



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 354**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/38** (2006.01)

**C07F 9/6574** (2006.01)

**A61K 31/675** (2006.01)

**A61P 31/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06828083 .3**

96 Fecha de presentación : **08.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1966226**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54

Título: **Derivados de azacitosina útiles como agentes antivirales.**

30

Prioridad: **08.12.2005 GB 0525033**  
**09.12.2005 GB 0526668**  
**09.06.2006 GB 0611440**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.05.2011**

73

Titular/es:  
**K.U. LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT**  
**Groot Begijnhof 58-59**  
**3000 Leuven, BE**  
**Institute of Organic Chemistry and Biochemistry**  
**of the Academy of Sciences of the Czech Republic**

72

Inventor/es: **Holy, Antonin;**  
**Krecmerová, Marcela;**  
**Piskala, Alois;**  
**Andrei, Graciela;**  
**Snoeck, Robert;**  
**De Clercq, Erik;**  
**Neyts, Johan y**  
**Naesens, Lieve**

74

Agente: **Díaz de Bustamante Terminel, Isidro**

ES 2 358 354 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

**DERIVADOS DE AZACITOSINA ÚTILES COMO AGENTES ANTIVIRALES****CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a nuevos análogos de fosfonato de nucleósido. La invención se refiere además a compuestos que tienen actividad inhibidora de la replicación viral e inhibidora de la proliferación celular inducida por virus. La invención también se refiere a métodos para la preparación de todos dichos compuestos y a composiciones farmacéuticas que los comprenden. La invención se refiere además al uso de dichos  
10 compuestos como medicina y para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de sujetos que padecen una infección vírica y al tratamiento de mamíferos que padecen una infección vírica. La invención también proporciona métodos de tratamiento o de prevención de una infección vírica o una enfermedad relacionada con la proliferación celular inducida por un virus en un mamífero.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las infecciones víricas siguen siendo un gran problema médico en todo el mundo debido a una falta de estrategia de terapia, prevención o vacunación y debido al rápido desarrollo de resistencia. Los virus pueden dividirse en dos grandes grupos, virus de ARN y virus de ADN, de acuerdo con su composición genética, que pueden subdividirse  
20 adicionalmente. Los patógenos humanos incluyen Adenovirus, Citomegalovirus, virus del Dengue, virus del Ébola, Enterovirus, virus de Epstein Barr, Hantavirus, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, virus del Herpes simple, virus del Herpes humano 6, 7 y 8, Virus de la Inmunodeficiencia Humana, Metaneumovirus humano, virus del Papiloma humano, virus de la gripe, virus de Marburgo, virus de Nipah, Parvovirus B19,  
25 virus del Polioma BK, virus del Polioma JC, virus Respiratorio Sincitial, virus de la Varicela-zóster, Viruela, virus de Coxsackie y otros.

Se sabe que el Virus del Papiloma humano y otros virus inducen, o aumentan la predisposición a, trastornos de proliferación celular tales como, por ejemplo, tumores cancerosos en seres humanos.

30 El VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana-1) es una de las infecciones víricas problemáticas con una estimación de 40 millones de personas infectadas en todo el mundo. Sin embargo, pueden identificarse muchos otros virus y familias de virus que causan trastornos problemáticos.

Como ejemplo, la familia *Herpesviridae* incluye importantes patógenos humanos  
35 como el virus del herpes simple (VHS) de tipo 1 y 2, el virus de la varicela-zóster (VVZ), Citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB) y virus del herpes humano de tipo 6, 7 y 8 (es decir VHH-6, -7 y -8). Estos virus causan trastornos como *Herpes Labialis*, *Herpes Genitalis*, *Herpes Encephalitis*, sarcoma de Kaposi, Varicela, Zóster, linfomas y otros. Los tratamientos actuales consisten en Aciclovir, Ganciclovir, Brivudina, Cidofovir y algunos

otros productos.

Los fosfonatos de nucleósidos acíclicos (PNA), tales como cidofovir (HPMPC) y adefovir (PMEA), mostraron inhibir la replicación del VHS. El Cidofovir (Vistide - Gilead Sciences) se usa para el tratamiento de la infección retinitis por Citomegalovirus (CMV), que puede causar ceguera. Sin embargo, se ha establecido que el Cidofovir puede ser perjudicial para los riñones. Si alguien está tomando cidofovir, es necesario que los médicos estén alerta para detectar signos tempranos de problemas renales usando ensayos en sangre y orina. Un descenso de la cantidad de orina, aumento de la sed, o mareos después de permanecer de pie también pueden ser signos de aviso tempranos de problemas renales. Si una persona ya tiene problemas renales, el cidofovir puede no ser un tratamiento apropiado para ella. Además, el Cidofovir se administra mediante perfusión intravenosa, directamente en una vena del brazo. La perfusión se administra una vez por semana durante las dos primeras semanas - esto se denomina el tratamiento de inducción. A continuación, la perfusión se administra una vez cada dos semanas para mantener a la infección por CMV bajo control. Es necesario un mantenimiento de la terapia a largo plazo. Para probar y para prevenir el daño renal, el cidofovir se administra con fludos. Probenecid, un fármaco que ayuda a proteger a los riñones, también debe administrarse con el cidofovir. Desafortunadamente, el probenecid contiene un grupo sulfonilo y puede causar reacciones alérgicas. Los efectos secundarios causados por reacciones a fármacos que contienen grupos sulfonilo pueden incluir sarpullidos y fiebre.

También los poxvirus comprenden patógenos humanos y animales. El patógeno humano más importante en esta familia, el virus Variola (viruela) ha sido el primer virus humano en ser definitivamente erradicado, después de la vacunación masiva bajo el control de la OMS. El último caso (natural) de viruela se describió en octubre de 1977 y la vacunación se interrumpió definitivamente en 1978. Mientras tanto, varias cepas tanto de *variola major* como de *variola minor* se conservaron en centros de referencia en los Estados Unidos y en Rusia (la antigua URSS), donde debían ser destruidas después de una decisión de la Asamblea Mundial de la Salud (AMS). Sin embargo, en los últimos años, se incitó a los investigadores a que desarrollaran nuevas terapias, así como nuevos enfoques para la profilaxis o el tratamiento de infecciones por poxvirus, debido a la mayor preocupación sobre la posible liberación de dichos virus como armas de destrucción masiva por parte de bioterroristas. En base a la posible liberación de agentes infecciosos a partir de depósitos, el de la viruela entre otros muchos virus y bacterias, se considera como una de las posibles amenazas en una población mundial con la mayoría de la gente no inmunizada y carente de inmunidad que no había recibido vacunas de refuerzo durante varias décadas. Por lo tanto, se decidió intensificar el desarrollo de mejores herramientas de diagnóstico, para generar nuevas clases de vacunas que respondan a las verdaderas normas de seguridad, y finalmente, buscar nuevos y potentes fármacos antivirales. Para alcanzar estos objetivos, la destrucción de las reservas de viruela se pospuso para permitir la caracterización de las

diferentes cepas y para establecer y validar diferentes modelos sustitutos usando otros (orto)poxvirus para el diagnóstico, vacunas y fármacos antivirales. Mientras tanto, otros poxvirus para los cuales actualmente no hay disponible ningún tratamiento particular han sido reconocidos como de importancia para la salud humana, tales como viruela de los monos o ectima contagioso. Análogamente, algunos poxvirus específicos para animales, tales como viruela del camello, viruela bovina o ectima contagioso podrían ser de importancia económica para algunas regiones del mundo.

Como conclusión, para muchas infecciones víricas patógenas, actualmente no está disponible ningún tratamiento eficaz y, además, las terapias anti-virales o medidas preventivas disponibles no son suficientes para ser capaces de curar, prevenir o mejorar las infecciones víricas respectivas debido a muchas razones, como la aparición de resistencia y farmacocinética o perfiles de seguridad desfavorables.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de ampliar el arsenal de moléculas antivirales, especialmente contra virus del herpes y poxvirus, y más especialmente contra el virus del herpes humano 6, desarrollando nuevas clases de compuestos con mejor actividad, un mejor perfil de resistencia, un mecanismo de acción diferente y original, o farmacocinética o perfiles de seguridad mejorados para permitir una prevención o terapia óptima de infecciones víricas, como ejemplo, en el caso de una propagación extendida de uno u otro poxvirus.

El documento Antiviral Research (2003) 57: 13-23 describe la actividad de HPMPCC contra Poxvirus.

La presente invención proporciona nuevos compuestos que cubren esta necesidad. Más específicamente, la presente invención proporciona nuevos compuestos que inhiben la replicación viral y que poseen una mayor actividad, más específicamente también contra virus resistentes en comparación con el compuesto HPMPCC (Cidofovir) o que son menos tóxicos, tal como para el riñón.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

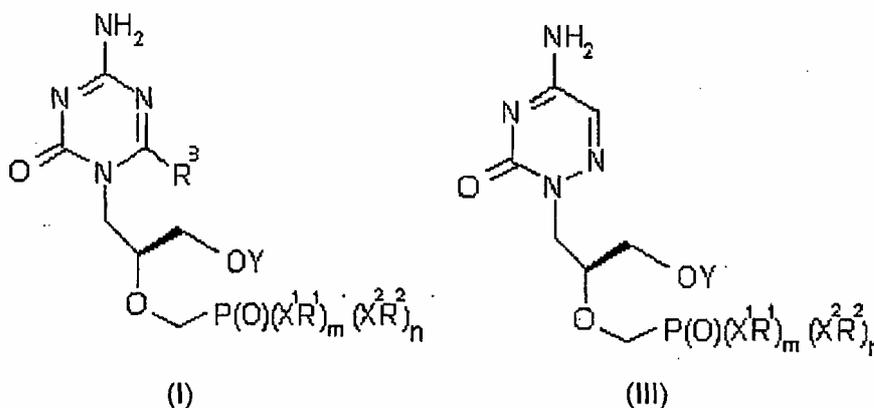
En la presente invención, se proporcionan nuevos compuestos. Es una ventaja de la presente invención proporcionar compuestos con una mejor actividad contra virus, más en particular contra virus que muestran resistencia contra los fármacos usados actualmente, tales como HPMPCC. Es también una ventaja de la invención proporcionar análogos de nucleósidos antivirales del final de la cadena. También es una ventaja proporcionar compuestos con una mejor actividad contra el virus del herpes humano 6 en comparación con HPMPCC. Es una ventaja adicional de la presente invención proporcionar compuestos antivirales con una menor toxicidad en células renales humanas que HPMPCC. Los compuestos de la invención son nuevos derivados de azacitosina. Se ha demostrado que estos poseen actividad antiviral, más específicamente contra virus de ADN. También son activos contra trastornos de proliferación celular inducidos por virus. La presente invención demuestra que los compuestos inhiben la replicación de virus de ADN tales como poxvirus y

virus del herpes y que el compuesto es más activo contra cepas de virus resistentes a HPMPG que el HPMPG. Los compuestos de la invención son, además, terminadores de cadena. Por lo tanto, estos compuestos constituyen una nueva y potente clase de agentes antivirales que pueden usarse en el tratamiento y la prevención de infecciones víricas en animales, mamíferos y seres humanos, más específicamente para el tratamiento y la prevención de infecciones víricas.

La presente invención se refiere a nuevos derivados de azacitosina. La invención se refiere además a compuestos que tienen actividad antiviral, más específicamente a nuevos derivados de 5-azacitosina que tienen propiedades inhibitorias de la replicación viral, más en particular de virus de ADN tales como poxvirus y virus del herpes en seres humanos y, por consiguiente, pueden ser útiles para el tratamiento de individuos infectados por dichos virus. La presente invención se refiere, además, al uso de los compuestos como medicina y, más específicamente, al uso de los compuestos como agente antiviral. La invención también se refiere a métodos para la preparación de todos dichos compuestos y a composiciones farmacéuticas que los comprenden. La invención se refiere además al uso de dichos compuestos en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de sujetos que padecen una infección vírica, así como para el tratamiento de tumores o cánceres. La presente invención también se refiere a un método de tratamiento o prevención de infecciones víricas, mediante el uso de dichos compuestos.

Un aspecto de la presente invención es el suministro de derivados de 5-azacitosina, siendo dichos nuevos derivados de 5-azacitosina un fosfonato, que comprende más en particular 3-hidroxi-2-fosfonometoxipropilo acoplado a la posición N<sup>1</sup> de 5-azacitosina.

