.1 [M-N(Pi)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

45

Paso 8: Preparación del **compuesto 19g**

50 Se agitó una solución del compuesto **17b** (134,428 mg, 0,337 mmol) y tamices moleculares de 4 Å (2 g) en CH<sub>3</sub>CN (10 ml) se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 3 min. Se añadió 1H-tetrazol (4,499 ml, 2,025 mmol). Después de 10 min, se añadió a temperatura ambiente una solución del compuesto **19f** (411 mg, 0,472 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (3,44 ml). Después de agitar a 26° C durante 1 h, se añadió hidroperóxido de terc-butilo (0,337 ml, 1,687 mmol) a la mezcla de la reacción. Después de agitar a 26° C durante 1 h, la mezcla se concentró para proporcionar el compuesto **19g**, que se usó para el paso siguiente sin purificación adicional.

55 Paso 9: Preparación del **compuesto 19h**

60 A una solución del compuesto **19g** (239,55 mg, 0,202 mmol) en agua y diclorometano, se le añadió ácido dicloroacético (91,769 mg, 0,712 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, se añadió trietilsilano (2 ml) a la mezcla de la reacción. Luego se añadió piridina (0,033 ml, 0,41 mmol). Después de agitar durante 10 min a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH=10:1) para proporcionar el compuesto **19h** (136,8 mg) como un sólido amarillo claro. ESI-MS: m/z=881.2 [M+1]<sup>+</sup>.

65

## Paso 10: Preparación del compuesto 19i

Se agitó una solución del compuesto **19h** (136,8 mg, 0,155 mmol), 1H-tetrazol (0,259 ml, 0,116 mmol), LiCl (32,926 mg, 0,777 mmol) y tamices moleculares 4Å en DCM (17,1 ml) a t a durante 2 h. Se añadió dimetildiisopropilfosforamidita (31,513 mg, 0,163 mmol). Después de agitar a t a durante la noche, la mezcla de la reacción se filtró, concentró y purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: Phenomenex Gemini C18 250 x 50 10 µm; Condición: agua (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM) (A) - CH<sub>3</sub>CN (B); Comienzo B: 16; Fin B: 46; Caudal: 22 ml/min) para proporcionar el compuesto **19i** (40,1 mg) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 878.3= [M+1]<sup>+</sup>.

## Paso 11: Preparación del compuesto 25

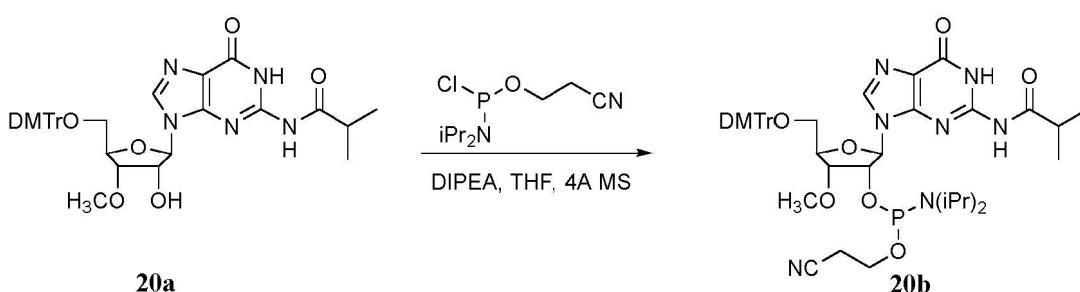
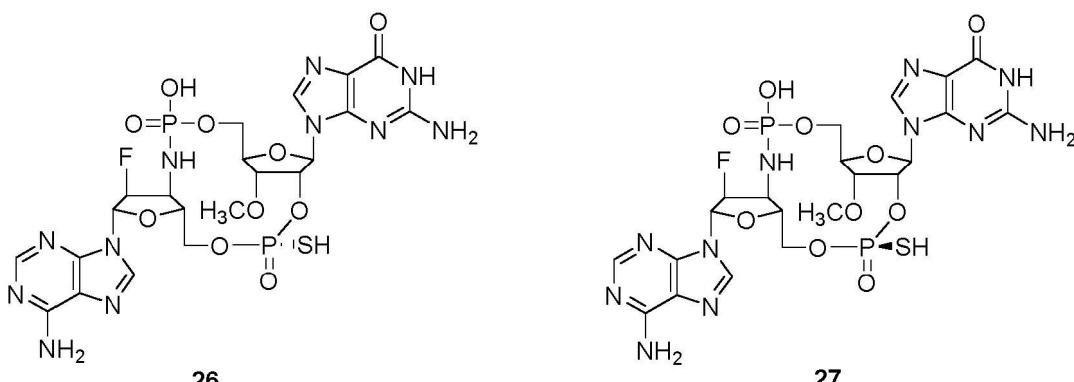
Se agitó una solución del compuesto **19i** (10 mg, 0,011 mmol) en metanamina en EtOH (6 ml) a 50° C durante 1 día. Luego, la mezcla de la reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: DuraShell 150 x 25 mm 5 mm; Condición: agua (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM) (A) - CH<sub>3</sub>CN (B); Inicio B: 0; Final B: 15; Caudal: 35 ml/min) para proporcionar el compuesto **25**, sal de amonio (1,5 mg) como un sólido blanco. <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.69, -1.28.

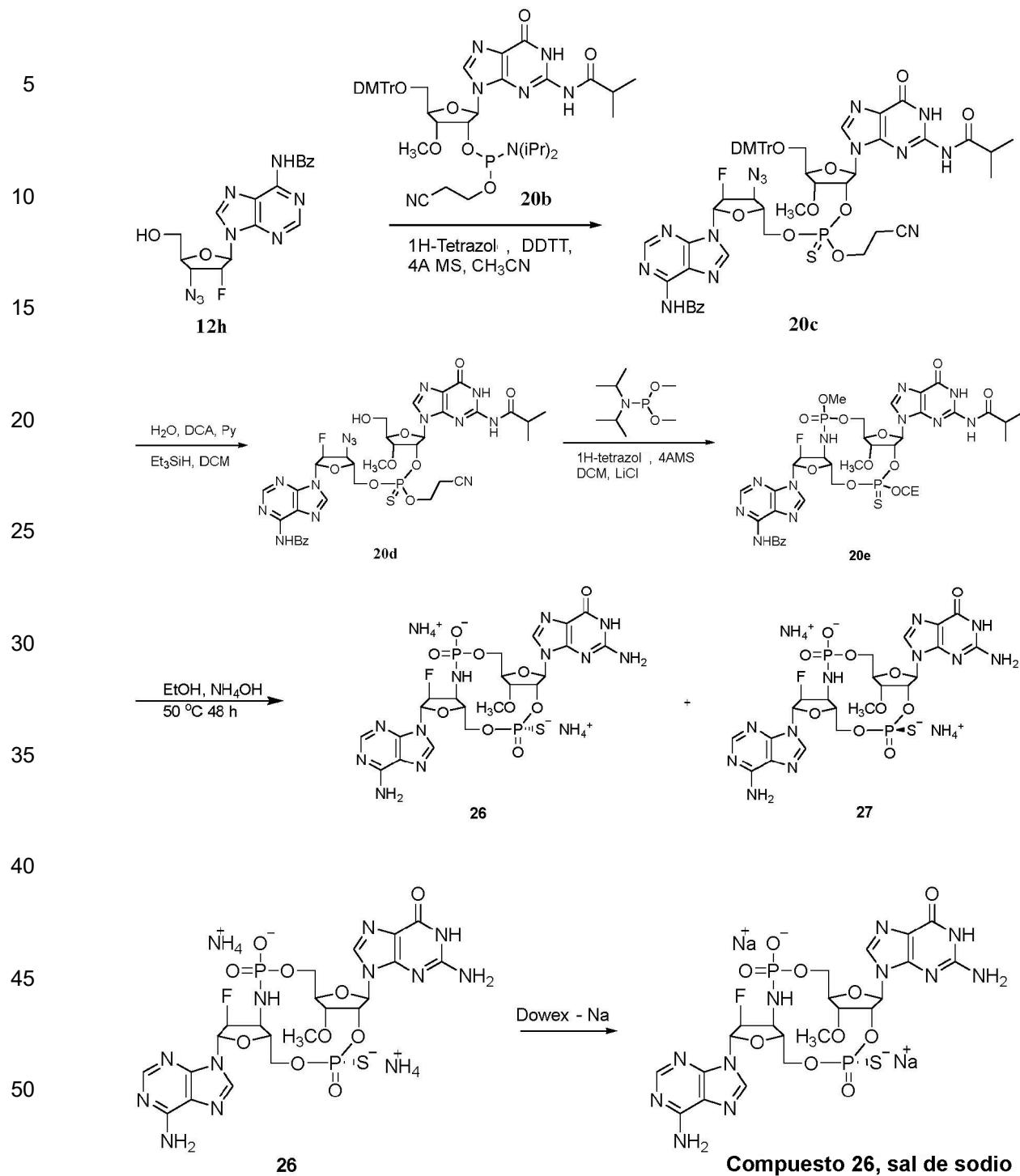
## Paso 12: Preparación del compuesto 25

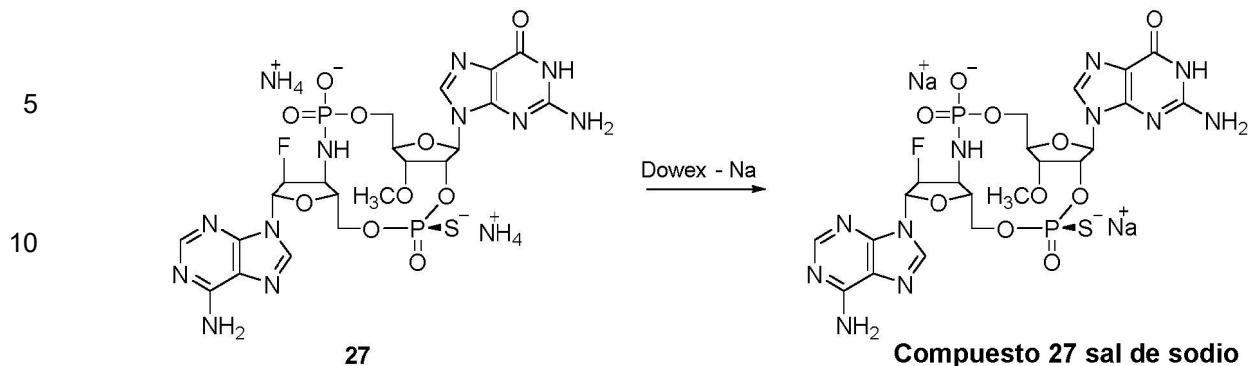
Se añadió un volumen de Dowex (50W x 8, 200-400, forma H) (99 ml) a un vaso de precipitados (para 74,9 mg de **sal de amonio del compuesto 25**) y se lavó con agua desionizada (2x). A la resina se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada y se lavó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna (CV)), y luego con agua desionizada hasta que tuvo un pH neutro. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió una solución de NaOH al 15% en agua desionizada (50 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en agua desionizada (por lo menos 4 CV), y luego con agua hasta pH neutro (por lo menos 4 CV). La **sal de amonio del compuesto 25** se disolvió en agua desionizada (74,9 mg en 25 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua desionizada. El compuesto **25** eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para proporcionar la **sal de sodio del compuesto 25** (63,0 mg). ESI-MS: m/z=689.9 [M+1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.08-8.05 (m, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.37-7.36

(m, 1H), 6.41-6.33 (m, 1H), 5.88 (d, J=8.0 Hz, 1H), 5.64 (d, J=4.4 Hz, 1H), 5.44-5.27 (m, 2H), 4.48 (d, J=2.4 Hz, 1H), 4.38-4.30 (m, 2H), 4.20-4.11 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.46 (d, J=13.6 Hz, 1H), 3.22-3.18 (m, 1H); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O) -196.87 (s, 1F); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) 7.80 (s, 1P), -1.22 (s, 1P).

## Ejemplo de referencia 20

Compuestos **26** y **27**





Phenomenex Synergi C18 150x30 mmx4 um; fase móvil: agua ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM)-ACN del 0% al 15%, caudal: 25 ml/min) para proporcionar sal de amonio de **26** (16,3 mg) y sal de amonio de **27** (50,1 mg) como sólidos blancos.

5 **Paso 7: Preparación de sal de sodio 26**

10 Se añadió un volumen de 20 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 16,3 mg de **26**) y se lavó con agua desionizada (2x). A la resina se le añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% en agua desionizada (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% en agua desionizada y se lavó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna (CV)), y luego con agua desionizada hasta que tuvo un pH neutro. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió una solución de NaOH al 15% en agua desionizada (50 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en agua desionizada (por lo menos 4 CV), y luego con agua hasta pH neutro (por lo menos 4 CV). La sal de amonio del compuesto **26** se disolvió en agua desionizada (16,3 mg en 20 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua desionizada. El compuesto **26** se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para dar la **sal de sodio del compuesto 26** (8,5 mg). ESI-MS:  $m/z=705.8$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.50 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 6.35 (d,  $J=13.6$  Hz, 1H), 5.94-5.80 (m, 2H), 5.33-5.10 (m, 1H), 4.45-4.35 (m, 2H), 4.30-4.13 (m, 4H), 4.09-4.01 (m, 2H), 3.51 (s, 3H);  $^{19}\text{F}$  NMR (377 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 6-200.69 (s, 1F);  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  53.89 (s, 1P), 6.60 (s, 1P).

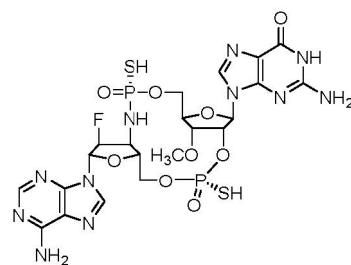
20 **Paso 8: Preparación de sal de sodio de 27**

25 Se añadió un volumen de 50 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 50,1 mg de **27**) y se lavó con agua desionizada (2x). A la resina se le añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% en agua desionizada (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% en agua desionizada y se lavó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna (CV)), y luego con agua desionizada hasta que tuvo un pH neutro. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió una solución de NaOH al 15% en agua desionizada (50 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en agua desionizada (por lo menos 4 CV), y luego con agua hasta pH neutro (por lo menos 4 CV). La sal de amonio del compuesto **27** se disolvió en agua desionizada (50,1 mg en 50 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua desionizada. El compuesto **27** se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para dar la **sal de sodio del compuesto 27** (29 mg). ESI-MS:  $m/z=705.8$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.25-8.11 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 6.30 (d,  $J=13.8$  Hz, 1H), 5.85-5.73 (m, 2H), 5.33-5.12 (m, 1H), 4.51-4.42 (m, 2H), 4.33-4.26 (m, 2H), 4.22-4.11 (m, 2H), 4.09-4.00 (m, 2H), 3.50 (s, 3H);  $^{19}\text{F}$  NMR (377 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 6-200.70 (s, 1F);  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  51.87 (s, 1P), 6.53 (s, 1P).

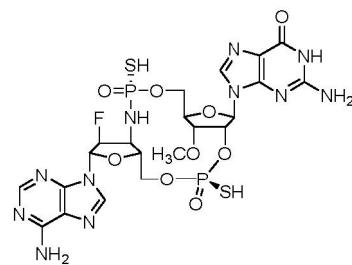
35 Ejemplo de referencia 21

40 **Compuestos 28, 29, 30 y 31**

45



**28,**

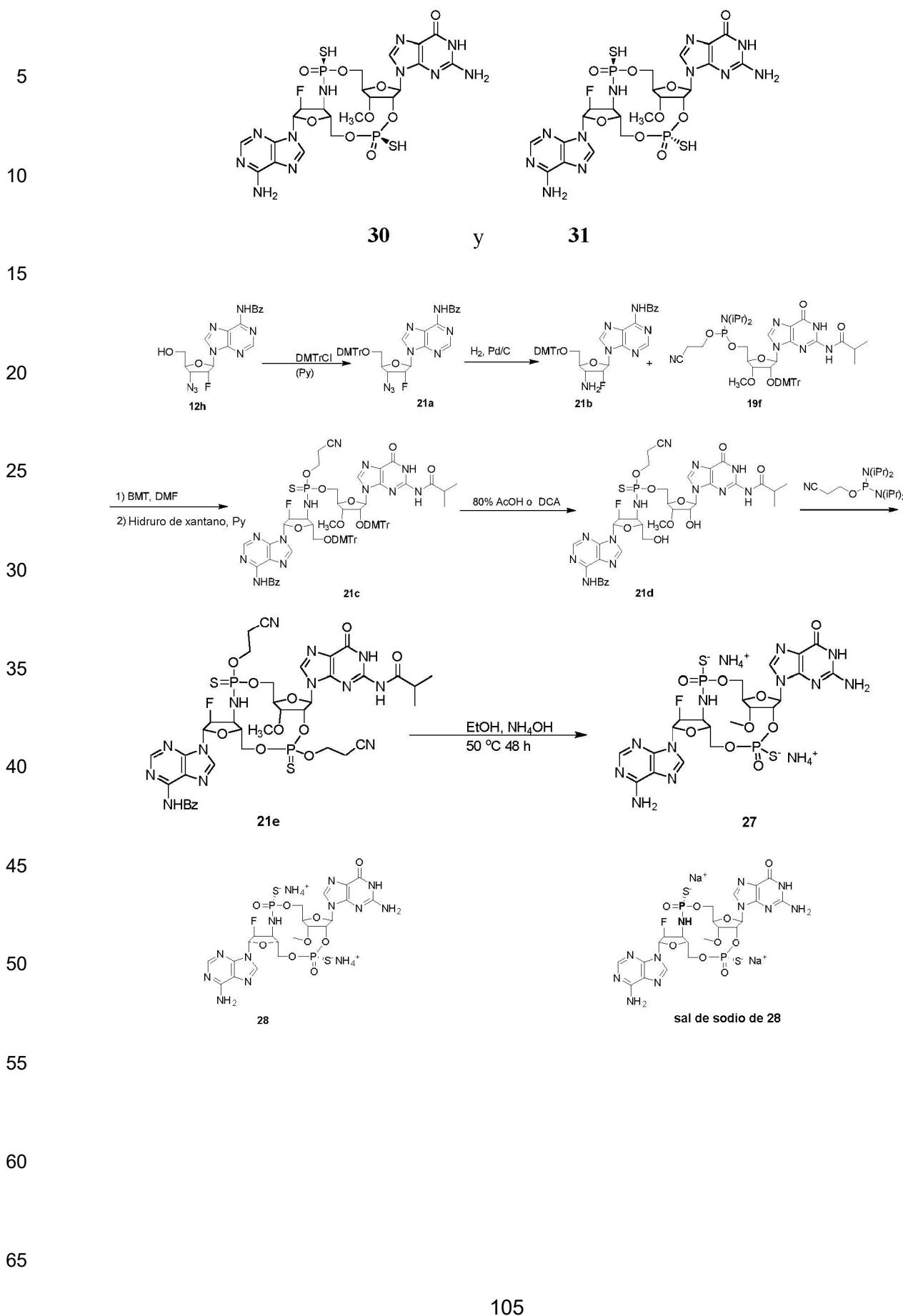


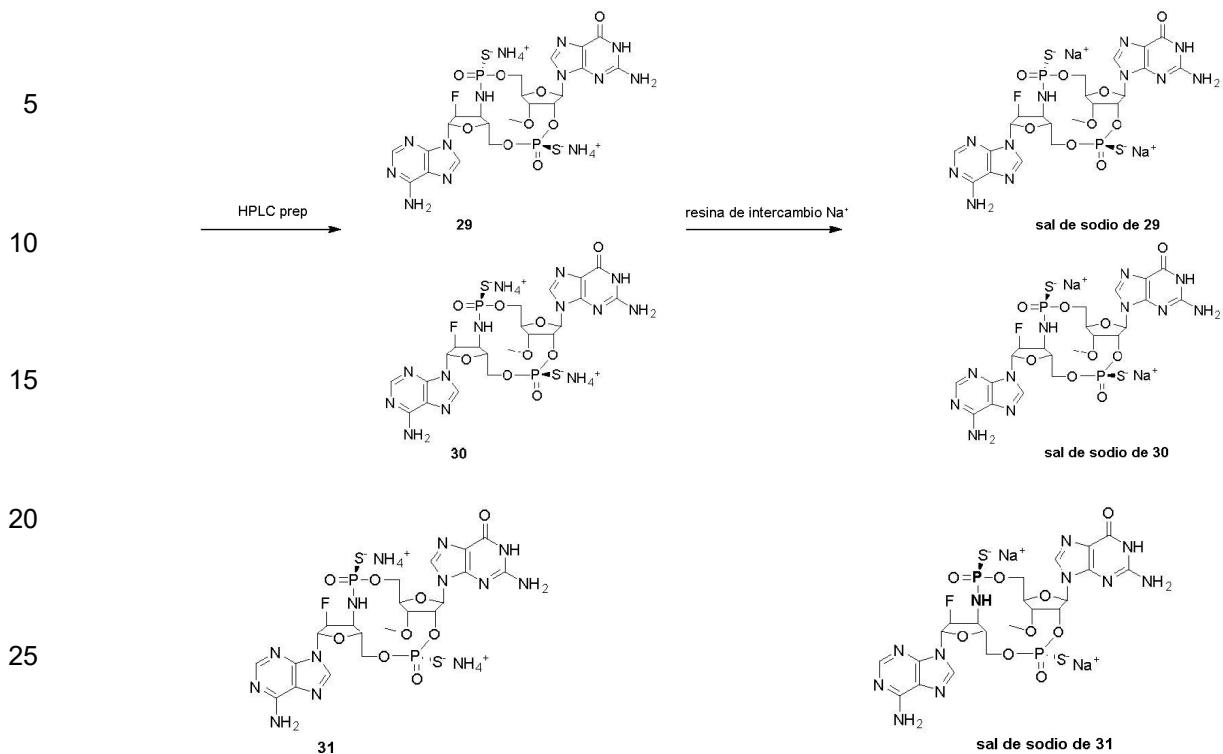
**29,**

55

60

65





30 Paso 1: Preparación de **21a**

A una solución de **12h** (500 mg, 1,22 mmol) en piridina (6 ml) se le añadió DMTrCl (0,638 g, 1,88 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla de la reacción durante 4 h a temperatura ambiente, se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) y se inactivó con agua. La mezcla de la reacción se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH = 1:0 a 10:1) para dar **21a** como un sólido amarillo (933 mg).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  9.10 (s, 1H), 8.82-8.75 (m, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.66-8.57 (m, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.04 (d,  $J$ =7.3 Hz, 2H), 7.72-7.59 (m, 2H), 7.58-7.50 (m, 1H), 7.58-7.50 (m, 1H), 7.36 (d,  $J$ =7.0 Hz, 2H), 7.26-7.23 (m, 4H), 6.80 (d,  $J$ =8.3 Hz, 4H), 6.26 (dd,  $J$ =1.6, 18.4 Hz, 1H), 5.99-5.82 (m, 1H), 4.76-4.65 (m, 1H), 4.35-4.29 (m, 1H), 3.67-3.57 (m, 1H), 3.37 (dd,  $J$ =3.6, 11.2 Hz, 1H); ESI-MS:  $m/z$ =701.1 [ $\text{M}+\text{1}]^+$ .