La presente invención se refiere a derivados de 5-azacitosina y derivados de 6-azacitosina de acuerdo con la fórmula estructural (I) o la fórmula (III), una forma estereoquímicamente isomérica, un solvato, una sal, un derivado 5,6-dihidro o un profármaco del mismo:

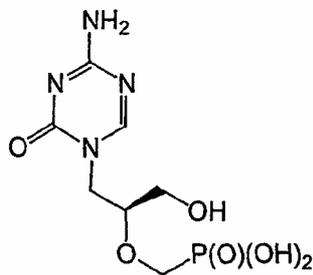


en la que

- R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por

- 5 hidrógeno, alquilo C<sub>1-30</sub>, alqueno C<sub>2-30</sub>, alquino C<sub>2-30</sub>, arilo, alquilfenilo C<sub>1-30</sub> y arilalquilo C<sub>1-30</sub> en la que cada uno de dichos alquilo C<sub>1-30</sub>, alqueno C<sub>2-30</sub> o alquino C<sub>2-30</sub> contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por oxígeno, nitrógeno y azufre en la cadena principal y/o está
- 5 opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo constituido por hidroxilo, oxo y halógeno o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos mediante uno o más enlaces para formar un anillo de cinco, seis o siete miembros que comprende P, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup>, estando dicho anillo opcionalmente condensado con un anillo fenilo;
- 10 - X<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo constituido por NR<sup>4</sup> y oxígeno;
- 10 - X<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo constituido por NR<sup>5</sup> y oxígeno;
- 10 - R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C<sub>1-30</sub>, alqueno C<sub>2-30</sub> y alquino C<sub>2-30</sub>, en la que cada uno de dicho alquilo C<sub>1-30</sub>, alqueno C<sub>2-30</sub> o alquino C<sub>2-30</sub> contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por oxígeno, nitrógeno y
- 15 azufre en la cadena principal y/o está opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo constituido por hidroxilo y halógeno;
- 15 - Y es hidrógeno o es un enlace que une oxígeno a fósforo para formar un éster de ácido fosfónico cíclico de seis miembros; cada uno de m y n es 1 cuando Y es hidrógeno, o uno de m y n es 1 y el otro de m y n es 0 cuando Y es un enlace que
- 20 une oxígeno a fósforo para formar un éster de ácido fosfónico cíclico de 6 miembros;
- 20 - R<sup>3</sup> es un hidrógeno, un alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, amino, hidroxilo, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R, CONH<sub>2</sub>, NR<sub>2</sub>, CONR<sub>2</sub>; y R es alquilo C<sub>1-30</sub>.

25 Una realización particular de este aspecto de la invención se refiere a (S)-1-[3-hidroxi-2-fosfonometoxipropil]-5-azacitosina de fórmula (II), y las sales, ésteres, amidatos y ésteramidatos de la misma:



(II)

La presente invención se refiere, en una realización particular, a compuestos individuales seleccionados entre el grupo constituido por:

- 30 - (S)-1-[3-hidroxi-2-fosfonometoxipropil]-5-azacitosina;
- 30 - 3-formil-2-[[[(2S)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]carbamoil]guanidina]; y

- 1-[[[(5S)-2-Hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina (denominada en lo sucesivo en este documento como "HPMP-5-azacitosina cíclica");

y ésteres de las mismas como se describen en este documento.

5 La presente invención se refiere, en otra realización particular, a derivados 5,6-dihidro de derivados de 5-azacitosina de acuerdo con las fórmulas (I) o (II).

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de derivados de 5-azacitosina de las fórmulas (I) o (II) como compuestos antivirales, más particularmente como compuestos activos contra virus de ADN y como compuestos activos contra el cáncer. La invención también se refiere al uso de derivados de 5-azacitosina de la fórmula (I) o (II),  
10 más en particular de (S)-1-[3-hidroxi-2-fosfonometoxipropil]-5-azacitosina para la fabricación de una medicina o como un ingrediente farmacéuticamente activo, especialmente como un inhibidor de la replicación del virus, preferentemente como un inhibidor de la replicación de un virus de ADN, por ejemplo para la fabricación de un medicamento o una composición farmacéutica que tiene actividad anticancerosa o antiviral para la prevención y/o el  
15 tratamiento de cáncer o infecciones víricas, preferentemente de virus de ADN, en seres humanos o mamíferos.

En una realización particular, dicha infección por virus de ADN se selecciona entre una infección con uno de los *Herpesviridae* tales como virus del herpes simple, virus de la varicela-zóster (VZV), Citomegalovirus (CMV), de los *Poxviridae* tales como virus de la  
20 variolovacuna, virus Variola (viruela), viruela bovina, viruela del mono, viruela del camello o ectima contagioso, de la familia de los *Papillomaviridae* tales como virus del papiloma humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer o de una infección vírica, preferentemente una infección por un virus de ADN en un  
25 mamífero, incluyendo un ser humano, que comprende administrar al mamífero que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o (II) como ingrediente activo, preferentemente mezclado con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona un método de tratamiento o prevención de una infección vírica en un mamífero, que comprende administrar al mamífero  
30 que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de 5-azacitosina de la invención.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a métodos o procesos para la preparación de compuestos de fórmula (I) o (II), en una realización particular, de (S)-1-[3-hidroxi-2-fosfonometoxipropil]-5-azacitosina. Dicho método o proceso comprende las etapas  
35 de (i) calentar (S)-tritoloximetiloxirano con 5-azacitosina en presencia de álcali, preferentemente hidróxido de sodio o de potasio o carbonato de cesio, (ii) tratamiento del intermedio obtenido de este modo con bromometilfosfonato de dialquilo, preferentemente de diisopropilo, y 1-1,5 equivalentes molares de álcali, preferentemente terc-butóxido de sodio o potasio o hidruro de sodio a temperaturas de 10-60°C en disolvente aprótico,

preferentemente dimetilformamida, dimetilsulfóxido o tetrahidrofurano y (iii) hacer reaccionar al intermedio protegido obtenido de este modo con halotrimetilsilano, preferentemente bromotrimetilsilano en acetonitrilo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, dioxano o disolventes apróticos clorados seguida de hidrólisis en agua.

5 En otra realización, el proceso para la preparación de compuestos de fórmula (I) o (II), en una realización particular, de (S)-1-[3-hidroxi-2-fosfonometoxipropil]-5-azacitosina comprende las etapas de (i) calentar la sal sódica de 5-azacitosina con 3-hidroxi-2-(dialcoxifosfonilmetoxi)propilo, preferentemente p-tolilsulfonato de 3-hidroxi-diisopropiloxi-  
10 metoxi)propilo y (ii) hacer reaccionar al intermedio protegido obtenido de este modo con halotrimetilsilano, preferentemente bromotrimetilsilano en acetonitrilo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, dioxano o disolventes apróticos clorados, seguido de hidrólisis en agua.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención de acuerdo con la fórmula (I) o (II) mezclados con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando el ingrediente activo  
15 preferentemente en un intervalo de concentración de aproximadamente el 0,1 al 100% en peso, y al uso de estos derivados concretamente como fármacos útiles para el tratamiento de sujetos, más en particular seres humanos, que padecen cáncer o una infección vírica.

La invención se refiere además al uso de una composición que comprende (a) uno o más derivados de fórmula (I) o (II), y (b) uno o más inhibidores virales como agentes  
20 biológicamente activos en proporciones respectivas, por ejemplo en forma de una preparación combinada para uso simultáneo, por separado o secuencial en terapia de infección vírica. En el marco de esta realización de la invención, los inhibidores de la replicación viral usados como ingredientes terapéuticamente activos (b) pueden pertenecer a categorías ya conocidas en la técnica e incluyen, entre otros, Aciclovir y su profármaco valaciclovir (por ejemplo, activo contra los virus alfa del herpes VHS y VVZ), Ganciclovir y su profármaco valganciclovir (por ejemplo, activo contra los virus beta del herpes VHH-6 y CMVH y los virus alfa del herpes VHS y VVZ), Foscavir (por ejemplo, activo contra virus alfa y beta del herpes), Brivudina (por ejemplo, activa contra VHS-1 y VVZ), Cidofovir (por  
25 ejemplo, activo contra todos los virus de ADN excepto el de la hepatitis B), Adefovir (por ejemplo, activo contra todos los virus del herpes y el de la hepatitis B) y Lamivudina (por ejemplo, activa contra la hepatitis B).

De forma más general, la invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) o (II) o realizaciones de los mismos que son útiles como agentes que tienen actividad biológica (preferentemente actividad antiviral o antitumoral) o como agentes de diagnóstico.  
35 Cualquiera de los usos mencionados con respecto a la presente invención puede restringirse a un uso no médico, un uso no terapéutico, un uso no de diagnóstico, o exclusivamente un uso in vitro, o un uso relacionado con células alejadas de un animal o que son células no animales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra la estructura de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfometoxi)propil]-5-azacitosina junto con el esquema de numeración para la asignación de señales de RMN.

5 Las figuras 2A y B muestran los resultados de un experimento in vivo para el tratamiento de una infección por virus de la variolovacuna con (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfometoxi)propil]-5-azacitosina. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con  $4,0 \times 10^3$  UFP de virus de la variolovacuna (cepa Western Reserve) por vía intranasal en un volumen de 20  $\mu$ l. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los  
10 compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un total de 5 días, a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal (Figura 2B) y la mortalidad (Figura 2A) se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cuatro animales por grupo experimental.

15 Las figuras 3A y B muestran los resultados de un experimento in vivo para el tratamiento de infección por el virus de la viruela bovina con (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfometoxi)propil]-5-azacitosina. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con  $4,0 \times 10^3$  UFP de virus de la viruela bovina (cepa Brighton) por vía intranasal en un volumen de 20  $\mu$ l. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los  
20 compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un total de 5 días, a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal (Figura 3B) y la mortalidad (Figura 3A) se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

25 Las figuras 4A y B muestran los resultados de un experimento in vivo para el tratamiento de infección por virus del herpes simple de tipo 1 con (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfometoxi)propil]-5-azacitosina. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFP de VHS-1 (cepa Kos) por vía intraperitoneal en un volumen de 200  $\mu$ l. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los  
30 compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un total de 5 días, a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal (Figura 4B) y la mortalidad (Figura 4A) se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

35 Las figuras 5A y B muestran los resultados de un experimento in vivo para el tratamiento de una infección por virus del herpes simple de tipo 1 con (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfometoxi)propil]-5-azacitosina. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con aproximadamente  $2,5 \times 10^3$  UFP de VHS-1 (cepa Kos) por vía intraperitoneal en un volumen de 200  $\mu$ l. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los

compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un total de 5 días, a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal (Figura 5B) y la mortalidad (Figura 5A) se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

5 La figura 6 muestra los resultados de un experimento in vivo para el tratamiento de infección por virus del herpes simple de tipo 2 con (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFP de VHS-2 (cepa Lyons) por vía intraperitoneal en un volumen de 200  $\mu$ l. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un total de 5 días, a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal y la mortalidad se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

10 La figura 7 muestra la actividad de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina en comparación con (S)-HPMPC contra el virus del papiloma humano en xenoinjertos (SiHa) de carcinoma de cuello del útero humano en ratones desnudos atómicos. A los animales adultos se les inyectaron por vía subcutánea  $5 \times 10^6$  células SiHa, una línea celular de carcinoma de cuello del útero humano que aloja integrado al virus del papiloma humano (VPH-16). Una vez que los tumores se establecieron (aproximadamente después de 1 semana), los ratones se dividieron en varios grupos, se determinó el tamaño de los tumores para cada ratón, y se inició el tratamiento con placebo (PBS) o los compuestos de ensayo. Las soluciones de ensayo se administraron por vía intratumoral a un volumen de 50  $\mu$ l. Los ratones se trataron una vez al día, 5 veces a la semana durante un periodo de 5 semanas. Cada semana, se midió el tamaño del tumor para cada animal con un calibre en dos dimensiones perpendiculares y el tamaño de los tumores se calculó multiplicando los dos diámetros medidos.

15 Las figuras 8A y B muestran la actividad de (S)-HPMP-5-azacitosina en comparación con (S)-HPMPC contra poxvirus en un modelo de infección intranasal letal en ratones. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con  $4,0 \times 10^3$  UFP de virus de la variolovacuna (cepa Western Reserve) por vía intranasal en un volumen de 20  $\mu$ l. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los compuestos se administraron por vía oral una vez al día durante un total de 5 días a las dosis indicadas. El peso corporal (Figura 8A) y la mortalidad (Figura 8B) se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

20 Las figuras 9A y B muestran la actividad de (S)-HPMP-5-azacitosina en comparación con (S)-HPMPC contra poxvirus en un modelo de infección intranasal letal en ratones. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con  $4,0 \times 10^3$  UFP de virus de la

variolovacuna (cepa Western Reserve) por vía intranasal en un volumen de 20 µl. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un solo día (1x) o durante un total de 5 días (5x), a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal (Figura 9A) y la mortalidad (Figura 9B) se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

La figura 10A y B muestra la actividad de HPMP-5-azacitosina en comparación con HPMPCC contra poxvirus en un modelo de infección intranasal letal en ratones. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con  $4,0 \times 10^3$  UFP de virus de la variolovacuna (cepa Western Reserve) por vía intranasal en un volumen de 20 µl. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un solo día (1x) o durante un total de 5 días (5x), a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal (Figura 10A) y la mortalidad (Figura 10B) se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

La figura 11 muestra la actividad de HPMP-5-azacitosina en comparación con HPMPCC contra virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1 en un modelo de infección intraperitoneal letal en ratones. Ratones NMRI adultos (18-20 gramos) se infectaron con aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFP de VHS-1 (cepa Kos) por vía intraperitoneal en un volumen de 200 µl. El tratamiento con los compuestos (disueltos en solución salina tamponada con fosfato, PBS) se inició el día de la infección. Los compuestos se administraron por vía subcutánea una vez al día durante un total de 5 días, a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal y la mortalidad se registraron durante un periodo de 20 días. Se usaron cinco animales por grupo experimental.