Paso 2: Preparación de **21b**

45 Una mezcla de **21a** (933 mg, 1,105 mmol) con Pd/C (2,606 g, 2,210 mmol) como catalizador en  $\text{EtOAc}$  (130 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente (presión atmosférica). Después de 2 h, el catalizador se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH = 1:0 a 10:1) para proporcionar **21b** como un sólido blanco (712 mg).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  9.07 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.07-7.99 (m, 2H), 7.65-7.58 (m, 1H), 7.56-7.50 (m, 2H), 7.41-7.36 (m, 2H), 7.30 (d,  $J$ =1.2 Hz, 2H), 7.28-7.27 (m, 2H), 7.25-7.17 (m, 2H), 6.82-6.77 (m, 4H), 6.30 (d,  $J$ =18 Hz, 1H), 5.51-5.34 (m, 1H), 4.13-4.00 (m, 2H), 3.64-3.56 (m, 1H), 3.44 (dd,  $J$ =3.6, 10.8 Hz, 1H); ESI-MS:  $m/z$ =675.1 [ $\text{M}+\text{1}]^+$ .

Paso 3: Preparación de **21c**

55 Se destiló azeotrópicamente una mezcla de **21b** (300 mg, 0,445 mmol) y 5-bencilmercaptotetrazol (BMT) (213,69 mg, 1,11 mmol) con acetonitrilo tres veces y se disolvió en DMF anhidro (20 ml). Se añadió gota a gota una solución de **19f** (1,54 g, 1,78 mmol) en DMF (4 ml) a ta en  $\text{N}_2$  y la mezcla de la reacción se agitó a ta durante 1 hora. Se añadieron a la mezcla de la reacción hidruro de xantano (133,60 mg, 0,89 mmol) y piridina (140,68 mg, 1,78 mmol). Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadió una solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (20 ml) y la mezcla se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml). Luego, las capas orgánicas se combinaron y se lavaron sucesivamente con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado (30 ml), salmuera (50 ml), luego se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH = 1/0 a 10/1) para proporcionar **21c** (510 mg) como un aceite amarillo. ESI-MS:  $m/z$ =1174.3 [ $\text{M}+\text{1}]^+$ .

Paso 4: Preparación de **21d**

5 A una solución de **21c** (3,1 g) en agua (476,03 mg, 26,42 mmol) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) se le añadió ácido dicloroacético (1,19 g, 9,248 mmol, 6% en DCM) a temperatura ambiente, seguido de trietilsilano (20ml). Después de agitar a ta durante 24 h, se añadió piridina (0,85 ml). Después de agitar durante 10 min, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH = 1:0 a 10:1) para dar como un sólido amarillo (1,247 g).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.67 (d,  $J$ =2.4 Hz, 1H), 8.64 (d,  $J$ =4.2 Hz, 1H), 8.19-8.14 (m, 1H), 8.12-8.03 (m, 1H), 8.12-8.03 (m, 3H), 7.68-7.61 (m, 1H), 7.59-7.51 (m, 2H), 6.39 (dd,  $J$ =11.8, 18.0 Hz, 1H), 5.91-5.83 (m, 1H), 5.91-5.83 (m, 1H), 5.62-5.38 (m, 1H), 4.71-4.51 (m, 2H), 4.44-4.11 (m, 8H), 4.09-3.96 (m, 2H), 3.85-3.73 (m, 1H), 3.85-3.73 (m, 1H), 3.34 (s, 1H), 1.22-1.17 (m, 7H); ESI-MS:  $m/z$ =1174.3 [M+1]<sup>+</sup>.

Paso 5: Preparación de **21e**

15 Se coevaporó el compuesto **21d** (370 mg, 0,425 mmol) con una mezcla de tolueno anhídrico: acetonitrilo (1:1, v/v, 3 x 10 ml). Luego, el residuo resultante se disolvió en  $\text{CH}_3\text{CN}$ /THF (35 ml, v/v = 7:3), seguido de la adición de tamices moleculares 4Å (4 g) y tetrazol (7,55 ml, 0,45 M en  $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Después de agitar a 25° C durante 0,5 h, se añadió a la solución anterior 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo (204,91 mg, 0,68 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10 ml). La mezcla se agitó a 25° C durante 2 h y se añadió tetrazol adicional (1,88 ml, 0,45 M en  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) a la solución anterior. Después de agitar la mezcla a 25° C durante 0,5 h, se añadió a la solución DDTT (436,20 mg, 2,14 mmol). Después de agitar la mezcla a 25° C durante 1,5 h, la mezcla de la reacción se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó con un segundo lote mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH=10:1) para dar **21e** (436 mg).

Paso 6: Preparación de **28 a 31**

25 A una solución de **21e** (463 mg, 0,46 mmol) en EtOH (20 ml) se añadió  $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$  (20 ml). Después de agitar la solución resultante a 50° C durante 2 días, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto **27** como una mezcla de diastereoisómeros. A continuación, el compuesto **27** se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna: Agela Durashell C18 15 0 x25 5  $\mu\text{M}$ ; fase móvil: agua (0,05% de hidróxido amónico v/v) -  $\text{CH}_3\text{CN}$  del 0% al 13%, caudal: 35 ml/min) para obtener un producto bruto que se volvió a purificar mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna: Agela Durashell C18 150 x 25 5  $\mu\text{M}$ ; fase móvil: agua (0,05% de hidróxido de amoníaco v/v) - ACN del 0% al 10%, caudal: 35 ml/min) para proporcionar los compuestos **28** (10,6 mg), **29** (13,6 mg), **30** (8,3 mg) y **31** (5,5 mg) como sólidos blancos (sales de amonio). LCMS para **28 a 31** - ESI-MS:  $m/z$ =721.7 [M+1]<sup>+</sup>.

Paso 7: Preparación de **28, sal de sodio**

40 Se añadió un volumen de 15 ml de Dowex 50W x 8, 200-400 (forma H) a un vaso de precipitados (para 10,6 mg de sal de amonio **15**) y se lavó con agua desionizada (2x). A la resina se le añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% en agua desionizada (50 ml), la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a una columna con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% en agua desionizada y se lavó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna (CV)), y luego con agua desionizada hasta que tuvo un pH neutro. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados y se añadió una solución de NaOH al 15% en agua desionizada (50 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en agua desionizada (por lo menos 4 CV), y luego con agua hasta pH neutro (por lo menos 4 CV). La sal de amonio del compuesto **15** se disolvió en agua desionizada (10,6 mg en 15 ml), se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua desionizada. El producto deseado se eluyó en las primeras fracciones detectadas por TLC (UV). El producto se liofilizó para dar **sal de sodio 28** (9,2 mg) como un sólido blanco. ESI-MS:  $m/z$ =721.7 [M+1]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 8.42 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 6.34 (d,  $J$ =14.3 Hz, 1H), 5.83 (d,  $J$ =8.8 Hz, 1H), 5.70-5.47 (m, 2H), 4.48 (br d,  $J$ =2.3 Hz, 1H), 4.51-4.46 (m, 1H), 4.39 (br d,  $J$ =11.8 Hz, 1H), 4.27-4.18 (m, 3H), 4.12-4.03 (m, 3H), 3.49 (s, 3H);  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) -122.38 (br s, 1F), -199.72 (br s, 1F);  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 55.75 (br s, 1P), 53.63 (s, 1P).

55 Paso 8: Preparación de **29, sal de sodio**

60 El compuesto **29**, sal de sodio (12 mg) se preparó como un sólido blanco siguiendo el mismo procedimiento que en el paso 7 (preparación de **28**, sal de sodio); ESI-MS:  $m/z$ =721.7 [M+1]<sup>+</sup>;  $^{11}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 8.46 (br s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 6.32 (d,  $J$ =13.8 Hz, 1H), 5.90-5.78 (m, 2H), 5.30-5.11 (m, 1H), 4.47 (br s, 1H), 4.43-4.35 (m, 1H), 4.32-4.18 (m, 4H), 4.08-3.95 (m, 2H), 3.49 (s, 3H);  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) -122.77 (br s, 1F), -199.68 (br s, 1F);  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 56.01 (s, 1P), 53.31 (br s, 1P).

Paso 9: Preparación de **30, sal de sodio**

65 El compuesto **30**, sal de sodio (7,2 mg) se preparó como un sólido blanco siguiendo el mismo

procedimiento que en el paso 7 (preparación de **28**, sal de sodio). ESI-MS:  $m/z=721.7$  [M+1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 8.17 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 6.34-6.26 (m, 1H), 5.82 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 5.67-5.44 (m, 2H), 4.51 (br s, 1H), 4.46-4.38 (m, 1H), 4.34 (br d,  $J=4.3$  Hz, 1H), 4.24 (br d,  $J=10.5$  Hz, 1H), 4.16-3.99 (m, 4H), 3.47 (s, 3H); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O) -122.35 (s, 1F), -199.36 (br s, 1F); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) 56.00-55.06 (m, 1P), 51.89 (s, 1P).