La figura 12A y B muestra la actividad de (S)-HPMP-5-azacitosina en comparación con (S)-HPMPC contra el virus del papiloma humano en xenoinjertos de carcinoma de cuello del útero humano en ratones atímicos desnudos. (A) A los animales adultos se les inyectaron por vía subcutánea  $5 \times 10^6$  células HeLa, una línea celular de carcinoma de cuello del útero humano que aloja el virus del papiloma humano integrado (VPH-16). Una vez que los tumores se establecieron (aproximadamente después de 1 semana), los ratones se dividieron en varios grupos, se determinó el tamaño de los tumores para cada ratón, y se inició el tratamiento con placebo (PBS) o los compuestos de ensayo. Las soluciones de ensayo se administraron por vía intratumoral a un volumen de 50 µl. Los ratones se trataron una vez al día, 5 veces a la semana durante un periodo de 5 semanas. Cada semana, se midió el tamaño del tumor para cada animal con un calibre en dos dimensiones perpendiculares y el tamaño de los tumores se calculó multiplicando los dos diámetros medidos. (B) A los animales adultos se les inyectaron

por vía subcutánea  $5 \times 10^6$  células CaSki, una línea celular de carcinoma de cuello del útero humano que aloja el virus del papiloma humano integrado (VPH-16). Una vez que los tumores se establecieron (aproximadamente después de 1 semana), los ratones se dividieron en varios grupos, se determinó el tamaño de los tumores para cada ratón, y se inició el tratamiento con placebo (PBS) o los compuestos de ensayo. Las soluciones de ensayo se administraron por vía intratumoral a un volumen de 50  $\mu$ l. Los ratones se trataron una vez al día, 5 veces a la semana durante un periodo de 5 semanas. Cada semana, se midió el tamaño del tumor para cada animal con un calibre en dos dimensiones perpendiculares y el tamaño de los tumores se calculó multiplicando los dos diámetros medidos.

La figura 13 muestra la actividad citostática de (S)-HPMP-5-azaC y HPMP-5-azaCc para cultivos primarios de células renales humanas. Actividad citostática para células epiteliales del túbulo proximal renal humanas en reposo (RPTEC) #4 después de 16 días de incubación sin renovación del medio.

#### 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En cada una de las siguientes definiciones, el número de átomos de carbono representa el número máximo de átomos de carbono generalmente presentes de forma óptima en el sustituyente o enlazador; se entiende que donde se indique lo contrario en la presente solicitud, el número de átomos de carbono representa el número máximo óptimo de átomos de carbono para ese sustituyente o enlazador particular.

El término "alquilo" como se usa en este documento se refiere a cadenas de hidrocarburos saturados alifáticos normales secundarios o terciarios de  $C_1$ - $C_{30}$ . Son ejemplos metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo (i-Bu), 2-butilo (s-Bu) 2-metil-2-propilo (t-Bu), 1-pentilo (n-pentilo), 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo, *n*-undecilo, *n*-dodecilo, *n*-tridecilo, *n*-tetradecilo, *n*-pentadecilo, *n*-hexadecilo, *n*-heptadecilo, *n*-octadecilo, *n*-nonadecilo y *n*-icosilo.

El término "alquenilo" como se usa en este documento es un hidrocarburo con insaturación etilénica normal secundario o terciario de  $C_2$ - $C_{30}$  con al menos un sitio (habitualmente de 1 a 3, preferentemente 1) de insaturación, es decir un doble enlace carbono-carbono,  $sp^2$ . Los ejemplos incluyen, aunque no se limitan a: etileno o vinilo ( $-CH=CH_2$ ), alilo ( $-CH_2CH=CH_2$ ), ciclopentenilo ( $-C_5H_7$ ), y 5-hexenilo ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$ ). El doble enlace puede estar en configuración *cis* o *trans*.

El término "alquinilo" como se usa en este documento se refiere respectivamente a un hidrocarburo con insaturación acetilénica normal, secundario, terciario de  $C_2$ - $C_{30}$  con al menos un sitio (habitualmente de 1 a 3, preferentemente 1) de insaturación, es decir un triple enlace carbono-carbono,  $sp$ . Los ejemplos incluyen, aunque no se limitan a: etinilo ( $-$

$C\equiv CH$ ) y propargilo ( $-CH_2-C\equiv CH$ ). En una realización particular, alquilo, alqueno o alquino pueden dividirse en  $C_1-C_{16}$  y  $C_{17}-C_{30}$ .

Como se usa en este documento y a menos que se indique lo contrario, el término “halógeno” significa cualquier átomo seleccionado entre el grupo constituido por flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) y yodo. Como se usa en este documento con respecto a un grupo de sustitución, y a menos que se indique lo contrario, el término “arilo” designa cualquier radical hidrocarburo monovalente aromático mono- o policíclico que tiene de 6 hasta 30 átomos de carbono tales como, aunque sin limitarse a fenilo, naftilo, antraceno, fenantracilo, fluorantenilo, crisenilo, pirenilo, bifenilo, terfenilo, picenilo, indenilo, bifenilo, indaceno, benzociclobutenilo, benzociclooctenilo y similares, incluyendo grupos benzo-cicloalquilo  $C_{4-8}$  condensados tales como, por ejemplo, indanilo, tetrahidronaftilo, fluorenilo y similares, estando todos de dichos grupos opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, amino, trifluorometilo, hidroxilo, sulfhidrilo y nitro, tales como por ejemplo 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 4-cianofenilo, 2,6-diclorofenilo, 2-fluorofenilo, 3-clorofenilo, 3,5-diclorofenilo y similares.

La expresión “virus de ADN” se usa como la conoce un experto en la materia. Los virus de ADN se clasifican normalmente de la siguiente manera (ejemplos no limitantes de género y especie de los miembros de la familia de virus se dan junto con algunos ejemplos no limitantes de las enfermedades causadas por dichos virus):

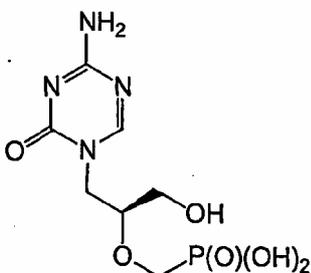
- *Parvoviridae*: por ejemplo parvovirus (rubéola, muerte fetal, gastroenteritis);
- *Papillomaviridae*: por ejemplo virus del papiloma humano (“VPH” - verrugas benignas y verrugas genitales, proliferación de células epiteliales tal como en cánceres genital y rectal);
- *Adenoviridae*: por ejemplo adenovirus (infecciones respiratorias, gastroenteritis, conjuntivitis infecciosa, sarpullidos, meningoencefalitis)
- *Poxviridae*: por ejemplo virus variola (viruela), virus de la variolovacuna, virus del molusco (lesiones cutáneas similares a verrugas de molusco contagioso).
- *Herpesviridae*: por ejemplo virus del herpes simple 1 (“VHS-1”; ya mayoría de los herpes bucales), virus del herpes simple 2 (“VHS-2”; la mayoría de los herpes genitales), virus del herpes simple 6 (VHS-6; rubéola), virus de la varicela-zóster (“VVZ”; viruela aviar y herpes), virus Epstein-Barr (“VEB”; mononucleosis infecciosa y linfomas), citomegalovirus (“CMV”; defectos de nacimiento e infecciones de diversos sistemas del organismo en individuos inmunodeprimidos);
- *Polyomaviridae*: por ejemplo virus del polioma JC y BK (trastornos desmielinizantes, nefritis en individuos inmunodeprimidos).

La expresión virus de ADN también incluye la familia de los *Hepadnaviridae* a la que pertenece el virus de la Hepatitis B.

La expresión "trastornos de proliferación celular" como se usa en este documento se refiere a trastornos en los que existe una proliferación anormal o hiperproliferación de células en comparación con circunstancias fisiológicas. Los trastornos de proliferación celular comprenden, aunque no se limitan a, cáncer, formación de tumores o psoriasis, en una realización particular, cuando el agente causante o el agente que contribuye a los trastornos es un virus de ADN. Cuando los trastornos de proliferación celular son inducidos por un virus, se usará la expresión "trastornos de proliferación celular inducidos por virus".

La terminología usada para indicar los compuestos de la invención se basa en abreviaturas bien conocidas en la técnica anterior. Como ejemplo, HPMPc se refiere a cidofovir o [(S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina, el componente activo de Vistide®. De esta manera, los derivados de 5-azacitosina de la presente invención se denominan con abreviaturas análogas. Como ejemplo, (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil)-5-azacitosina se denomina 5-aza-HPMPc, HPMP-5-azaC, HPMP-5-azacitosina y de manera análogas. Para indicar derivados de fosfonato citosina que tienen un éster de fosfonato cíclico, el término "cíclico" o "c" puede usarse después de la abreviatura, tal como en HPMPc cíclico o HPMPc<sub>c</sub>.

En la presente invención, se proporcionan nuevos compuestos. Los compuestos son nuevos derivados de 5-azacitosina y se ha demostrado que poseen actividad antiviral, más específicamente contra virus de ADN y que son activos contra trastornos de proliferación celular inducidos por virus. La presente invención demuestra que los compuestos inhiben la replicación de virus de ADN *in vitro* e *in vivo* tales como poxvirus, virus del herpes y virus del papiloma. Por lo tanto, estos compuestos constituyen una nueva y potente clase de medicinas que pueden usarse en el tratamiento y la prevención de trastornos de proliferación celular inducidos por virus o infecciones víricas en animales, mamíferos y seres humanos. La presente invención muestra además que, en comparación con HPMPc, los nuevos derivados de 5-azacitosina son más activos contra la mayoría de los virus de ADN y son menos tóxicos. Los compuestos son derivados de 5-azacitosina de acuerdo con la fórmula que se presenta a continuación en este documento:



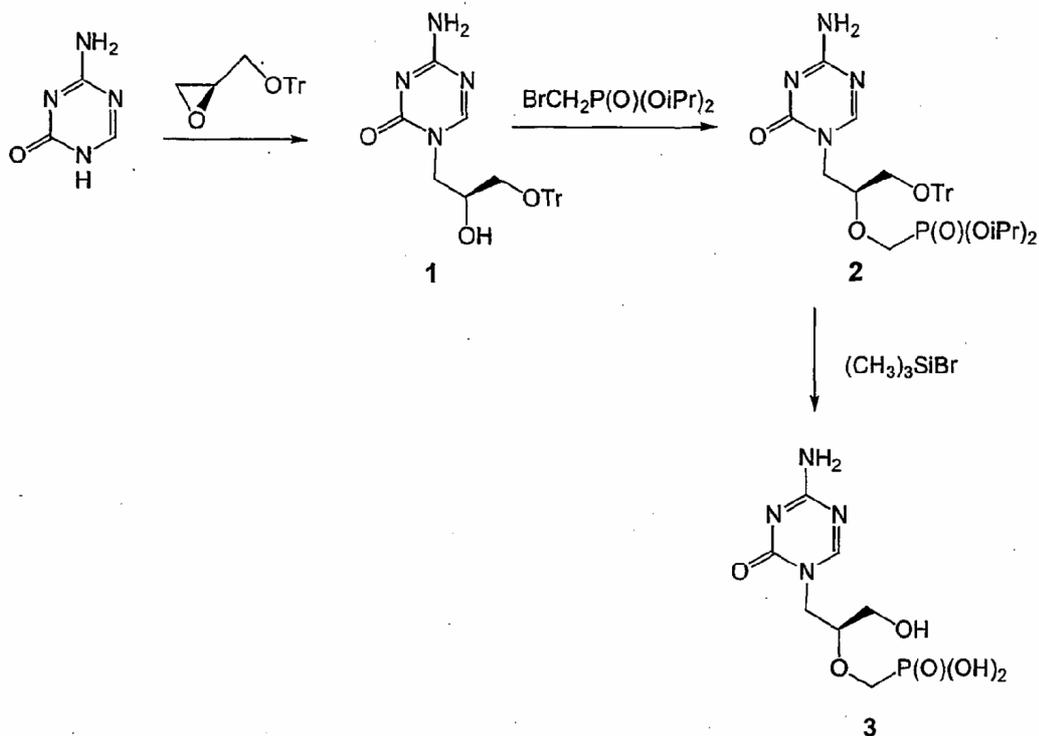
La invención también se refiere a isómeros, solvatos, tautómeros, sales, ésteres, amidatos, ésteramidatos o sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la fórmula anterior en este documento o a compuestos en equilibrio con el compuesto de la fórmula

anterior en este documento. En la técnica se sabe que la función fosfonato de análogos de nucleósidos puede derivatizarse para aumentar la actividad, la farmacocinética o el perfil dinámico o por otras razones. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a los ésteres de fosfonato, amidatos o ésteramidatos, en los que el fosfonato puede estar mono-  
5 o disustituido. Los ejemplos de dichos ésteres comprenden ésteres de alquilo, ésteres de alquenilo, ésteres de alquinilo, ésteres de alcoxialquilo y ésteres de alcoxialquenilo tales como octilo, tetracosilo, hexadeciloxipropilo, octadeciloxietilo, oleiloxipropilo, tetradeciloxipropilo, octadeciloxipropilo, oleiloxietilo, 1-O-octadecil-2-O-bencil-glicerilo y similares como se describe en la técnica anterior (es decir Keith K.A. et al., Antimicrobial  
10 agents and chemotherapy 2004, 1869-1871; Ciesla, S. L. et al, Antiviral Research 2003, 59, 163-171 y se incorporan en este documento como referencia). En una realización particular, los ésteres tienen al menos 16 átomos de carbono.