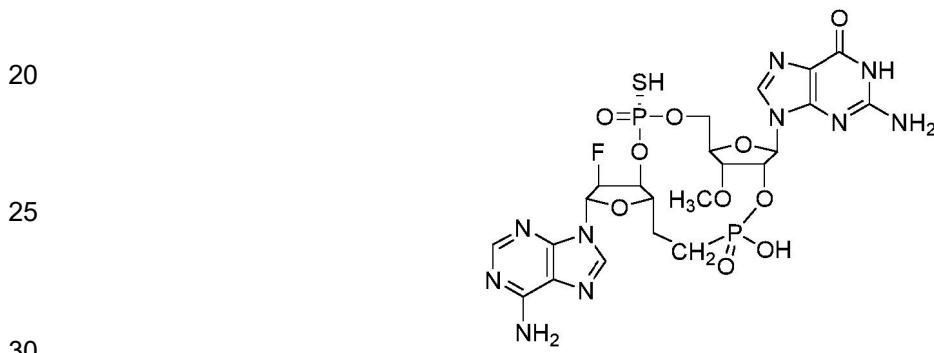
5

Paso 10: Preparación de **31**, sal de sodio

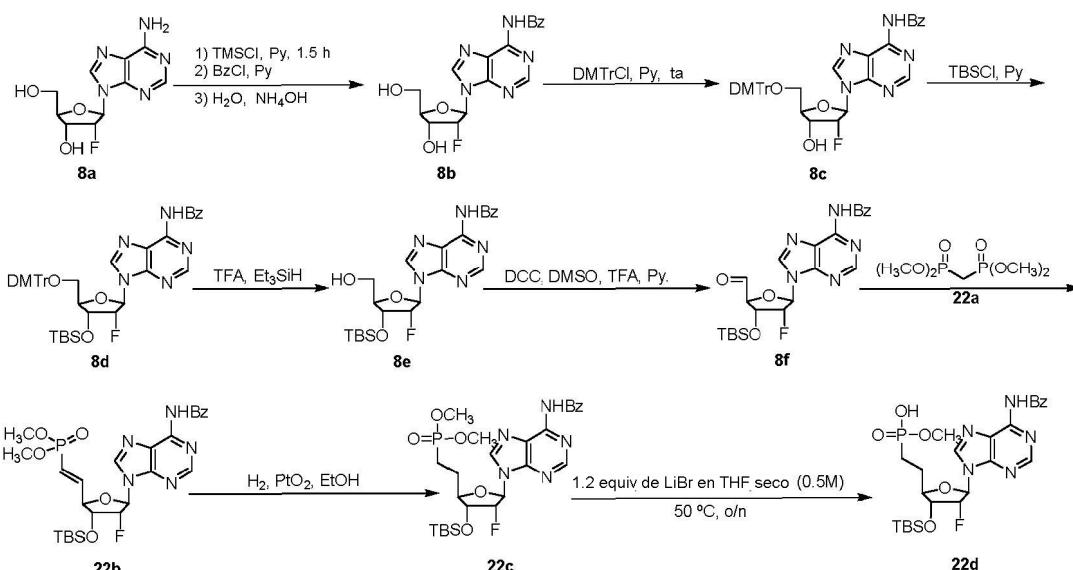
10 El compuesto **31**, sal de sodio (4,5 mg) se preparó como un sólido blanco siguiendo el mismo procedimiento que en el paso 7 (preparación de **28**, sal de sodio). ESI-MS:  $m/z=721.7$  [M+1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 8.16 (d,  $J=3.0$  Hz, 2H), 7.77 (s, 1H), 6.29 (d,  $J=13.8$  Hz, 1H), 5.81-5.76 (m, 1H), 5.73-5.65 (m, 1H), 5.35-5.17 (m, 1H), 4.50 (br s, 1H), 4.43 (br d,  $J=12.0$  Hz, 1H), 4.35-4.22 (m, 4H), 4.08 (dd,  $J=3.3, 11.8$  Hz, 1H), 3.97 (dd,  $J=2.4, 11.9$  Hz, 1H), 3.46 (s, 3H); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O) -122.24 (s, 1F), -199.92 (s, 1F); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) 55.73 (s, 1P), 51.80 (s, 1P).

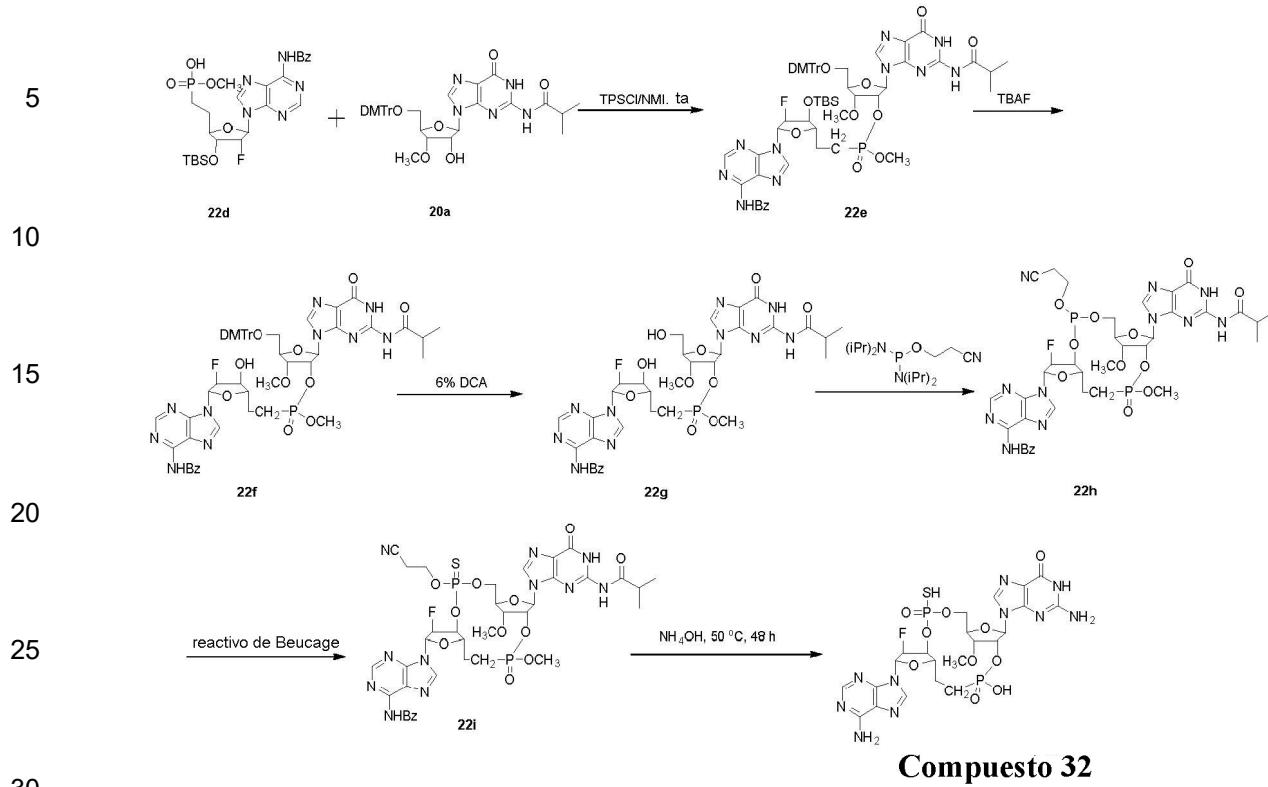
15

Ejemplo de referencia 22



**Compuesto 32**





**Paso 1: Preparación del compuesto 8b**

35 A una solución del compuesto **8a** (30 g, 111,428 mmol) en piridina (400 ml) se le añadió gota a gota TMSCl (84,85 ml, 668,57 mmol) a ta. Después de agitar la mezcla durante 40 min, se añadió gota a gota cloruro de benzoílo (46,99 g, 334,28 mmol) a ta. Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla se filtró y el filtrado se inactivó con agua (120 ml) a 0° C, seguido de la adición de NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O (120 ml), gota a gota, a 0° C. agitando la mezcla a 15° C durante 0,5 h, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con acetato de etilo (600 ml). El sólido se recogió por filtración para proporcionar **8b** (70 g) que se usó directamente para el paso siguiente sin purificación adicional.

**Paso 2: Preparación del compuesto 8c**

45 A una solución del compuesto **8b** (30 g, 80,35 mmol) en piridina (250 ml) se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (54,45 g, 160,71 mmol). Después de agitar a ta durante 3 h, se añadió EtOAc (1 l) y la mezcla se filtró. La capa orgánica se lavó sucesivamente con salmuera (300 ml x 3), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% al 5%) para dar el compuesto **8c** (31,2 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 676.3 [M + H]<sup>+</sup>.

**Paso 3: Preparación del compuesto 8d**

55 A una solución del compuesto **8c** (31,2 g, 46,17 mmol) y 1H-imidazol (9,43 g, 138,52 mmol) en DMF (500 ml) se le añadió terc-butilclorodimetsilano (13,92 g, 92,35 mmol) a temperatura ambiente en N<sub>2</sub>. Después de agitar la mezcla de la reacción a ta durante 3 h, la mezcla se inactivó con agua (1000 ml) y se extrajo con EtOAc (400 ml x 3). Luego, las capas orgánicas combinadas se secaron sucesivamente sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y el filtrado se concentró para dar el producto bruto como un aceite amarillo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% al 5%) para dar **8d** (29 g) como un sólido amarillo. ESI-MS: m/z 790.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**Paso 4: Preparación del compuesto 8e**

60 A una solución del compuesto **8d** (29 g, 36,71 mmol) en DCM (160 ml) se le añadió DCM (320 ml) seguido de TFA (8 ml) y Et<sub>3</sub>SiH (32 ml) a 0° C. Después de agitar durante 0,5 h a 0° C y luego a 25° C durante 4 h, la mezcla de la reacción se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna

ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% al 5%) para dar **8e** (11,5 g, 21,60 mmol) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 488.2 [M+H]<sup>+</sup>.

5 Paso 5: Preparación del **compuesto 8f**

10 A una solución del compuesto **8e** (11,5 g, 23,58 mmol) y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (19,46 g, 94,34 mmol) en DMSO (80 ml) se le añadió piridina (2,65 g, 33,49 mmol) y trifluoroacético (2,01 g, 17,69 mmol) a 25° C. Después de agitar la mezcla a 25° C durante 17 h, la mezcla de la reacción se diluyó con EtOAc (400 ml) y agua (200 ml). La capa orgánica se lavó sucesivamente con salmuera (100 ml x 2), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar **8f** (11,45 g, 23,58 mmol) que se usó para el paso siguiente sin ninguna purificación adicional. ESI-MS: m/z 518.1 [M+33]<sup>+</sup>.

15 Paso 6: Preparación del **compuesto 22b**

20 A una solución del compuesto **22a** (6,39 g, 27,52 mmol) en THF (75 ml) se le añadió NaH al 60% (1,43 g, 35,78 mmol) a 0° C. Después de agitar la mezcla a 0° C durante 0,5 h, se le añadió gota a gota una solución del compuesto **8f** (11,45 g, 23,58 mmol) en THF (75 ml) a 0° C. Después de agitar a 0° C durante 1 h y luego a 25° C durante 2 h, la mezcla de la reacción se diluyó con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado (100 ml) y se extrajo con EtOAc (150 ml x 2). Luego, las capas orgánicas se combinaron y se lavaron sucesivamente con salmuera (130 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% al 5%) para dar **22b** (6,1 g) como un sólido amarillo. ESI-MS: m/z 592.1 [M+H]<sup>+</sup>.

25 Paso 7: Preparación del **compuesto 22c**

30 Se agitó una solución del compuesto **22b** (1,1 g, 1,86 mmol) y óxido de platino (IV) (0,33 g, 1,48 mmol) en EtOH (30 ml) a temperatura ambiente durante la noche en atmósfera de hidrógeno (15 Psi). Luego, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/MeOH = 20/1) para dar **22c** (0,8 g) como un sólido amarillo. ESI-MS: m/z 594.1 [M+H]<sup>+</sup>.

35 Paso 8: Preparación del **compuesto 22d**

40 Se añadió solución de LiBr en THF (30,32 ml, 0,5 M en THF) a **22c** (3 g, 5,05 mmol) a 25° C. Después de agitar la mezcla a 50° C durante 48 h, se añadieron CH<sub>3</sub>CN (30 ml), agua (60 ml) y HCl acuoso 1 M (10 ml). Luego, la mezcla se liofilizó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% a 115%) para dar **22d** (2,4 g) como un sólido amarillo. ESI-MS: m/z=580.1 [M+1]<sup>+</sup>.

45 Paso 9: Preparación del **compuesto 22e**

50 Se destiló azeotrópicamente una mezcla del compuesto **22d** (1,8 g, 3,105 mmol) y el compuesto **20a** (2,49 g, 3,72 mmol) con 30 ml de piridina seca (3x). La mezcla resultante se diluyó con DCM/THF anhídrico (80 ml, 1:1, v/v) seguido de la adición de tamices moleculares 4 Å (200 mg), NMI (3,06 g, 37,26 mmol) y TPSCI (2,82 g, 9,31 milímoles). La solución resultante se agitó a 25° C durante 48 h en atmósfera de nitrógeno. La reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) y se filtró. El filtrado se extrajo con DCM (80 ml x 3); luego se combinaron las capas orgánicas, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% al 10%) para dar el producto bruto como un sólido amarillo (3 g). El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: Phenomenex Gemini 250 x 50 mm x 10 µm; Condición: H<sub>2</sub>O (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM)(A) - CH<sub>3</sub>CN (B); Inicio B: 55; Final B: 85; Caudal: 110 ml/min) para dar **22e** (1,01 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 1231.7 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 11.73-12.00 (m, 1H), 9.69 (br s, 1H), 9.34 (br s, 1H), 8.53 (br s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.81-7.94 (m, 2H), 7.70 (d, J=9.3 Hz, 1H), 7.36-7.53 (m, 3H), 7.24 (br d, J=7.7 Hz, 2H), 7.01-7.15 (m, 7H), 6.60-6.69 (m, 4H), 5.97-6.16 (m, 1H), 5.79-5.88 (m, 1H), 5.24-5.56 (m, 2H), 4.46-4.68 (m, 1H), 3.99-4.11 (m, 2H), 3.81-3.97 (m, 1H), 3.59 (s, 6H), 3.39 (s, 1H), 3.34-3.37 (m, 1H), 3.36 (s, 1H), 3.27 (s, 1H), 3.17 (s, 3H), 2.36-2.55 (m, 1H), 0.91-1.01 (m, 6H), 0.77-0.82 (m, 9H), -0.12-0.08 ppm (m, 6H).

55 Paso 10: Preparación del **compuesto 22f**

60 A una solución del compuesto **22e** (400 mg, 0,325 mmol) en THF (4 ml) se le añadió TBAF 1M en THF (0,975 ml, 0,975 mmol) a 25° C. La mezcla se agitó a 25° C durante 2 h y luego se diluyó con acetato de etilo (20 ml) y agua (15 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 2). Luego, las capas orgánicas se combinaron y se lavaron sucesivamente con salmuera (50 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% al 5%) para proporcionar **22f** (325 mg) como un sólido amarillo. ESI-MS: m/z 1117.3 [M+H]<sup>+</sup>.

Paso 11: Preparación del **compuesto 22g**

5 A una solución del compuesto **22f** (325 mg, 0,29 mmol) en DCM (4 ml) se le añadió agua (52,37 mg, 2,93 mmol) y DCA al 6% en DCM (4 ml). La mezcla se agitó a 25º C durante 1 h. Luego se añadió a la mezcla piridina hasta que la mezcla de la reacción roja se volvió incolora. La reacción de la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en DCM = del 0% al 15%) para dar **22g** (180 mg) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z 815.1 [M+H]<sup>+</sup>.

10 Paso 12: Preparación del **compuesto 22i**

10 A una solución del compuesto **22g** (180 mg, 0,22 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/THF (21,6 ml, v/v=1:1) se le añadió tamiz molecular 4Å (500 mg) y tetrazol (3,96 ml, 0,45 M en CH<sub>3</sub>CN). Después de agitar la mezcla de la reacción a 25º C durante 0,5 h, se le añadió gota a gota 3-((bis(diisopropilamino)-fosfanil)oxi)propanonitrilo (133,18 mg, 0,44 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (1,8 ml). Después de agitar la mezcla a 25º C durante 2 h, a la solución anterior se le añadió tetrazol adicional (1 ml, 0,45 M en CH<sub>3</sub>CN). La mezcla se agitó a 25º C durante 0,5 h para dar el compuesto **22h**. Luego, se añadió reactivo de Beaucage (1,1-diÓxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona, 221,19 mg, 1,105 mmol). La mezcla se agitó a 25º C durante 0,5 h y luego se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida para dar **22i** (250 mg bruto) ESI-MS: m/z 946.3 [M+H]<sup>+</sup>.

20 Paso 13: Preparación del **compuesto 32**

20 A una solución del compuesto **22i** (80 mg, 0,085 mmol) en EtOH (5 ml) se le añadió NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O (5 ml). Después de agitar la mezcla a 50º C durante 48 h, la mezcla de la reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna: Synergi 4 µM, Hydro RP, 250 mm x 30 mm, Fase móvil: Tampón A: Acetato de trietilamonio 50 mM en H<sub>2</sub>O; Tampón B: Acetato de trietilamonio 50 mM en CH<sub>3</sub>CN, gradiente: 0-30% de B durante 30 min, caudal de 24 ml/min) y seguido de una segunda purificación mediante HPLC preparativa de fase inversa (Kinetex 5 µm, 100 A; 250 x 21,2 mm Tampón A: 0,1% de ácido fórmico en tampón de H<sub>2</sub>O B: ácido fórmico al 0,1% en MeCN; Caudal: 15 ml/min, gradiente 0-30% de tampón B en 30 min) para proporcionar el compuesto **32** (6,9 mg) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z: 703.00 [M-1]<sup>-</sup>. ESI-MS: m/z 705.10 [M+H]<sup>+</sup>.

Preparación del **compuesto 32, sal de sodio**

35 Se añadió Dowex 50W x 8, 200-400 (5 ml, forma H) a un vaso de precipitados y se lavó con agua desionizada (30 ml). A la resina se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada y la mezcla se agitó suavemente durante 5 min y luego se decantó (30 ml). La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada y se lavó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna), y luego se lavó con agua desionizada hasta que se volvió neutra. La resina se devolvió al vaso de precipitados, se añadió una solución de NaOH al 15% en agua desionizada y la mezcla se agitó suavemente durante 5 min y se decantó (1x). La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en agua (por lo menos 4 volúmenes de columna) y luego con agua desionizada hasta que se volvió neutra. La sal de trietilamonio del compuesto **32** (6,9 mg) se disolvió en una cantidad mínima de agua desionizada, se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua desionizada. Las fracciones se agruparon y liofilizaron para proporcionar la sal de sodio del compuesto **32** (6,1 mg) como un sólido blanco (contiene alrededor del 20% de impurezas u otros isómeros con el mismo peso molecular - datos analíticos del producto principal). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.08 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 6.22 (d, 1H), 5.79-5.85 (m, 1H), 5.53-5.70 (m, 1H), 4.73-5.13 (m, 3H), 4.45-4.50 (m, 1H), 4.21-4.35 (m, 1H), 3.40-4.19 (m, 4H), 3.45 (s, 3H), 1.78-1.90 (m, 2H), 1.60-1.70 (m, 2H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 54.66 (PS peak), 25.13 (1.0, Phosphonate); <sup>19</sup>F NMR (379 MHz, D<sub>2</sub>O) 6-199.48 (m); ESI-MS: m/z: ESI-MS:703.00 [M-1]<sup>-</sup>. ESI-MS: m/z 705.10 [M+H]<sup>+</sup>.

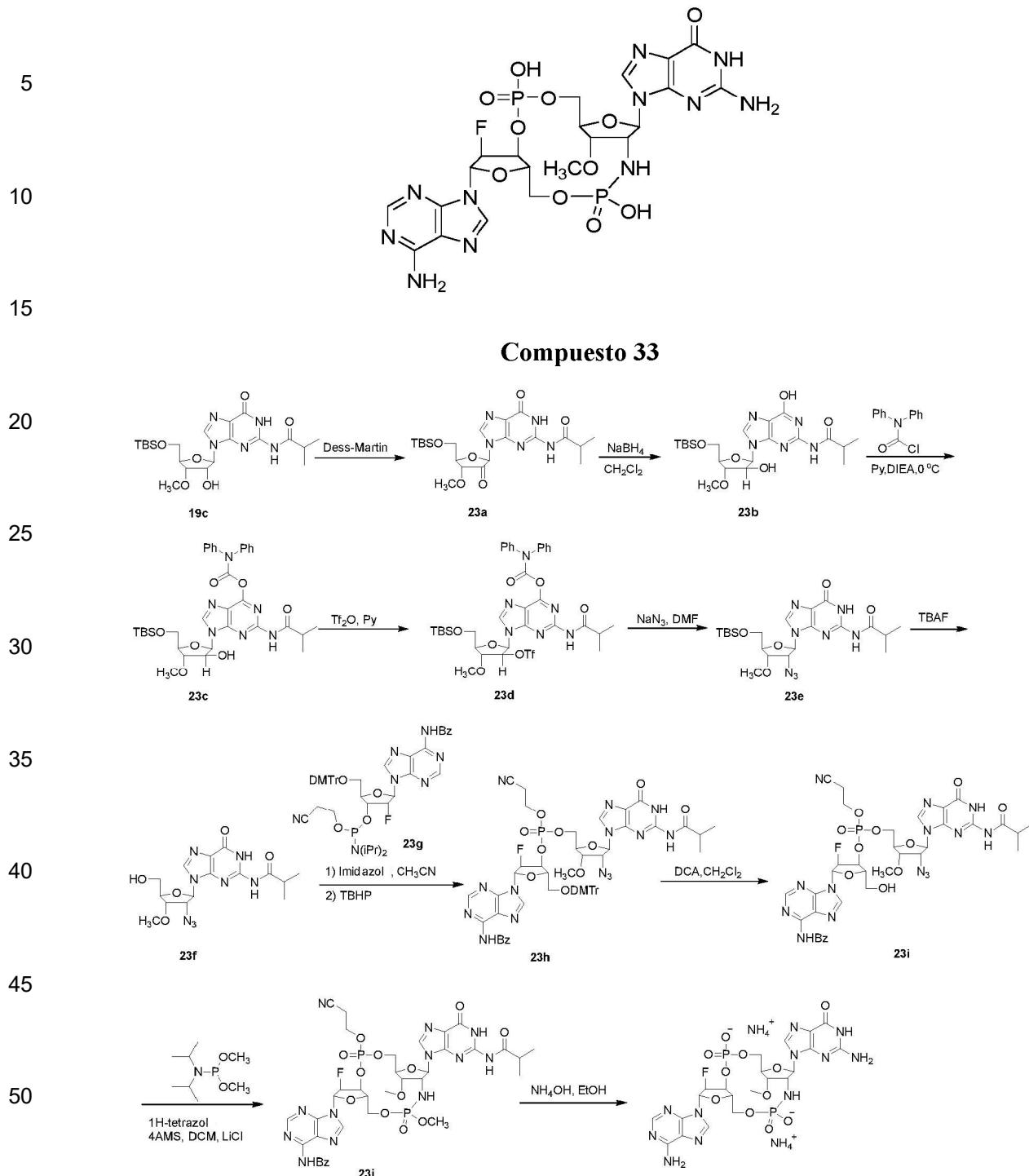
50

55

60

65

## Ejemplo de referencia 23



## Compuesto 33

## Paso 1: Preparación de 23a

60 A una solución del compuesto **19c** (1 g, 2,02 mmol) en DCM (20 ml) se le añadió peryodinano de Dess-Martin (1,45 g, 3,43 mmol) bajo  $N_2$ . Después de agitar la mezcla de la reacción a temperatura ambiente durante 16 h, se añadió  $NaHCO_3$  acuoso saturado (20 ml) que contenía  $Na_2S_2O_3$  (3 g) y la mezcla se agitó durante 0,5 h. La capa orgánica se separó y se lavó con  $NaHCO_3$  acuoso saturado (20 ml). Luego, las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre  $Na_2SO_4$  anhídrido, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: EtOAc/éter de petróleo

de 0/100 a 1/0) para dar **23a** (1 g) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z=498.1 [M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

5 Paso 2: Preparación de **23b**

10 A una solución enfriada previamente a 0° C de **23a** en etanol (10 ml) se le añadió NaBH<sub>4</sub> (0,14 g, 3,63 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 0° C durante 10 min, luego a t a durante 30 min y luego se diluyó con EtOAc (20 ml) y salmuera (10 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (10 ml). Luego, las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: EtOAc/éter de petróleo de 0/100 a 1/1) para dar **23b** (300 mg) y se recuperó **23a** (200 mg) como sólidos blancos. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 12.07 (s, 1H) 11.71 (s, 1H) 8.00 (s, 1H) 6.06 (d, J=4.85 Hz, 1H) 5.85 (d, J=5.29 Hz, 1H) 4.24-4.34 (m, 1H) 3.76-3.93 (m, 4H) 3.40 (s, 3H) 2.76 (quin, J=6.84 Hz, 1H) 1.12 (d, J=6.84 Hz, 6H) 0.90 (s, 9H) 0.04-0.13 (m, 6H); ESI-MS: m/z=482.1 [M+1]<sup>+</sup>.