También es posible la conversión en el éster cíclico con un diéster cíclico hidrófobo de menor polaridad o neutro.

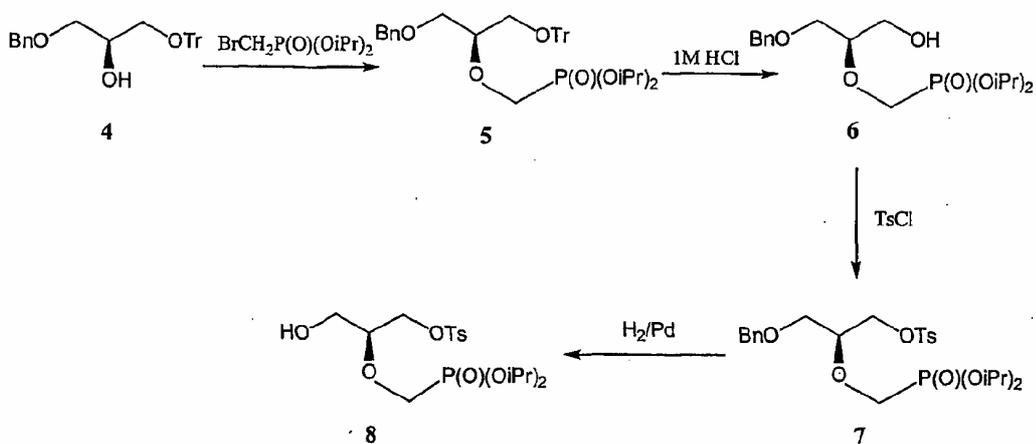
15 Los compuestos de acuerdo con la invención pueden prepararse mediante diferentes métodos. Por ejemplo, la suspensión de 5-azacitosina calentada con (2S)-2-[(tritoloxi)metil]oxirano en disolvente aprótico dipolar como por ejemplo dimetilsulfóxido seco (a 120°C en presencia de catalizador alcalino (por ejemplo hidróxido de sodio sólido) da el intermedio de tritilo 1 que produce en tratamiento con bromometilfosfonato de dialquilo  
20 (preferentemente de diisopropilo) en un disolvente aprótico (dimetilformamida, dioxano, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, etc.), y una base fuerte, por ejemplo, hidruro de sodio, alcóxido de sodio o de potasio (preferentemente t-butóxido), DBU (Diaza(1,3)biciclo[5.4.0]undecano) y similares el diéster de fosfonato 2 completamente protegido que puede aislarse fácilmente preferentemente mediante cromatografía en gel de sílice. En las etapas anteriores, el grupo tritilo puede sustituirse por cualquier grupo  
25 protector de O bien conocido en la técnica. El diéster 2 se desprotege a continuación mediante escisión tanto del éster de fosfonato como de los grupos tritilo. Ésta puede realizarse simultáneamente mediante el tratamiento con yodotrimetilsilano, bromotrimetilsilano o la mezcla de clorotrimetilsilano y yoduro de potasio en un disolvente  
30 inerte, preferentemente acetonitrilo, dimetilformamida, disolventes clorados y similares. El procedimiento adicional implica hidrólisis, aislamiento y purificación del producto.

Esquema 1: Síntesis de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (3) con el uso de (2S)-2-[(tritoloxi)metil]oxirano.

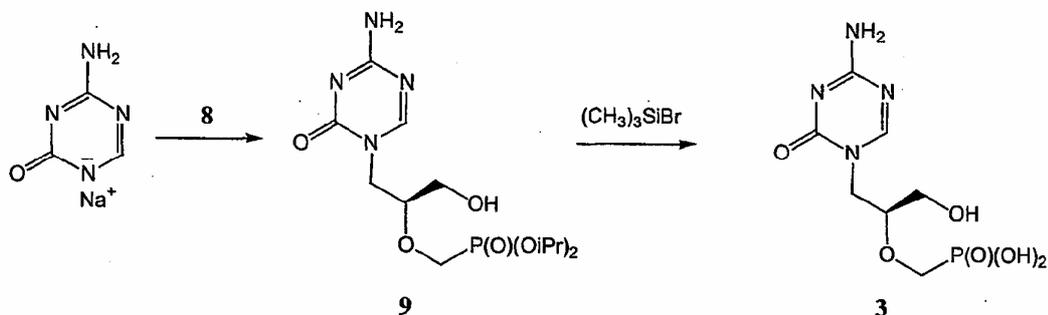


- Un método alternativo (como se muestra en el esquema 3), en base a condiciones más suaves más adecuadas para el heterociclo de triazina químicamente sensible, produce un compuesto de características fisicoquímicas y biológicas idénticas. Esta alternativa
- 5 comprende la condensación de sal sódica de 5-azacitosina, generada preferentemente *in situ* mediante el tratamiento de 5-azacitosina con un equivalente de hidruro de sodio en dimetilformamida con el llamado "HPMP-synthon" 8, es decir p-tolilsulfonato de 2(S)-2-[(diisopropiloxifosforil)metoxi]-3-hidroxi-propilo. Esto produce el diéster 9 de 5-azacitosina que se trata finalmente con bromotrimetilsilano y se elabora como en el primer
- 10 procedimiento.

Esquema 2: Síntesis de HPMP-synthon.



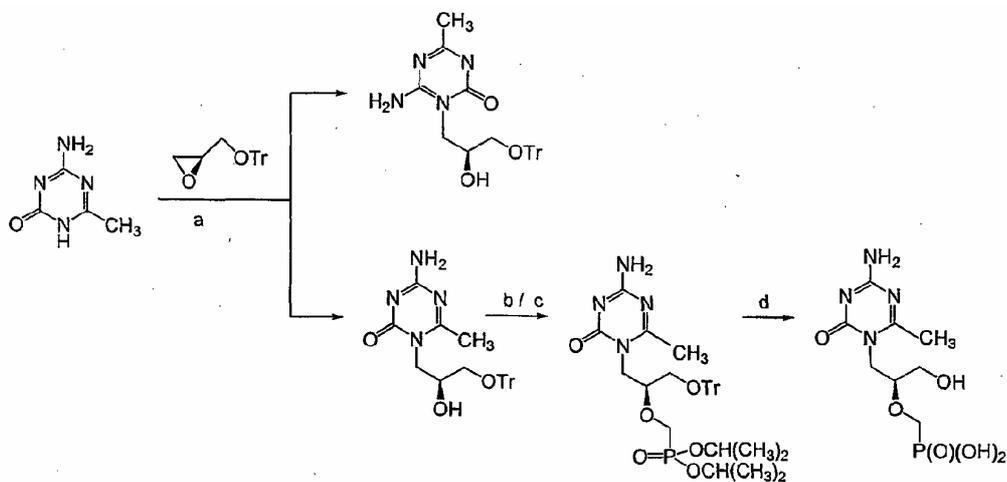
Esquema 3: Síntesis de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina a partir de HPMP-synthon



El HPMP-synthon se prepara preferentemente antes de la alquilación de 5-azacitosina mediante el procedimiento descrito anteriormente a partir de 2,3-O-isopropilidenglicerol ópticamente activo disponible en el mercado (o también llamado 2,2-dimetil-4-hidroximetil-1,3-dioxolano) como se describe de acuerdo con Holy A. et al., Nucleosides & Nucleotides 1995, 14, 695-702. En resumen, el material de partida se transforma mediante bencilación con halogenuro de bencilo y una base (preferentemente hidruro de sodio o hidróxido de potasio) seguida de tratamiento ácido al 1-O-bencilglicerol ópticamente activo (también disponible en el mercado) que se convierte, a su vez, en el derivado de 3-O-tritilo. La condensación de este compuesto con bromometilfosfonato de diisopropilo como se ha descrito anteriormente, destritilación, tosiliación del hidroxilo libre en la posición 1 mediante el tratamiento con p-tolilsulfonilcloruro en piridina o en un disolvente clorado en presencia de amina terciaria (preferentemente trietilamina o diisopropiletilamina) e hidrogenolisis del grupo protector de bencilo, preferentemente sobre catalizador de paladio sobre carbono, produce el HPMP-synthon.

Los derivados de 6-alkilo pueden sintetizarse de acuerdo con cualquiera de los tres métodos descritos a continuación si el alkilo en posición 6 es un alkilo  $\text{C}_{1-4}$ .

#### 20 Método I



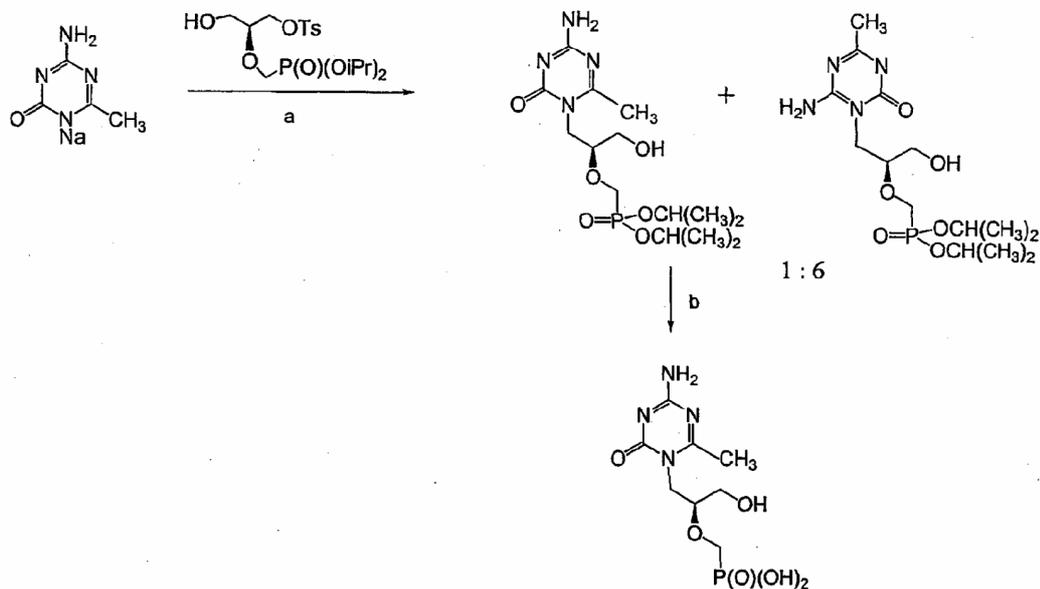
HPMP-6-metil  
-5-azacitosina

Condiciones: (a) DMSO, NaOH, 120°C, 6 h; (b) BrCH<sub>2</sub>P(O)(OiPr)<sub>2</sub>, t-butóxido de sodio, dioxano, 100°C, 4 h o: (c) TsOCH<sub>2</sub>P(O)(OiPr)<sub>2</sub>, NaH, DMF, temperatura ambiente, 20 h; (d) 5 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiBr, CH<sub>3</sub>CN, temperatura ambiente, 24 h

El procedimiento general del método I está constituido por una primera etapa de calentar hasta aproximadamente 120°C una suspensión de 4-amino-6-alkil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona y (2S)-2-[(tritoloxi)metil]oxirano en disolvente aprótico dipolar tal como por ejemplo dimetilsulfóxido seco en presencia de un catalizador alcalino (por ejemplo hidróxido de sodio 10 sólido). Esta primera etapa da como producto principal el intermedio de tritilo. En una segunda etapa, este intermedio de tritilo se hace reaccionar con un bromometilfosfonato de dialquilo (preferentemente diisopropilo) o un (tosiloxi)metilfosfonato de dialquilo en un disolvente aprótico (dimetilformamida, dioxano, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, etc.) en presencia de una base fuerte (tal como por ejemplo hidruro de sodio, alcóxido de sodio o de 15 potasio (preferentemente t-butóxido), DBU (Diaza(1,3)biciclo[5.4.0]undecano) y similares) para dar el diéster de fosfonato completamente protegido que puede aislarse fácilmente preferentemente mediante cromatografía en gel de sílice.

En las etapas anteriores, el grupo tritilo puede sustituirse por cualquier grupo protector de O bien conocido en la técnica. El diéster se desprotege a continuación 20 mediante escisión tanto del éster de fosfonato como de los grupos tritilo. Esto puede realizarse simultáneamente mediante tratamiento con yodotrimetilsilano, bromotrimetilsilano o la mezcla de clorotrimetilsilano y yoduro de potasio en un disolvente inerte, preferentemente acetonitrilo, dimetilformamida, disolventes clorados y similares. El procedimiento adicional incluye hidrólisis, aislamiento y purificación del producto.

25 Método II

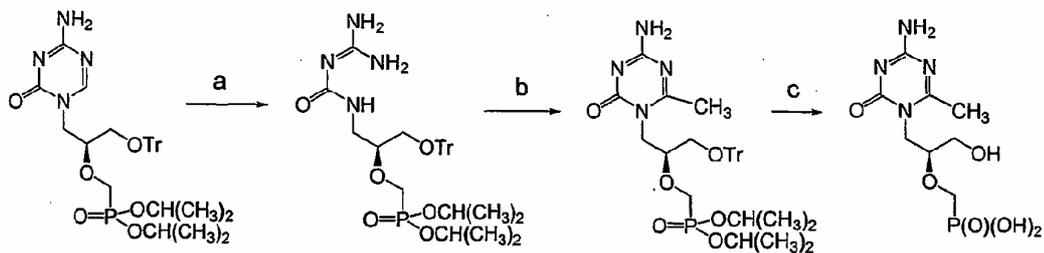


HPMP-6-metil-5-azacitosina

Condiciones: (a) DMF, 120°C, 5 h; (b)  $(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , temperatura ambiente, 24 h

- Este segundo método comprende la condensación de sal sódica de 4-amino-6-  
 5 alquil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona, generada preferentemente *in situ* mediante el tratamiento de  
 4-amino-6-alil)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona con un equivalente de hidruro de sodio en  
 dimetilformamida con el llamado "HPMP-synthon" **8**, es decir p-tolilsulfonato de 2(S)-2-  
 [(diisopropiloxifosforil)metoxi]-3-hidroxiopropilo. Esto proporciona el diéster de 4-amino-6-  
 alquil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona que se trata finalmente con bromotrimetilsilano y se elabora  
 10 como en el primer método.

Método III



HPMP-6-metil-5-azacitosina

- Condiciones: (a)  $\text{NH}_4\text{OH}$  acuoso al 25% +  $\text{CH}_3\text{OH}$  1:1, temperatura ambiente, 5 días; (b)  
 15 Ortoacetato de trietilo, DMF, 150°C, 3 h; (c)  $(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , temperatura ambiente, 24 h

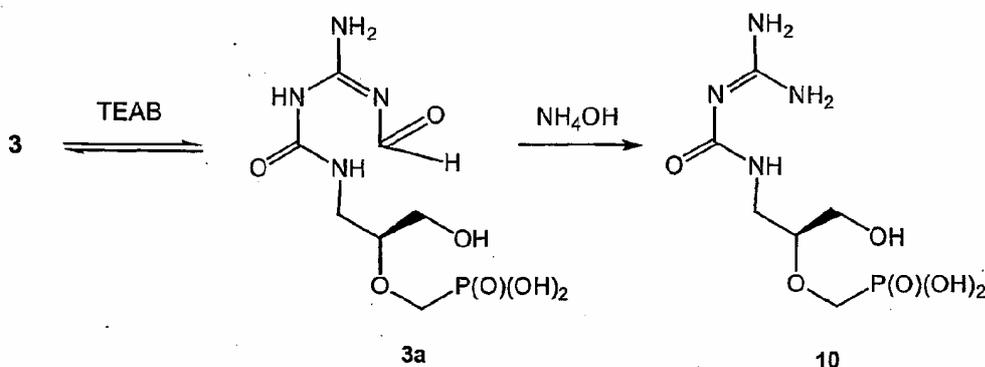
Generalmente, una mezcla de 2 con amoníaco acuoso en metanol se agita a  
 temperatura ambiente durante varios días. La mezcla se evapora y el residuo se coevapora  
 con etanol absoluto para dar un residuo oleoso de un producto intermedio. Este material se  
 disuelve a continuación en DMF y se calienta con el ortoéster apropiado a aproximadamente

150°C durante varias horas. La mezcla se evapora a continuación y el residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice. La desprotección realizada mediante el mismo procedimiento que el descrito para HPMP-5-azaC conduce a 6-alquil HPMP-5-azaC final.

5 Como alternativa, y para cadenas alquilo más largas, los derivados de 6-alquilo pueden prepararse como se ejemplifica en el ejemplo 16.

Análogamente, como los otros derivados de 5-azacitosina N<sup>1</sup>-sustituídos (ribósido, 2-desoxirribósido, arabinósido,...), también el análogo 5-aza de HPMP-5-azaC sufre una descomposición lenta en solución acuosa que se desarrolla de acuerdo con el esquema 4 a continuación en este documento.

Esquema 4: Equilibrio con 3-Formil-2-[(2S)-3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]carbamoil]guanidina sódica (3a) y degradación de la misma



La primera etapa es una apertura reversible del anillo de sim-triazina al derivado de N-formilguanidina que puede cerrarse de nuevo a la estructura cíclica. Esta etapa se produce en presencia de un tampón de trialquiamonio, por ejemplo hidrogenocarbonato de trietilamonio (TEAB), hidróxido de trietilamonio o acetato de trietilamonio. Esta reacción hidrolítica es lenta y alcanza el equilibrio a los pocos días. Está acompañada por la pérdida de absorción UV que permite determinar su curso. El producto de apertura del anillo **3a**, cuando se aplica a los sistemas biológicos, posee, por lo tanto, actividad idéntica a la del propio 5-aza-HPMP-5-azaC.

Sin embargo, esta hidrólisis de apertura de anillo reversible está acompañada por una reacción de desformilación irreversible del derivado de formilo que da origen a la 2-[(2S)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]carbamoil]guanidina sin actividad antiviral (**10**). Aunque esta reacción está controlada generalmente mediante catálisis ácido-básica, eventualmente podría acelerarse (o ralentizarse) *in vivo* mediante la acción de enzimas.

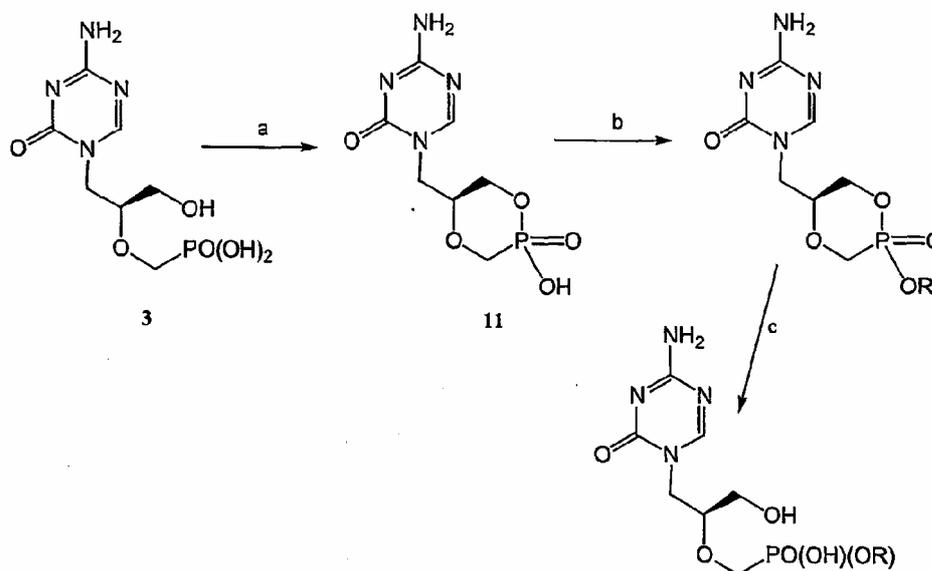
Como en HPMP-5-azaC y nucleótidos con actividad antiviral o anticancerosa, el carácter polar del grupo fosfonato interfiere en el transporte del compuesto al interior de la célula y, específicamente, limita el uso para aplicación oral del fármaco. Del mismo modo que en los casos anteriores, este obstáculo puede superarse mediante conversión al éster con un

diéster hidrófobo o diéster cíclico neutro de menor polaridad, ésteramidatos, bisamidatos y similares. Los métodos para su preparación son idénticos a los que se describen en la técnica anterior.

- 5 Los ésteres del compuesto 3 tales como ésteres cíclicos, ésteres de alquilo o ésteres de alcoxialquilo, pueden prepararse de acuerdo con el siguiente esquema:

Esquema 5: síntesis de ésteres

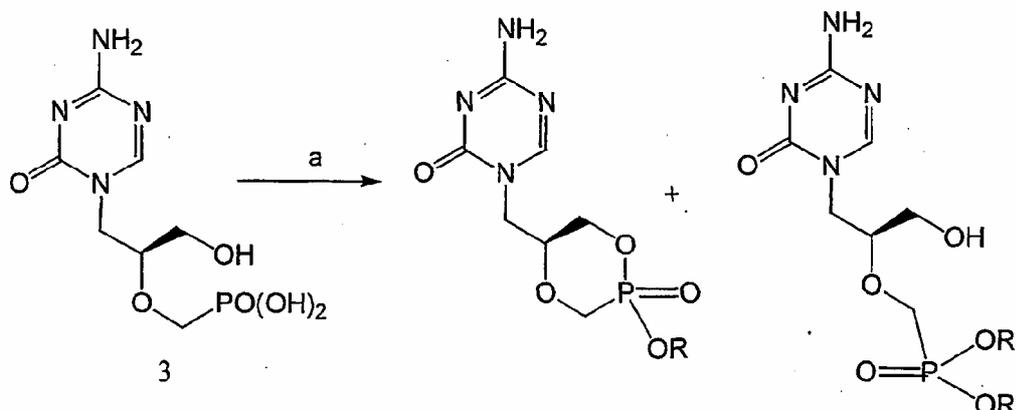
- 10 Reactivos: a. N,N-diciclohexil-4-morfolincarboxamidina, 1,3-diciclohexilcarbodiimida en DMF a temperatura elevada; b. (i) R-OH, 1,3-diciclohexilcarbodiimida y dimetilaminopiridina en DMF a temperatura elevada o (ii) R-halogenuro tal como R-halógeno (tales como RBr) en DMF a temperatura elevada; c. NaOH 0,5 M (es decir como se describe en Beadle, J. R. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 2381-2386).



Como alternativa, los ésteres del compuesto 3 también pueden prepararse de acuerdo con el esquema 6:

- 15 Esquema 6: ruta de síntesis alternativa para ésteres

Reactivos: a. N,N-diciclohexil-4-morfolincarboxamidina, R-halógeno (tal como RCl) en DMF. La separación de los productos es posible con técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia.



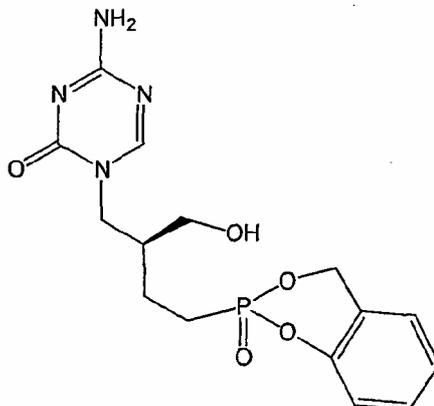
La síntesis de bis-fosforamidatos, mono-fosforamidatos o análogos de amidato-éster mezclados de los fosfonatos de nucleótidos análogos de acuerdo con la invención pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en el documento US5798340. Para la creación de fosforamidatos, pueden usarse aminoácidos u otras moléculas que porten una amina libre (no aminas terciarias).