15 Paso 3: Preparación de **23c**

20 A una solución del compuesto **23b** (120 mg, 0,22 mmol) en piridina (4 ml) y DIEA (87,96 mg, 0,68 mmol) se le añadió cloruro de difenilcarbamilo (105,11 mg, 0,45 mmol). Después de agitar a 25° C durante 1 h, la mezcla de la reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: EtOAc/éter de petróleo de 0/100 a 1/0) para dar **23c** (110 mg) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ ppm 8.32 (s, 1H) 7.96 (s, 1H) 7.31-7.51 (m, 8H) 7.25 (br s, 2H) 6.21 (d, J=3.01 Hz, 1H) 4.90 (d, J=9.54 Hz, 1H) 4.37 (br d, J=9.03 Hz, 1H) 4.14 (d, J=2.26 Hz, 1H) 3.98 (s, 1H) 3.94 (d, J=3.01 Hz, 1H) 3.92-3.99 (m, 1H) 3.82 (dd, J=11.17, 2.38 Hz, 1H) 3.50 (s, 3H) 2.93 (br s, 1H) 1.27 (d, J=6.78 Hz, 6H) 0.93 (s, 9H) 0.14 (s, 6H); ESI-MS: m/z=699.6 [M+Na]<sup>+</sup>.

25 Paso 4: Preparación de **23d**

30 A una solución del compuesto **23c** (200 mg, 0,28 mmol) en piridina (5 ml) se le añadió Tf<sub>2</sub>O (606,11 mg, 2,14 mmol) a 0° C. Después de agitar a 0-5° C durante 3 h, la mezcla de la reacción se diluyó con DCM (10 ml) y se lavó con salmuera (5 ml x 1). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (10 ml x 2). Luego, las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: EtOAc/éter de petróleo de 0/100 a 1/1) para dar **23d** (250 mg) como un sólido blanco. ESI-MS: m/z=831.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

35 Paso 5: Preparación de **23e**

40 A una solución del compuesto **23d** (610 mg, 0,75 mmol) en DMF (15 ml) se le añadió azida sódica (814 mg, 7,06 mmol). Después de agitar a 25° C durante 16 horas, la mezcla se diluyó con DCM (100 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (50 ml) y salmuera (50 ml). Luego, las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: EtOAc/éter de petróleo de 0/100 a 1/00 para dar **23e** (500 mg) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 12.12 (s, 1H) 11.68 (s, 1H) 8.21 (s, 1H) 5.91 (d, J=4.63 Hz, 1H) 4.87 (t, J=4.96 Hz, 1H) 4.26 (br t, J=5.07 Hz, 1H) 4.08 (br d, J=4.41 Hz, 1H) 3.86 (br dd, J=11.47, 4.19 Hz, 1H) 3.71-3.81 (m, 1H) 3.46 (s, 3H) 2.77-2.82 (m, 1H) 1.12 (d, J=6.84 Hz, 6H) 0.87 (s, 9H) 0.06 (s, 6H); ESI-MS: m/z=507.2 [M+1]<sup>+</sup>.

45 Paso 6: Preparación de **23f**

50 A una solución del compuesto **23e** (450 mg, 0,84 mmol) en THF (10 ml) se le añadió TBAF (1,52 ml, 1,52 mmol, 1 M en THF) a 0° C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 h, la mezcla se concentró a presión reducida para dar un aceite. El aceite se disolvió en DMCM (50 ml) y se lavó con salmuera (20 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con CDM (20 ml x 2). Luego, las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrico, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: DCM/MeOH de 1/0 a 100/7) para dar **23f** (220 mg) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ ppm 12.13 (br s, 1H) 8.57 (br s, 1H) 7.81 (s, 1H) 5.84 (d, J=7.72 Hz, 1H) 5.08 (br s, 1H) 4.59 (dd, J=7.50, 5.29 Hz, 1H) 4.33 (d, J=1.76 Hz, 1H) 4.20 (dd, J=5.29, 1.98 Hz, 1H) 4.03 (dd, J=12.46, 2.09 Hz, 1H) 3.76 (br s, 1H) 3.56 (s, 3H) 2.61-2.76 (m, 1H) 1.27-1.35 (m, 6H); ESI-MS: m/z=415.0 [M+Na]<sup>+</sup>

55 Paso 7: Preparación de **23h**

60 Se agitó a temperatura ambiente una solución del compuesto **23f** (220 mg, 0,56 mmol) y tamices moleculares 4Å (3 g) en CH<sub>3</sub>CN (18 ml) en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 min. Se añadió gota a gota 1H-tetrazol (7,48 ml, 3,36 mmol, 0,45 M en CH<sub>3</sub>CN). Después de agitar durante 10 min, se añadió gota a gota una solución de

5 compuesto **23g** en CH<sub>3</sub>CN (4 ml). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, se añadió hidroperóxido de terc-butilo (0,56 ml, 2,80 mmol, 5 M en decano). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: DCM:MeOH = 1:0 a 10:1) para dar **23h** (950 mg, producto bruto) como un sólido blanco que se usó directamente para el paso siguiente sin ninguna purificación adicional. ESI-MS: m/z=1183.5 [M+1]<sup>+</sup>

Paso 8: Preparación de **23i**

10 A una solución del compuesto **23h** (950 mg, producto bruto) en DCM (15 ml) y agua (68,83 mg, 3,82 mmol) se le añadió ácido dicloroacético (172,57 mg, 1,33 mmol) a temperatura ambiente seguido de la adición de trietilsilano (3,5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, se añadió piridina (121 mg, 1,53 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, luego se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: DCM:MeOH = 1:0 a 10:1) para dar **23i** (570 mg) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-d4) δ ppm 8.57-8.74 (m, 2H) 8.04-8.16 (m, 3H) 7.66 (d, J=6.61 Hz, 1H) 7.53-7.61 (m, 2H) 6.38-6.53 (m, 1H) 5.90-6.06 (m, 1H) 4.53 (br d, J=5.51 Hz, 2H) 4.40-4.46 (m, 1H) 4.31-4.40 (m, 4H) 3.92 (br d, J=13.23 Hz, 1H) 3.73-3.83 (m, 1H) 3.58 (d, J=11.69 Hz, 3H) 2.70-2.79 (m, 1H) 1.21 (dd, J=6.84, 2.43 Hz, 6H); ESI-MS: m/z=881.4 [M+1]<sup>+</sup>

20 Paso 9: Preparación de **23j**

25 A una solución del compuesto **23i** (470 mg, 0,39 mmol), 1H-tetrazol (0,66 ml, 0,3 mmol, 0,45M en CH<sub>3</sub>CN), LiCl (84,23 mg, 1,98 mmol) y tamices moleculares 4Å (2 g) en DCM (60 ml) se le añadió N,N-diisopropilfosforamidita de dimetilo (94,50 mg, 0,48 mmol). La mezcla de la reacción se agitó durante 72 ha temperatura ambiente, se filtró y se concentró a presión reducida para dar **23j** (400 mg, producto bruto) como un sólido blanco que se usó directamente para el paso siguiente sin purificación adicional. ESI-MS: m/z=931.1 [M+1]<sup>+</sup>

Paso 10: Preparación del **compuesto 33**

30 A una solución del compuesto **23j** (400 mg, producto bruto) en EtOH (15 ml) se le añadió NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O (15 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar a 50° C durante 3 días, la mezcla de la reacción se filtró y el filtrado se concentró hasta la sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna: Synergi 4 µM, Hydro RP, 250 mm x 30 mm, Fase móvil: Tampón A: Acetato de trietilamonio 50 mM en H<sub>2</sub>O; Tampón B: Acetato de trietilamonio 50 mM en CH<sub>3</sub>CN, gradiente: 0-30% de B durante 30 min, caudal 24 ml/min) para dar el compuesto **33** (24,5 mg). El compuesto **33** se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa (Synergi 4 µM, Hydro RP, 250 mm x 30 mm, Tampón A: ácido fórmico al 0,1% en tampón de H<sub>2</sub>O B: ácido fórmico al 0,1% en MeCN; Caudal: 15 ml/min, gradiente 0-30% de tampón B en 30 min) para proporcionar la sal de trietilamonio del compuesto **33** (16,3 mg).

40 **Intercambio de sal de sodio del compuesto 33:**

45 Se añadió Dowex 50W x 8, 200-400 (5 ml, forma H) a un vaso de precipitados y se lavó con agua desionizada (30 ml). A la resina se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada, la mezcla se agitó suavemente durante 5 min y se decantó (30 ml). La resina se transfirió a una columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% en agua desionizada y se lavó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% (por lo menos 4 volúmenes de columna), y luego con agua desionizada hasta que la resina fue neutra. La resina se volvió a transferir al vaso de precipitados, se añadió una solución de NaOH al 15% en agua desionizada y la mezcla se agitó suavemente durante 5 min y luego se decantó. La resina se transfirió a la columna y se lavó con NaOH al 15% en agua (por lo menos 4 volúmenes de columna) y luego con agua desionizada hasta que se volvió neutra. La sal de trietilamonio del compuesto **33** (16,3 mg) se disolvió en una cantidad mínima de agua desionizada, se añadió a la parte superior de la columna y se eluyó con agua desionizada. Las fracciones se agruparon y liofilizaron para proporcionar la sal de sodio del compuesto **33** (15,4 mg) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm 8.21 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 6.22 (d, 1H), 5.49 (d, 1H), 5.20-5.36 (d, 1H), 4.88 (d, 1H), 4.30-4.37 (m, 3H), 4.06-4.12 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 2H), 3.42 (s, 3H); <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 4.23 (amidate), -1.32 (phosphate); <sup>19</sup>F NMR (379 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -201.958 (m); ESI-MS: m/z: ESI-MS: m/z: 687.70 [M-1]<sup>-</sup>. ESI-MS: m/z 690.10 [M+H]<sup>+</sup>.

Ejemplos biológicos

Ensayos in vitro

60 Ensayo de unión STING SPA

65 El ensayo de unión STING SPA humano mide el desplazamiento de 2',3'cGAMP marcado con tritio (cíclico (guanosina-(2'>5')-monofosfato-adenosina-(3'>5')-monofosfato) a la proteína STING biotinilada. Se expresó una versión soluble de STING recombinante en *E. coli* que carece de los cuatro dominios transmembrana y contiene los

residuos 139-379 de Q86WV6 con una R en la posición 232 (H232R). En base a la frecuencia alélica del 58% de la población, se considera que el H232R es de tipo salvaje (Yi, et. al., "Single Nucleotide Polymorphisms of Human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides" PLOS ONE. 2013, 8(10), e77846). El constructo de STING tiene una etiqueta HIS N-terminal, seguida de un sitio de escisión de proteasa TEV y una etiqueta AVI para permitir la biotinilación dirigida por biotina ligasa BirA (Beckett et al., A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. (1999) Protein Science 8, 921-929). La etiqueta HIS se escinde después de la purificación y antes de la biotinilación.