La síntesis de los bis-fosforamidatos puede realizarse convirtiendo directamente el análogo de nucleótido libre tal como (*S*)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina en el compuesto de bis-fosforamidato correspondiente. La síntesis comprende el mezclado del análogo de nucleótido libre en un disolvente tal como DMF seco con aproximadamente 2 equivalentes de aminas o aminoácidos libres, que opcionalmente contienen además una base orgánica no nucleófila tal como trietilamina (de 3 a 10 equivalentes). La etapa de deshidratación se realiza añadiendo a la mezcla anterior una mezcla 1:1 de trifenilfosfina y disulfuro de 2,2'-dipiridilo (de 2 a 4 equivalentes) y (a) agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente de 4 a 16 h o (b) calentamiento a de 60°C a 100°C durante aproximadamente de 4 a 16 horas. El producto de bis-amidato final se recupera y se purifica mediante métodos convencionales.

Una reacción alternativa para sintetizar algunos fosforamidatos es convertir un análogo de fosfonato de nucleótido en el clorhidrato correspondiente mediante reacción con cloruro de tionilo en un disolvente como se describe en el documento EP481214. Un aminoácido u otra molécula que porta una amina libre se hace reaccionar a continuación con el clorhidrato para dar el bis-amidato correspondiente. Los mono-fosforamidatos o éster-fosforamidatos mezclados pueden sintetizarse de la siguiente manera: Por ejemplo, un bis-éster pueden convertirse en un éster-fosforamidato mezclado convirtiendo en primer lugar el bis-éster en un mono-éster mediante el tratamiento con una base débil para retirar un grupo éster y en una segunda etapa para convertirlo en el amidato. Además los ésteres de la HPMP-5-azaC cíclica pueden convertirse en fosforamidatos de la HPMP-5-azaC cíclica, retirando en primer lugar el éster en base libre (tal como NaOH 0,5 M) y a continuación convirtiéndolo en el amidato.

La conversión en el amidato puede realizarse como se ha descrito para los Bisfosforamidatos.

En una realización particular, la fórmula (I) corresponde al siguiente compuesto.



5 Este compuesto puede sintetizarse siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el documento "cycloSal-PMEA and cycloAmb-PMEA: Potentially New Phosphonate Prodrugs Based on the cycloSal-Pro-nucleotide Approach. *Journal of Medicinal Chemistry* (2005), 48, (25), 8079-8086."

10 En otra realización particular de la presente invención, pueden prepararse análogos de derivados de 6-azacitosina de la siguiente manera. La síntesis del congénere 6-azacitosina se basa en la reacción de 6-azacitosina con tritiloximetil-(2S)-oxirano; la posterior N<sup>4</sup>-benzoilación del resto de base da un producto intermedio. Su reacción con p-tolilsulfoniloximetilfosfonato de diisopropilo da el derivado de fosfonato completamente protegido. Usando técnicas de desprotección convencionales, el análogo 6-aza de cidofovir  
15 puede obtenerse a partir de este intermedio.

Se ha descubierto que los compuestos de la invención inhiben la replicación viral, especialmente de virus de ADN, y que inhiben trastornos de proliferación celular inducidos por virus tales como cáncer in vitro e in vivo. Los compuestos han mostrado una potente actividad contra diferentes virus de las familias *Herpesviridae*, *Orthopoxviridae* y  
20 *Papillomaviridae*. Han demostrado inhibir la replicación de diferentes cepas de virus del herpes simple, Citomegalovirus, virus de la varicela-zóster, virus de la variolovacuna, virus de la viruela bovina, virus del ectima contagioso y virus del papiloma humano, entre otros. Los compuestos también han demostrado inhibir trastornos de proliferación celular inducidos por virus tales como la formación de tumores y cáncer. En una realización  
25 particular, los compuestos de la invención también pueden usarse para la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por virus de los *Retroviridae* tales como VIH (virus de la inmunodeficiencia humana).

Por lo tanto, 5-aza-HPMPC combina en su estructura tanto la fuerte actividad antineoplásica como los efecto antivirales dirigidos contra los virus de ADN  
30 (específicamente poxvirus y virus del herpes) que a menudo aparecen en pacientes

inmunodeprimidos y causan complicaciones en la quimioterapia del cáncer.

De este modo, la presente invención proporciona compuestos que pueden usarse como una medicina y pueden usarse para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones víricas o trastornos de proliferación celular inducidos por virus en mamíferos, más específicamente seres humanos. La presente invención proporciona además un método para prevenir o tratar una infección vírica o un trastorno de proliferación celular inducido por virus en un sujeto o paciente, administrando al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de derivado de 5-azacitosina de la presente invención.

Los compuestos de la invención se emplean para el tratamiento o la profilaxis de infecciones víricas, más particularmente infecciones por virus de ADN. Cuando se usan uno o más compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II), como se definen en este documento:

- los ingredientes activos de los compuestos pueden administrarse al mamífero (incluyendo un ser humano) a tratar mediante cualquier medio bien conocido en la técnica, es decir por vía oral, por vía intranasal, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía parenteral o mediante cateterización.
- la cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación de los compuestos, especialmente para el tratamiento de infecciones víricas en seres humanos y otros mamíferos, preferentemente es una cantidad que inhibe una enzima de un virus de ADN. Más preferentemente, la cantidad que inhibe la replicación del virus de ADN o una cantidad que inhibe una enzima del virus de ADN de los derivados de fórmula (I) o (II), como se definen en este documento, corresponde a una cantidad que asegura un nivel en plasma de entre 1 pg/ml y 100 mg/ml. Esto puede conseguirse mediante la administración de la dosificación requerida para obtener dichos niveles en plasma, dependiendo de este modo de la afección patológica a tratar y del estado del paciente, dicha cantidad eficaz puede dividirse en varias subunidades al día o puede administrarse a intervalos de más de un día.

Como es convencional en la técnica, la evaluación de un efecto sinérgico en una combinación de fármacos puede realizarse analizando la cuantificación de las interacciones entre fármacos individuales, usando el principio del efecto mediano descrito por Chou et al. en Adv. Enzyme Reg. (1984) 22: 27. En resumen, este principio afirma que las interacciones (sinergia, aditividad, antagonismo) entre dos fármacos pueden cuantificarse usando el índice de combinación (denominado en lo sucesivo en este documento como IC) definido por la siguiente ecuación:

$$IC_x = \frac{DE_x^{1c}}{DE_x^{1a}} + \frac{DE_x^{2c}}{DE_x^{2a}}$$

en el que  $DE_x$  es la dosis del primer o respectivamente el segundo fármaco usado en solitario (1a, 2a), o en combinación con el segundo o respectivamente el primer fármaco (1c, 2c), que se necesita para producir un efecto dado. Dichos primer y segundo fármacos tienen efectos sinérgicos o aditivos o antagónicos dependiendo de si  $IC < 1$ ,  $IC = 1$ , o  $IC > 1$ , respectivamente.

La actividad sinérgica de las composiciones farmacéuticas o preparaciones combinadas de esta invención contra una infección vírica también puede determinarse fácilmente por medio de uno o más ensayos tales como, aunque sin limitarse a, el método del isoblograma, como ha sido descrito anteriormente por Elion et al., en J. Biol. Chem. (1954) 208: 477-488 y por Baba et al., en Antimicrob. Agents Chemother. (1984) 25: 515-517, usando la  $CE_{50}$  para calcular la concentración inhibitoria fraccional (denominada en lo sucesivo en este documento como CIF). Cuando el índice de CIF mínimo correspondiente a la CIF de compuestos combinados (por ejemplo,  $CIF_x + CIF_y$ ) es igual a 1,0, se dice que la combinación es aditiva; cuando está entre 1,0 y 0,5, la combinación se define como subsinérgica, y cuando es inferior a 0,5, la combinación se define como sinérgica. Cuando el índice de CIF mínimo está entre 1,0 y 2,0, la combinación se define como subantagonista y, cuando es mayor que 2,0, la combinación se define como antagonista. Este principio puede aplicarse a una combinación de diferentes fármacos antivirales de la invención o a una combinación de los fármacos antivirales de la invención con otros fármacos que muestran actividad anti-virus de ADN.

La invención se refiere, por lo tanto, a una composición farmacéutica o preparación combinada que tiene efectos sinérgicos contra una infección vírica y que contiene:

- 25 A)
- (a) una combinación de dos o más de los derivados de 5-azacitosina de la presente invención,
  - (b) opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticos o vehículos farmacéuticamente aceptables,
- 30 para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una infección vírica, o
- B)
- (c) uno o más agentes antivirales, y
  - (d) al menos uno de los derivados de 5-azacitosina de la presente invención, y
  - 35 (e) opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticos o vehículos farmacéuticamente aceptables,
- para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una

infección vírica.

Los agentes antivirales adecuados para su inclusión en las composiciones antivirales sinérgicas o preparaciones combinadas de esta invención incluyen compuestos anti-virus de ADN tales como, aunque sin limitarse a, Aciclovir y su profármaco valaciclovir (por ejemplo, activo contra virus alfa del herpes VHS y VVZ), Ganciclovir y su profármaco valganciclovir (por ejemplo, activo contra virus beta del herpes VHH-6 y CMVH y virus alfa del herpes VHS y VVZ), Foscavir (por ejemplo, activo contra virus alfa y beta del herpes), Brivudina (por ejemplo, activo contra VHS-1 y VVZ), Cidofovir (por ejemplo, activo contra todos los virus de ADN excepto el de la hepatitis B), Adefovir (por ejemplo, activo contra todos los virus del herpes y el de la hepatitis B) o Lamivudina (por ejemplo, activo contra la hepatitis B).

La composición farmacéutica o preparación combinada con actividad sinérgica contra una infección vírica de acuerdo con esta invención puede contener el derivado de 5-azacitosina de la presente invención, compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II), en un amplio intervalo de contenido dependiendo del uso contemplado y del efecto esperado de la preparación. Generalmente, el contenido de derivados de 5-azacitosina de la presente invención de la preparación combinada está dentro del intervalo del 0,1 al 99,9% en peso, preferentemente del 1 al 99% en peso, más preferentemente del 5 al 95% en peso.

De acuerdo con una realización particular de la invención, los compuestos de la invención pueden emplearse en combinación con otros agentes terapéuticos para el tratamiento o la profilaxis de infecciones víricas o trastornos de proliferación celular. La invención, por lo tanto, se refiere al uso de una composición que comprende:

- (a) uno o más compuestos de fórmula (i) o (II), y
- (b) uno o más inhibidores de la replicación viral o inhibidores de la proliferación celular como agentes biológicamente activos, por ejemplo en forma de una preparación combinada para su uso simultáneo, por separado o secuencial en terapia de infección vírica o trastorno de proliferación celular.

La presente invención proporciona además composiciones veterinarias que comprenden al menos un ingrediente activo como se ha definido anteriormente junto con un vehículo veterinario para éstas. Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el objetivo de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son en caso contrario son inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral o mediante cualquier otra vía deseada.

De forma más general, la invención se refiere a los compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II) que son útiles como agentes que tienen actividad biológica (particularmente actividad antiviral) o como agentes de diagnóstico. Cualquiera de los usos mencionados con respecto a la presente invención puede restringirse a un uso no

médico, un uso no terapéutico, un uso no de diagnóstico, o exclusivamente un uso *in vitro*, o un uso relacionado con células alejadas de un animal.

Los compuestos de la invención opcionalmente están unidos covalentemente a una matriz insoluble y se usan para cromatografía de afinidad (separaciones, dependiendo de la naturaleza de los grupos de los compuestos, por ejemplo los compuestos con arilo son  
5 útiles en separaciones por afinidad hidrófoba.