El ensayo se realizó en placas de 1536 pocillos en un volumen total de 8  $\mu$ l por pocillo mediante la adición de [ $^3$ H]-2'3'-cGAMP 8 nM y proteína biotina-STING 40 nM en tampón de ensayo [HEPES 25 mM (Corning 25 -060-C1) pH 7,5, NaCl 150 mM (Sigma S5150), 0,5 mg/ml de BSA (Gibco 15260-037), Tween-20 al 0,001% (Sigma P7949), agua de grado molecular (Corning 46-000-CM)]. Los compuestos de prueba (80 nL) se añadieron con un dispensador acústico (EDC Biosystems) en DMSO al 100% para una concentración de ensayo final de DMSO al 1%. Las placas se centrifugaron durante 1 min y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron perlas de poliestireno estreptavidina SPA (2  $\mu$ l) (PerkinElmer RPNQ0306) y las placas se sellaron y centrifugaron durante 1 min a temperatura ambiente. Las placas se adaptaron a la oscuridad durante 2 h y se leyeron en un ViewLux (Perkin Elmer) durante 12 min por placa. Una curva de unión de saturación para [ $^3$ H]-2'3'-cGAMP mostró una  $K_D$  de  $3,6 \pm 0,3$  nM para unirse a STING, comparable a los valores informados para el ligando natural (Zhang et al., Cyclic GMP-AMP que contiene enlaces mixtos de fosfodiéster es un alto contenido endógeno).-ligando de afinidad por STING.

Otros ligandos naturales, incluyendo el di-GMP cíclico, también devolvieron valores en este ensayo dentro del intervalo esperado. El compuesto de referencia es cGAMP y los resultados se informan como porcentaje de inhibición y valores de  $IC_{50}$ . La unión a STING de ratón usó un constructo similar al descrito anteriormente que contenía los residuos 138-378 de Q3TBT3.

#### Ensayo de unión STING humano de longitud completa

Se expresó STING humano de los residuos 1-379 de Q86WV6 con una R en la posición 232 (H232R) con una etiqueta 6HIS N-terminal seguida de una etiqueta FLAG, un sitio de escisión de proteasa TEV y una etiqueta AVI para biotinilación en células HEK293-EXPI. Se prepararon membranas purificadas a partir de estas células y se confirmó y cuantificó la expresión de STING mediante inmunotransferencia. Las membranas que contenían STING se combinaron con el compuesto de prueba en una placa de ensayo Greiner de 384 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora en el mismo tampón de ensayo usado para el ensayo de unión STING SPA. Luego, se añadió [ $^3$ H]-2'3'-cGAMP y las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Las reacciones se transfirieron a una placa de filtro Pall 5073 prelavada y cada pocillo se lavó 3 veces con 50  $\mu$ l de tampón de ensayo. Las placas de filtro se secaron a 50° C durante 1 hora. A cada pocillo, se añadieron 10  $\mu$ l de fluido de centelleo Microscint y las placas se sellaron y leyeron en un TopCount (Perkin Elmer) durante 1 min por pocillo.

#### Ensayo de unión STING SPR

Los compuestos se analizaron en un instrumento S200 biacore SPR (GE Healthcare). La proteína STING truncada producida por *E. coli* se inmovilizó en un chip de estreptavidina serie S a través de la captura de biotina (GE Healthcare N°BR100531). Los compuestos se seleccionaron a diluciones 1:2 desde 100  $\mu$ M hasta 0,195  $\mu$ M en tampón de procesamiento (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 al 0,005%, TECEP 1 mM). Las evaluaciones cinéticas y de afinidad en estado estacionario se llevaron a cabo usando un modelo de unión 1:1 (el STING se trató como un dímero). Los parámetros de ejecución fueron los siguientes: 60 s encendido, 300 s apagado para los compuestos IFM, di-GMP cíclico (60 s encendido/60 s apagado), isómero de tiol 1 (60 s encendido/300 s apagado) y cGAMP (60 s encendido/1200 s apagado) con un caudal de 50  $\mu$ l/min y recogida de datos a 40 Hz a 25° C.

#### Ensayo de informador de células humanas de STING

El agonismo de la vía STING humana se evalúa en células THP1-ISG (Invivogen, N° de cat. thp-isg) derivadas de la línea celular de monocitos THP1 humanos mediante la integración estable de un constructo informador de SEAP inducible por el factor regulador de interferón (IRF). Las células THP1-Blue ISG expresan un gen informador de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) secretado bajo el control de un promotor mínimo ISG54 junto con cinco elementos de respuesta estimulados por interferón (IFN). Como resultado, las células THP1-Blue ISG permiten monitorizar la activación de IRF determinando la actividad de SEAP. Los niveles de SEAP inducidos por IRF en el sobrenadante del cultivo celular se evalúan fácilmente con medio de detección de fosfatasa alcalina, un reactivo de detección de SEAP. Estas células son resistentes a Zeocin. Se usó 2'3' cGAMP como control positivo en este ensayo. Para ejecutar el ensayo, se dispensaron 60.000 células en 30  $\mu$ l/pocillo de una placa de 384 pocillos tratada con cultivo tisular de fondo opaco blanco.

Los compuestos de prueba se añadieron en un volumen de 10  $\mu$ l (1% de concentración final de DMSO).

Los compuestos se preparan inicialmente en DMSO al 100%, se colocaron en una placa de dilución intermedia y

luego se diluyen en medios antes de la transferencia. El ensayo se incubó durante 24 h a 37° C, CO<sub>2</sub> al 5%, luego las placas se centrifugaron a 1200 rpm (120 x g) durante 5 min. Después de la incubación final, se añadieron 90 µl de sustrato de medio de detección de fosfatasa alcalina a cada pocillo de una nueva placa transparente de 384 pocillos y se transfirieron 10 µl del sobrenadante celular de la placa de ensayo a la nueva placa de medio de detección de fosfatasa alcalina usando un Biomek FX y se mezcló 4 veces. Las placas se incubaron a TA durante 20 min y luego se determinó la absorbancia a 655 nm en el Tecan Safire2.

5 Ensayo informador de células de ratón de STING

10 El agonismo de la ruta STING de ratón se evalúa en células RAW Lucia (Invivogen, Nº de cat. rawl-isg) derivadas de la línea celular de macrófagos RAW-264.7 de ratón mediante la integración estable de un constructo informador de luciferasa Lucia inducible por interferón. Las células RAW Lucia expresan un gen informador de luciferasa secretado bajo el control de un promotor mínimo ISG54 junto con cinco elementos de respuesta estimulados por interferón (IFN). Como resultado, las células RAW Lucia permiten monitorizar la activación de IRF determinando la actividad de la luciferasa. Los niveles de luciferasa inducida por IRF en el sobrenadante del cultivo celular se evalúan fácilmente con QUANTI-Luc™, un reactivo de detección de luciferasa. Estas células son resistentes a Zeocin. Se usa 2'3' cGAMP como control positivo en este ensayo. Para ejecutar el ensayo, se dispensaron 100.000 células en 90 µl/pocillo de una olaca de 96 pocillos tratada con cultivo de tejido de fondo plano transparente. Los compuestos de prueba se añadieron en un volumen de 10 µl. El ensayo se incubó durante 24 y 48 horas a 37° C, CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, se transfirieron 204 células del sobrenadante de la placa de ensayo a una nueva placa blanca de 96 pocillos y se añadieron 50 µl de sustrato QUANTI-Luc. La placa se incubó, con agitación, a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego se leyó la luminiscencia en un EnVision 2104 con un tiempo de integración de 0,1 s.

25 Ensayo de inducción de interferón-β humano

30 Se usan células THP1-Blue ISG para medir la secreción de IFN-β en el sobrenadante del cultivo después de la activación de la vía STING. Para realizar el ensayo, se recubrieron placas MultiArray de 96 pocillos (Mesoscale Discovery) con anticuerpos de captura anti-IFN-β. Después de una hora de incubación, las placas se lavaron y se mezclaron 50 µl de sobrenadante de las placas de ensayo con informador de células humanas de STING o estándares de IFN-β con 20 µl de anticuerpo de detección conjugado con Sulfotag en las placas recubiertas. Las placas se incubaron, se agitaron durante 2 h, se lavaron y se aplicó tampón de lectura. La electroquimioluminiscencia se midió en el SectorImager.

35 Evaluación de la vía de señalización celular de STING

40 Se midió el agonismo de la vía STING en células THP1 BLUE ISG mediante transferencia Western de fosfo-STING (S366), fosfo-TBK1 (S172) y fosfo-IRF3 (S396). Brevemente, se mezclaron 5 millones de células en 90 µl de tampón de nucleofección con 10 µl de compuestos de prueba. Estas mezclas se sometieron a electroporación usando el programa V-001 en un Amaxa Nucleofector (Lonza). Las células se transfirieron a placas de 12 pocillos con medio fresco y se dejaron recuperar durante una hora a 37° C, CO<sub>2</sub> al 5%. Luego, las células se lavaron en HBSS frío y se lisaron en tampón RIPA. Las muestras se normalizaron con proteína total y se diluyeron en tampón de muestra ProteinSimple o tampón de carga LDS. Las muestras se desnaturizaron con calor a 95° C durante 5 min, luego se usó PeggySue (ProteinSimple) para medir el fosfo- y STING total e IRF3 mientras que se usó el sistema NuPAGE (Invitrogen) para medir TBK1. Los datos se analizaron usando el software Compass o Licor Odyssey, respectivamente.

Actividad en vivo de STING

50 Para todos los estudios, se obtuvieron ratones Balb/c hembra de Charles River Labs (Wilmington, MA) y se usaron cuando tenían 6-8 semanas de edad y pesaban aproximadamente 20 g. Se permitió que todos los animales se aclimatasesen y se recuperasen de cualquier estrés relacionado con el envío durante un mínimo de 5 días antes del uso experimental. Se proporcionó agua clorada por ósmosis inversa y alimento irradiado (Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010, Lab Diet) a voluntad, y los animales se mantuvieron en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h. Las 55 jaulas y las camas se esterilizaron en autoclave antes de su uso y se cambiaron semanalmente. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de Janssen R & D, Spring House, PA. Cada grupo experimental contenía 8 ratones. Se determinó la eficacia in vivo en un modelo de tumor CT26 de ratón implantando 500.000 células tumorales de carcinoma de colon CT26 subcutáneamente en ratones Balb/c y dejando que los tumores se estableciesen a 100-300 mm<sup>3</sup>. Los compuestos se inyectaron por vía intratumoral formulados en solución salina tamponada con fosfato en un volumen de 0,1 ml por inyección. A los ratones se les administraron 0,05 mg cada tres días para un total de tres dosis. La eficacia se midió como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) calculado por la reducción del tamaño del volumen del tumor tratado (T) sobre el volumen del tumor de control (C) de acuerdo con la siguiente fórmula: ((C-T)/(C))\*100 cuando todos los animales de control todavía estaban en estudio. Las curaciones se definieron como el número de animales sin tumor medible detectado

10 veces de duplicación del volumen tumoral (TVDT) después de que se administrase la última dosis. Los datos resultantes se presentan en la Tabla 3, en la que el compuesto 2 es un compuesto de la invención.

Tabla 3.