Los expertos en la materia también de darán cuenta de que los compuestos de la invención pueden existir en muchos estados de protonación diferentes, dependiendo de, entre otras cosas, el pH de su entorno. Aunque las fórmulas estructurales proporcionadas  
10 en este documento representan a los compuestos solamente en uno de varios estados de protonación posibles, se entenderá que estas estructuras son solamente ilustrativas, y que la invención no está limitada a ningún estado de protonación particular, se pretende que todas y cada una de las formas protonadas de los compuestos entren dentro del alcance de la invención.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" como se usa en este documento significa las formas de sales no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II) son capaces de formar. Por lo tanto, los compuestos de esta invención opcionalmente comprenden sales de los compuestos en este documento, especialmente sales no tóxicas farmacéuticamente  
20 aceptables que contienen, por ejemplo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . Dichas sales puede incluir las obtenidas mediante combinación de cationes apropiados tales como iones de metales alcalinos y alcalinotérreos o iones de amonio y amino cuaternario con un resto anión ácido, habitualmente un ácido carboxílico. Los compuestos de la invención pueden portar múltiples cargas positivas o negativas. La carga neta de los compuestos de la invención puede ser  
25 positiva o negativa. Cualesquiera contraiones asociados vienen dictados habitualmente por los métodos de síntesis y/o aislamiento mediante los cuales se obtienen los compuestos. Los contraiones típicos incluyen, aunque no se limitan a, amonio, sodio, potasio, litio, haluros, acetato, trifluoroacetato, etc., y mezclas de los mismos. Se entenderá que la identidad de cualquier contraión asociado no es una característica crítica de la invención, y que la invención abarca los compuestos en asociación con cualquier tipo de contraión.  
30 Además, dado que los compuestos pueden existir en diversas formas diferentes, la invención pretende abarcar no solamente formas de los compuestos que están en asociación con contraiones (por ejemplo, sales secas), sino también formas que no están en asociación con contraiones (por ejemplo, soluciones acuosas u orgánicas). Las sales metálicas se preparan habitualmente haciendo reaccionar al hidróxido metálico con un  
35 compuesto de esta invención. Son ejemplos de sales metálicas que se preparan de esta manera sales que contienen  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , y  $\text{K}^+$ . Una sal metálica menos soluble puede precipitar a partir de la solución de una sal más soluble mediante adición del compuesto metálico adecuado. Además, pueden formarse sales a partir de la adición ácida de ciertos ácidos

orgánicos e inorgánicos a centros básicos, habitualmente aminas, o a grupos ácidos. Los ejemplos de dichos ácidos apropiados incluyen, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálidos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, 5 propanoico, hidroxiacético, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, láctico, pirúvico, oxálico (es decir etanodioico), malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclohexanosulfámico, salicílico (es decir 2-hidroxibenzoico), p-aminosalicílico y similares. Además, esta expresión también incluye los solvatos que los 10 compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II), así como sus sales, son capaces de formar, tales como por ejemplo hidratos, alcoholatos y similares. Finalmente, se entiende que las composiciones en este documento comprenden compuestos de la invención en su forma no ionizada, así como zwitteriónica, y combinaciones con cantidades estequiométricas de agua, como en hidratos.

15 También se incluyen dentro del alcance de esta invención las sales de los compuestos parentales con uno o más aminoácidos, especialmente los aminoácidos de origen natural que se encuentran como componentes de las proteínas. El aminoácido es habitualmente uno que porta una cadena lateral con un grupo básico o ácido, por ejemplo, lisina, arginina o ácido glutámico, o un grupo neutro tal como glicina, serina, treonina, 20 alanina, isoleucina o leucina.

Los compuestos de la invención también incluyen sales fisiológicamente aceptables de los mismos. Los ejemplos de sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen sales obtenidas a partir de una base apropiada, tal como un metal alcalino (por ejemplo, sodio), un alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amonio y  $NX^{4+}$  25 (donde X es alquilo  $C_1-C_4$ ). Las sales fisiológicamente aceptables de un átomo de hidrógeno o un grupo amino incluyen sales de ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácidos acético, benzoico, láctico, fumárico, tartárico, maleico, malónico, málico, isetionico, lactobiónico y succínico; ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico y p-toluenosulfónico; y ácidos inorgánicos, tales como ácidos clorhídrico, 30 sulfúrico, fosfórico y sulfámico. Las sales fisiológicamente aceptables de un compuesto que contiene un grupo hidroxilo incluyen el anión de dicho compuesto en combinación con un catión adecuado tal como  $Na^+$  y  $NX^{4+}$  (donde X habitualmente se selecciona independientemente entre H o un grupo alquilo  $C_1-C_4$ ). Sin embargo, las sales de ácidos o bases que no son fisiológicamente aceptables también pueden ser útiles, por ejemplo, en la 35 preparación o purificación de un compuesto fisiológicamente aceptable. Todas las sales, ya se obtengan o no de un ácido o base fisiológicamente aceptable, están dentro del alcance de la presente invención.

Como se usa en este documento y a menos que se indique lo contrario, el término "enantiómero" significa cada forma ópticamente activa individual de un compuesto de la

invención, que tiene una pureza óptica o exceso enantiomérico (según se determina mediante métodos convencionales en la técnica) de al menos el 80% (es decir al menos el 90% de un enantiómero y como máximo el 10% del otro enantiómero), preferentemente al menos el 90% y más preferentemente al menos el 98%.

5 El término "isómero" como se usa en este documento significa todas las formas isoméricas posibles, incluyendo formas tautoméricas y estereoquímicas, que los compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II) pueden poseer, pero sin incluir isómeros de posición. Habitualmente, las estructuras mostradas en este documento ejemplifican solamente una forma tautomérica o de resonancia de los  
10 compuestos, pero las configuraciones alternativas correspondientes también se contemplan.

A no ser que se indique lo contrario, la designación química de los compuestos indica la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles, conteniendo dichas mezclas todos los diastereómeros y enantiómeros (dado que los compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II) pueden tener al menos un centro  
15 quiral) de la estructura molecular básica, así como los compuestos estereoquímicamente puros o enriquecidos. Más particularmente, los centros estereogénicos pueden tener la configuración R- o S-, y los enlaces múltiples pueden tener la configuración cis- o trans-. Las formas isoméricas puras de dichos compuestos se definen como isómeros sustancialmente libres de otras formas enantioméricas o diastereoméricas de la misma estructura molecular  
20 básica. En particular, la expresión "estereoquímicamente puro" o "quiralmente puro" se refiere a compuestos que tienen un exceso estereoisomérico de al menos aproximadamente el 80% (es decir al menos el 90% de un isómero y como máximo el 10% de los demás isómeros posibles), preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 94% y de la forma más preferente al menos el 97%. Las expresiones "enantioméricamente  
25 puro" y "diastereoméricamente puro" deben entenderse de manera similar, teniendo en cuenta el exceso enantiomérico, o respectivamente el exceso diastereomérico, de la mezcla en cuestión. La separación de estereoisómeros se consigue mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Un enantiómero de un compuesto de la invención puede separarse sustancialmente libre de su enantiómero opuesto mediante  
30 un método tal como formación de diastereómeros usando agentes de resolución ópticamente activos ("Stereochemistry of Carbon Compounds" (1962) de E. L. Eliel, McGraw Hill; o Lochmuller (1975) J. Chromatogr., 113: (3) 283-302). La separación de isómeros en una mezcla pueden conseguirse mediante cualquier método adecuado, incluyendo: (1) formación de sales iónicas, diastereoméricas con compuestos quirales y separación  
35 mediante cristalización fraccionada u otros métodos, (2) formación de compuestos diastereoméricos con reactivos de derivatización quiral, separación de los diastereómeros, y conversión a los enantiómeros puros, o (3) los enantiómeros pueden separarse directamente en condiciones quirales. Con el método (1), pueden formarse sales diastereoméricas mediante reacción de bases quirales enantioméricamente puras tales

como brucina, quinina, efedrina, estricnina, a-metil-b-feniletilamina (anfetamina), y similares con compuestos asimétricos que portan funcionalidad ácida, tales como ácido carboxílico y ácido sulfónico. Puede inducirse la separación de las sales diastereoméricas mediante cristalización fraccionada o cromatografía iónica. Para la separación de los isómeros ópticos de compuestos amino, la adición de ácidos carboxílico o sulfónico quirales, tales como ácido canforsulfónico, ácido tartárico, ácido mandélico, o ácido láctico puede dar como resultado la formación de las sales diastereoméricas. Como alternativa, mediante el método (2), el sustrato a resolver puede hacerse reaccionar con un enantiómero de un compuesto quiral para formar un par diastereomérico (Eliel, E. y Wilen, S. (1994) *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., p. 322). Los compuestos diastereoméricos puede formarse haciendo reaccionar a compuestos asimétricos con reactivos de derivatización quiral enantioméricamente puros, tales como derivados de mentilo, seguido de la separación de los diastereómeros e hidrólisis para dar los compuestos enriquecidos enantioméricamente, libres de la invención. Un método de determinación de la pureza óptica implica preparar ésteres quirales, tales como un éster mentílico o éster de Mosher, acetato de a-metoxi-a- (trifluorometil)fenilo (Jacob III. (1982) *J. Org. Chem.* 47:4165), de la mezcla racémica, y analizar el espectro de RMN para detectar la presencia de los dos diastereómeros atropisoméricos. Los diastereómeros estables pueden separarse y aislarse mediante cromatografía de fase normal e inversa siguiendo métodos para la separación de naftil-isoquinolinas atropisoméricas (Hoye, T., WO 96/15111). En el método (3), una mezcla racémica de dos enantiómeros asimétricos se separa mediante cromatografía usando una fase estacionaria quiral. Las fases estacionarias quirales adecuadas son, por ejemplo, polisacáridos, en particular derivados de celulosa o amilosa. Las fases estacionarias quirales a base de polisacáridos disponibles en el mercado son ChiralCel<sup>TM</sup> CA, OA, OB5, OC5, OD, OF, OG, OJ y OK, y Chiralpak<sup>TM</sup> AD, AS, OP(+) y OT(+). Los eluyentes o fases móviles apropiadas para su uso en combinación con dichas fases estacionarias quirales de polisacáridos son hexano y similares, modificadas con un alcohol tal como etanol, isopropanol y similares. (“Chiral Liquid Chromatography” (1989) W. J. Lough, Ed. Chapman and Hall, Nueva York; Okamoto, (1990) “Optical resolution of dihydropyridine enantiomers by High-performance liquid chromatography using phenylcarbamates of polysaccharides as a chiral stationary phase”, *J. of Chromatogr.* 513: 375-378).

Los términos cis y trans se usan en este documento de acuerdo con la nomenclatura del documento *Chemical Abstracts* e incluyen referencia a la posición de los sustituyentes en un resto del anillo. La configuración estereoquímica absoluta de los compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II) puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia mientras usan métodos bien conocidos tales como, por ejemplo, difracción de rayos X o RMN.

Los compuestos de la invención pueden formularse con vehículos y excipientes convencionales, que se seleccionarán de acuerdo con la práctica ordinaria. Los

comprimidos contendrán excipientes, glidantes, cargas, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan de forma estéril, y cuando se diseñan para el suministro mediante una ruta diferente a la administración oral generalmente serán isotónicas. Las formulaciones opcionalmente contienen excipientes tales como los que se muestran en el

5 documento "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986) e incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA, carbohidratos tales como dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmetilcelulosa, ácido esteárico y similares.

Posteriormente, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento, significa cualquier material o sustancia con la que el ingrediente activo se formula para facilitar su aplicación o diseminación al lugar a tratar, por ejemplo

10 disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manejo sin alterar su eficacia. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir las composiciones de esta invención pueden usarse adecuadamente como

15 concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, pildoritas o polvos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidas por los expertos en la materia, y no hay ninguna restricción particular a su selección en la presente invención. También puede incluir

20 aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, pegamentos, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares, siempre que los mismos sean consecuentes con la práctica farmacéutica, es decir vehículos y aditivos que no creen un daño permanente a mamíferos.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo mezclando de forma homogénea, recubriendo y/o triturando los ingredientes activos, en un procedimiento de una etapa o de etapas múltiples, con el material vehículo seleccionado y, donde sea apropiado, los demás aditivos tales como agentes tensioactivos también pueden prepararse mediante micronización, por ejemplo con

30 la intención de obtenerlas en forma de microesferas que tienen habitualmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10  $\mu\text{m}$ , concretamente para la fabricación de microcápsulas para liberación controlada o sostenida de los ingredientes activos.