Nº de Comp.	hSTING SPA IC50 (µM)	EC50 de informador de cé lulas (µM)	SPR human STING KD (µM)	mSTING SPA IC50 (µM)	IFN-β (valor de clasificación)	Actividad in vivo (%TGI)	Actividad in vivo (curaciones)
<b>1</b>	7.31	0.13	0.12	0.2		ND	ND
<b>2</b>	56.7	0.85	0.12			ND	ND
<b>5</b>	1.83	6.7			652	ND	ND
<b>6</b>	0.061	0.86			2977	ND	ND
<b>7</b>	< 0.01	0.22			4263	110.5	5
<b>8</b>	0.27	2.05			2521	ND	ND
<b>9</b>	0.96	1.30	-	-	1125	ND	ND
<b>10</b>	6.69	4.66	-	-	1148	ND	ND
<b>11</b>	2.46	5.34	-	-		ND	ND
<b>12</b>	0.27	0.56	-	-	2637	ND	ND
<b>13</b>	0.042	0.11	-	-	2866	ND	ND
<b>17</b>	0.038	0.8	0.00485	< 0.01	317	ND	ND
<b>18</b>	< 0.01	3.73	-	-	628	ND	ND
<b>24</b>	>100	9.5	-	-	-	ND	ND
<b>25</b>	0.085	2.88	-	-	1228	ND	ND
<b>26</b>	< 0.01	1.97	-	-	943	ND	ND
<b>27</b>	0.024	3.36	-	-	793	ND	ND
<b>28</b>	0.061	5.8	-	-	-	ND	ND
<b>29</b>	< 0.01	5.67	-	-	-	ND	ND
<b>30</b>	0.011	1.76	-	-	-	ND	ND
<b>31</b>	< 0.01	6.41	-	-	-	ND	ND
<b>32</b>	0.034	-	-	-	-	ND	ND
<b>33</b>	< 0.01	-	-	-	-	ND	ND

ND: No realizado

Determinación de actividad in vivo

La actividad puede evaluarse en modelos animales implantando células MC38 en ratones C57BL/6 o células CT26 en el costado derecho de ratones Balb/c y permitiendo que los tumores se establezcan hasta un tamaño de aproximadamente 100-200 mm<sup>3</sup>. Los tumores pueden inyectarse con vehículo (PBS o HBSS) o compuestos de prueba por vía intratumoral en un volumen de 100 µl por inyección.

Cada grupo de tratamiento puede tener 7-8 ratones y los tratamientos pueden administrarse cada tres días para un total de 3 dosis (q3dx3). El tamaño del tumor se puede medir con un calibre y el peso estimado del tumor puede calcularse usando la siguiente fórmula: peso del tumor = w<sup>2</sup>(l)/2 donde w=anchura y l=largo en milímetros. La eficacia puede determinarse tanto por el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) como por el número de "curaciones" en cada grupo. El % de TGI puede calcularse como el porcentaje de reducción en el tamaño del volumen del tumor tratado (T) sobre el volumen del tumor de control (C) de acuerdo con la siguiente fórmula ((C-T)/(C-tamaño inicial))\*100 cuando todos los animales de control todavía estaban en estudio. Las curaciones pueden definirse como el número de animales sin tumor medible detectado 10 veces de duplicación del volumen tumoral (TVDT) después de que se haya administrado la última dosis.

Ejemplo biológico 2Ensayo de inducción de citoquinas de PBMC humanas primarias de STING

5 El agonismo de la vía STING humana se evalúa en células mononucleares primarias de sangre periférica humanas (PBMC) primarias derivadas de sangre completa humana. Se coloca en capas 1 pinta (aproximadamente 420 ml) de sangre fresca de donante (AllCells Inc., Alameda, CA) sobre medio de separación de linfocitos (1,077-1,080 g/ml, Corning, Manassas, VA), luego se centrifuga a 500 g durante 20 min a TA sin aplicar descanso. Las 10 PBMC recogidas en la interfase entre el suero y el medio de separación de linfocitos se recogen, se lavan y luego se cuentan. Las PBMC están compuestas por subtipos de linfocitos y monocitos, como células B, células T, etc., y estos 15 subtipos se han caracterizado en la bibliografía para expresar diferentes niveles de la proteína STING. En respuesta a los agonistas de STING, como 2'3'-cGAMP, estas células se activan y son inducidas a expresar una variedad de citoquinas proinflamatorias y antivirales. Además, tras la estimulación con agonistas de STING, estas células regulan 20 por incremento los marcadores de activación. Los niveles de inducción de citoquinas pueden medirse mediante una variedad de métodos que incluyen ELISA, Luminex y MSD. Los niveles de regulación por incremento del marcador de activación pueden medirse mediante citometría de flujo.

25 Para ejecutar el ensayo, se dispensaron 1.000.000 de células en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo tisular de fondo plano, a 225  $\mu$ l/pocillo. Los compuestos de prueba se añadieron en un volumen de 25  $\mu$ l a una concentración de 10x. Algunos compuestos se solubilizaron en DMSO al 100% y la concentración final de DMSO en los cultivos que recibieron estos compuestos fue del 1%. El ensayo se incubó durante 48 h a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se 30 recogieron 200  $\mu$ l de sobrenadantes sin alterar las células en el fondo de la placa, luego se congelaron a -20° C hasta el momento de la medición con Luminex. Los ensayos Luminex se realizaron usando G-CSF, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), TNFa del kit de ensayo de panel de perlas magnéticas de citoquina humana/quimiocina-Inmunología Multiplex de MILLIPLEX MAP y analito IFN $\beta$ 1 del kit de panel de perlas magnéticas de citoquina humana/quimiocina IV de MILLIPLEX MAP (EMD Millipore, Billerica, MA), siguiendo el protocolo del fabricante. La inducción de citoquinas se midió usando un instrumento Luminex FlexMAP 3D® (Luminex Corporation, Radnor, PA). El análisis de los datos de Luminex recopilados se realizó usando el software MILLIPLEX Analyst (EMD Millipore).

Supresión del virus HBV en células PHH usando medios acondicionados de PBMC humanas primarias activadas por STING

35 Los hepatocitos humanos primarios pueden infectarse con el virus de la hepatitis B y, durante una infección establecida, producirán proteínas virales como HBsAg y HBeAg que pueden detectarse mediante ELISA. El tratamiento terapéutico con compuestos como entecavir puede suprimir la reproducción del VHB, lo que puede 40 medirse por una producción de proteínas virales disminuida. Se dispensaron (Nº de células) 4x10<sup>5</sup> células/pocillo de hepatocitos humanos primarios (BioReclamation, Westbury, NY) en 500  $\mu$ l/pocillo de placas de 24 pocillos de fondo plano, tratadas con cultivo de tejido. 24 h más tarde, las células se infectaron con 30-75 moi de HBV. Al día siguiente, las PHH se lavaron 3 veces y se añadió medio de mantenimiento fresco a las células. Concurrentemente, 45 se aislaron PBMC como se ha descrito anteriormente. Para estimular las PBMC, se dispensaron 10.000.000 células en placas de 24 pocillos tratadas con cultivo de tejidos de fondo plano a 400  $\mu$ l/pocillo. Los compuestos de prueba se añadieron en un volumen de 100  $\mu$ l y luego los cultivos se incubaron durante 48 h a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se 50 recogieron los sobrenadantes. Se midió la regulación por incremento del marcador de activación de las células usando citometría de flujo. Brevemente, las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos a CD56, CD19, CD3, CD8a, CD14, CD69, CD54, CD161, CD4 y CD80. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher, Carlsbad, CA).

55 De los cultivos de PBMC estimulados, se reservó una parte del sobrenadante para la detección de citoquinas por Luminex, como se ha descrito anteriormente. El resto del sobrenadante se dividió por la mitad y se almacenó una alícuota a 4° C para su uso en el día 8 del ensayo. La otra alícuota de sobrenadante se diluyó 1:1 con medio PHH 2x y luego se añadió a las células PHH infectadas con d4. Después de 96 h, se cambió el medio gastado y se añadió sobrenadante a una dilución de 1:1 con medio PHH 2x. En este punto, se realizó una medición intermedia de HBsAg usando un kit ELISA de HBsAg (Wantai Bio-pharm, Beijing, China). Después de 96 h, se 60 recogieron los medios y se midió el HBsAg.

65 **Tabla 4: Veces de inducción de citoquinas en cultivos de PBMC estimulados con compuestos de CDN.** Las veces de inducción se calculan midiendo las concentraciones de la citoquina inducida después de 48 h por aproximadamente 20  $\mu$ M de compuesto, luego dividiendo por los niveles de valor de referencia de producción de citoquinas de las células incubadas con PBS. Los datos son la media de múltiples donantes en tres experimentos. nt = no probado.

Tabla 4.

Nº de comp.	IL-6	IL-10	IFN- $\gamma$	IL-1b	IFN- $\alpha$	TNF $\alpha$	IL-12p40	IL-12p70	G-CSF	IFN- $\beta$
1	3.0	11.3	57.2	7.5	4.4	17.8	1.5	122.2	1.1	19.7

5 **Tabla 5: Veces inducción de citoquinas en cultivos de PBMC estimulados con concentraciones más altas de compuestos de CDN.** La veces de inducción se calcula midiendo las concentraciones de la citoquina inducida después de 48 h de la concentración indicada del compuesto, luego dividiendo por los niveles del valor de referencia de producción de citoquina de las células incubadas con PBS. Los datos son la media de múltiples donantes en tres experimentos. nt = no probado.

10 **Tabla 5.**

Nº de Comp.	Cono superior ( $\mu$ M)	IL-6	IL-10	IFNy	IL-1p	IFN $\alpha$ 2	TNF $\alpha$	IL12 P 40	IL12 p70	G-CSF	IFN $\beta$ 1
1	40	436.0	6.2	535.9	92.9	13.2	87.0	1.1	9.0	8.3	23.4
17	40	499.1	8.5	883.8	141.8	30.6	178.0	2.0	3.9	6.7	42.7
18	40	759.7	20.2	1507.3	171.5	51.5	95.8	1.8	7.4	31.2	6.7
25	40	6546.8	61.3	6181.6	2946.5	71.5	1551.5	12.0	327.9	804.5	110.6

20 **Tabla 6. Los medios acondicionados de PBMC estimuladas con CDN pueden suprimir la carga viral de las células PHH infectadas con VHB.** Las PBMC se estimularon con la CDN indicada a 20, 4, 0,8  $\mu$ M durante 48 h. Los sobrenadantes se mezclaron con medio fresco en una proporción de 1:1, luego se añadieron a células PHH infectadas con HBV. La producción de HBsAg se midió 8 días después. Los datos son una media de dos donantes independientes.

25 **Tabla 6.**

Nº de Comp.	EC50 ( $\mu$ M)
1	4.02E-04

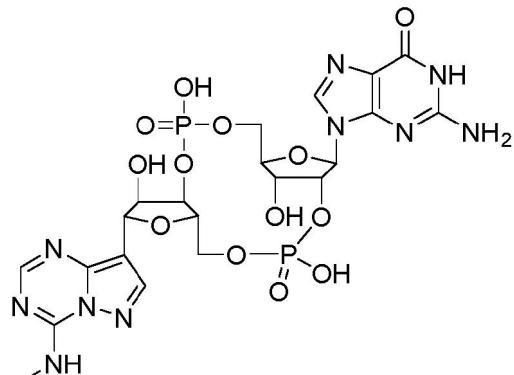
30 **Tabla 7. CDN activa PBMC.** Las PBMC se estimularon con 20  $\mu$ M de CDN durante 48 h. Las células se evaluaron mediante citometría de flujo para la regulación por incremento de CD54 en los monocitos. Las veces de aumento en la Intensidad Media de Fluorescencia se calculó con respecto a los niveles en las células en reposo. Los datos son una media de dos donantes independientes.

35 **Tabla 7.**

Nº de Comp.	MFI
1	5.6
4-2'3'-cGAMP	4.5
PBS	1.0

## REIVINDICACIONES

5 1. El compuesto:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y por lo menos uno de un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la composición es una forma de dosificación oral sólida.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la composición es un jarabe, un elixir o una suspensión.

5. El compuesto de la reivindicación 1, o las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, síndrome, o afección, en donde dicha enfermedad, síndrome o afección es cáncer o una infección viral.

6. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha enfermedad, síndrome o afección es cáncer.

7. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste de melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, y fibrosarcoma.

8. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha enfermedad, síndrome, o afección es una infección viral.

9. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la infección viral es hepatitis B.