Los agentes tensioactivos adecuados, también conocidos como emulgente o emulsionante, que se usarán en las composiciones farmacéuticas de la presente invención

35 son materiales no iónicos, catiónicos y/o aniónicos que tienen buenas propiedades emulsionantes, dispersantes y/o humectantes. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen tanto jabones solubles en agua como agentes tensioactivos sintéticos solubles en agua. Los jabones adecuados son sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio sin sustituir o sustituidas o ácidos grasos superiores ( $\text{C}_{10}\text{-C}_{22}$ ), por ejemplo las sales

de sodio o de potasio de ácido oleico o esteárico, o de mezcla de ácidos grasos naturales que pueden obtenerse a partir de aceite coco o aceite de sebo. Los tensioactivos sintéticos incluyen sales de sodio o de calcio de ácidos poliacrílicos; sulfonatos y sulfatos grasos; derivados de bencimidazol sulfonados y alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos o sulfatos grasos  
5 están habitualmente en forma de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sales de amonio sustituidas por un radical alquilo o acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, por ejemplo la sal de sodio o de calcio de ácido lignosulfónico o ácido dodecilsulfónico o una mezcla de sulfatos de alcohol graso obtenidos a partir de ácidos grasos naturales, sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de ésteres de ácido  
10 sulfúrico o sulfónico (tales como lauril sulfato sódico) y ácidos sulfónicos de aductos de alcohol graso/óxido de etileno. Los derivados de bencimidazol sulfonados adecuados contienen preferentemente de 8 a 22 átomos de carbono. Son ejemplos de alquilarilsulfonatos las sales de sodio, calcio o alcanolamina de ácido dodecilsulfónico o ácido dibutil-naftalenosulfónico o un producto de condensación  
15 de ácido naftalenosulfónico/formaldehído. También son adecuados los fosfatos correspondientes, por ejemplo sales del éster de ácido fosfórico y un aducto de p-nonilfenol con óxido de etileno y/o propileno, o fosfolípidos. Los fosfolípidos adecuados para este fin son los fosfolípidos naturales (que se originan a partir de células animales o vegetales) o sintéticos de tipo cefalina o lecitina tales como por ejemplo fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, lisolecitina, cardiolipina, dioctanilfosfatidilcolina,  
20 dipalmitoilfosfatidilcolina y sus mezclas.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen derivados polietoxilados y polipropoxilados de alquilfenoles, alcoholes grasos, ácidos grasos, aminas o amidas alifáticas que contienen al menos 12 átomos de carbono en la molécula,  
25 alquilarensulfonatos y dialquilsulfosuccinatos, tales como derivados de éter poliglicólico de alcoholes alifáticos y cicloalifáticos, ácidos grasos saturados e insaturados y alquilfenoles, conteniendo dichos derivados preferentemente de 3 a 10 grupos de éter glicólico y de 8 a 20 átomos de carbono en el resto de hidrocarburo (alifático) y de 6 a 18 átomos de carbono en el resto alquilo del alquilfenol. Tensioactivos no iónicos adecuados adicionales son aductos  
30 solubles en agua de óxido de polietileno con polipropilenglicol, etilendiaminopolipropilenglicol que contiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena alquilo, aductos que contienen a 20 a 250 grupos de éter etilenglicólico y/o de 10 a 100 grupos de éter propilenglicólico. Dichos compuestos habitualmente contienen de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Son ejemplos representativos de  
35 tensioactivos no iónicos nonilfenol-polietoxietanol, éteres poliglicólicos de aceite de ricino, aductos de polipropileno/óxido de polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxipolietoxietanol. Los ésteres de ácidos grasos de polietileno sorbitán (tales como trioleato de polioxietilen sorbitán), glicerol, sorbitán, sacarosa y pentaeritritol también son tensioactivos no iónicos adecuados.

Los tensioactivos catiónicos adecuados incluyen sales de amonio cuaternario, particularmente haluros, que tienen 4 radicales de hidrocarburo opcionalmente sustituidos por halo, fenilo, fenilo sustituido o hidroxilo; por ejemplo sales de amonio cuaternario que contienen como N-sustituyente al menos un radical alquilo C<sub>8</sub>C<sub>22</sub> (por ejemplo cetilo, 5 laurilo, palmitilo, miristilo, oleilo y similares) y, como sustituyentes adicionales, radicales alquilo inferior, bencilo y/o e hidroxialquilo inferior no sustituidos o halogenados.

Una descripción más detallada de agentes tensioactivos adecuados para este fin puede encontrarse, por ejemplo, en los documentos "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" (MC Publishing Corp., Ridgewood, Nueva Jersey, 1981), "Tensid- 10 Taschenbuch", 2ª ed. (Hanser Verlag, Viena, 1981) y "Encyclopaedia of Surfactants", (Chemical Publishing Co., Nueva York, 1981).

Los compuestos de la invención y sus sales fisiológicamente aceptables (en lo sucesivo denominados de forma colectiva como los ingredientes activos) pueden administrarse mediante cualquier vía apropiada para la afección a tratar, incluyendo las vías 15 adecuadas oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar con, por ejemplo, el estado del receptor.

Aunque es posible que los ingredientes activos se administren en solitario es 20 preferible presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, para uso tanto veterinario como humano, de la presente invención comprenden al menos un ingrediente activo, como se ha descrito anteriormente, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para éste y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. Los vehículos son, de forma óptima, "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los 25 demás ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de la misma. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse 30 mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y a continuación, en caso necesario, dando forma al producto.

35 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse con unidades discretas tales como cápsulas, cápsulas comprimidas o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una

emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también puede presentarse como una embolada, electuario o pasta.

Un composición puede prepararse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos formados por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar recubiertos o ranurados y pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del ingrediente activo en su interior. Para infecciones oculares o de otros tejidos externos por ejemplo boca y piel, las formulaciones se aplican opcionalmente como una pomada o crema tópica que contiene el(los) ingrediente(s) activo(s) en una cantidad de, por ejemplo, del 0,075 al 20% en p/p (incluyendo ingrediente(s) activo(s) en un intervalo entre el 0,1% y el 20% en incrementos del 0,1% en p/p tales como el 0,6% en p/p, el 0,7% en p/p, etc.), preferentemente del 0,2 al 15% en p/p y de la forma más preferente del 0,5 al 10% en p/p. Cuando se formulan en una pomada, los ingredientes activos pueden emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos el 30% en p/p de un alcohol polihídrico, es decir un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y prolitilenglicol (incluyendo PEG400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir idealmente un compuesto que potencia la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados. La fase oleosa de las emulsiones de esta invención puede estar constituida, a partir de ingredientes conocidos, de manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (conocido de otro modo como emulgente), comprende idealmente una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Opcionalmente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el(los) emulsionante(s) con o sin estabilizante(s) forman la llamada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa forman la llamada base de pomada emulsionante que forma la fase dispersa oleosa de las formulaciones de crema. La elección de aceites o grasas adecuadas para la formulación se basa en conseguir las propiedades cosméticas deseadas, dado que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites que es probable que se usen en formulaciones de emulsión farmacéuticas es muy baja. De este modo, la crema debe ser opcionalmente un producto no graso, que no manche y lavable con una consistencia

adecuada para evitar la fuga de tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres de alquilo mono o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster propilenglicólico de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etihexilo o una mezcla

5 de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo los tres últimos los ésteres preferidos. Estos pueden usarse en solitario o en combinación, dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo incluyen además

10 gotas oculares en las que el ingrediente activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está presente opcionalmente en dichas formulaciones en una concentración del 0,5 al 20%, ventajosamente del 0,5 al 10% particularmente aproximadamente el 1,5% en p/p. Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen grageas que

15 comprenden el ingrediente activo en una base con sabor, habitualmente sacarosa y goma arábica o goma tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un

20 supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo en el intervalo de 20 a 500 micrómetros (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 20 y 500 micrómetros en incrementos de 5 micrómetros tales como 30 micrómetros, 35

25 micrómetros, etc.), que se administra de la manera en la que se toma rapé, es decir mediante una rápida inhalación a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para administración como por ejemplo un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas

30 para administración en aerosol pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales y pueden administrarse con otros agentes terapéuticos.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen, además del ingrediente activo, vehículos tales que se sabe en

35 la técnica que son apropiados.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de

suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o dosis múltiple, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en estado seco por congelación (liofilizado) requiriendo solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o sub-dosis diaria unitaria, como se ha descrito anteriormente en este documento, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo.

Debe entenderse que, además de los ingredientes mencionados particularmente anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica y que tienen en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellas adecuadas para administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

Los compuestos de la invención pueden usarse para proporcionar formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen, como ingrediente activo, uno o más compuestos de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en las que la liberación del ingrediente activo puede controlarse y regularse para permitir una dosificación con menos frecuencia o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un compuesto de la invención dado. Las formulaciones de liberación controlada adaptadas para administración oral en la que unidades discretas que comprenden uno o más compuestos de la invención pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales.

Pueden incluirse ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del ingrediente activo en la composición. De este modo, pueden conseguirse composiciones de liberación controlada seleccionando vehículos poliméricos apropiados tales como, por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina y similares. La tasa de liberación del fármaco y la duración de la acción también pueden controlarse incorporando el ingrediente activo en partículas, por ejemplo microcápsulas, de una sustancia polimérica tal como hidrogeles, ácido poliláctico, hidroximetilcelulosa, metacrilato de polinietilo y los demás polímeros descritos anteriormente. Dichos métodos incluyen sistemas de administración de fármacos coloidales como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y demás. Dependiendo de la vía de administración, la composición farmacéutica puede requerir recubrimientos protectores. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de las mismas. Los vehículos típicos para este fin incluyen, por lo tanto, tampones acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, prolietilenglicol y similares y mezclas de los mismos.

En vista del hecho de que, cuando se usan varios ingredientes activos en combinación, estos no necesariamente producen su efecto terapéutico conjunto

directamente al mismo tiempo en el mamífero a tratar, la composición correspondiente también puede estar en forma de un kit o envase médico que contiene los dos ingredientes en depósitos o compartimentos separados pero adyacentes. En este último contexto, cada ingrediente activo puede formularse, por lo tanto, de una manera adecuada para una vía de administración diferente de la del otro ingrediente, por ejemplo uno de ellos puede estar en forma de una formulación oral o parenteral mientras que el otro está en forma de una ampolla para inyección intravenosa o un aerosol.

El estudio de la actividad biológica contra virus representativos, la descripción de la actividad sobre modelos animales in vivo seleccionados, los métodos de preparación del compuesto del título 3 de acuerdo con la invención, así como de los intermedios y derivados sintéticos necesarios se describen en los siguientes ejemplos. Los compuestos de acuerdo con las fórmulas de la solicitud como (I) o (II) pueden prepararse mientras se usan una serie de reacciones químicas conocidas por los expertos en la materia, que forman todas juntas el proceso para preparar dichos compuestos y que se ejemplifican a continuación. Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar la presente invención y no pretenden ser en absoluto y no debe interpretarse de ninguna manera que son limitantes del alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1: Síntesis de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (3) con el uso de (2S)-2-[(tritoloxi)metil]oxirano.

(a) Síntesis de (S)-1-[2-Hidroxi-3-(trifenilmetoxi)propil]-5-azacitosina (1):

Una suspensión de 5-azacitosina (2 g, 17,8 mmoles) y (2S)-2-[(tritoloxi)metil]oxirano (5,63 g, 17,8 mmoles) en dimetilsulfóxido seco (20 ml) se calentó a 120°C. Se añadió un sedimento de hidróxido de sodio (60 mg, 1,5 mmoles), el calentamiento con agitación continuó hasta la disolución y a continuación durante 10 h adicionales. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en una columna de alúmina neutra (150 ml) equilibrada en tolueno. La elución se realizó con una mezcla de tolueno - acetato de etilo (1:1) hasta la caída de la absorción de UV seguida de acetato de etilo (200 ml) y a continuación un sistema de acetato de etilo - acetona - etanol - agua (18:3:1:1). La pureza del producto se controló mediante TLC en el mismo sistema. Todas las fracciones que contienen producto (que siguen conteniendo dimetilsulfóxido) se hicieron precipitar, el residuo se codestiló con dimetilformamida (2 x 100 ml) y a continuación con tolueno (100 ml). El residuo semisólido se cristalizó a partir de una mezcla de tolueno - acetona (2:1), el material cristalino se recogió por aspiración, se lavó con éter dietílico y se secó al aire.

Rendimiento 6,5 g de 1 (83%), cristales blancos,

- punto de fusión 130-132°C,
- para  $C_{25}H_{24}N_4O_3 \cdot 0,5 H_2O$  (437,5) calculado: 68,63% C, 5,76% H, 12,81% N; encontrado: 68,82% C, 5,87% H, 12,25% N.
- FAB MS,  $m/z$  (%): 429 (2) [M+H], 243 (100) [tritol], 113 [5-azacitosina + H].
- $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ): 8,08 s, 1H (H-6); 7,42 m, 6 H (H-arom.); 7,40 s ancho, 1H

(NH<sub>2</sub>); 7,36 m, 6H (H-arom.); 7,30 s ancho, 1H (NH<sub>2</sub>); 7,27 m, 3H (H-arom); 4,04 dd, 1H,  $J(1'a',2') = 3,2$ ,  $J(\text{gem}) = 13,4$  (H-1'a); 3,92 m, 1H (H-2'); 3,41 dd, 1H,  $J(1'b,2') = 9,1$  (H-1'b); 2,97 dd, 1H,  $J(3'a,2') = 5,0$ ,  $J(\text{gem}) = 9,4$  (H-3'a); 2,88 dd, 1H,  $J(3'b,2') = 5,5$  (H-3'b).

- 5 - <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 166,70 (C-4); 159,89 (C-6); 154,26 (C-2); 143,88, 3C (trilito); 128,43, 6C (trilito); 128,10, 6C (trilito); 127,23, 3C (trilito); 86,07 (O-C); 66,77 (C-2'); 66,15 (C-3'); 50,55 (C-1').

(b) Síntesis de (*S*)-1-[2-(*Diisopropilfosforilmetoxi*)-3-(*trilitoxi*)propil]-5-azacitosina (2):

- 10 • *Método A.* Una suspensión de 1 (785 mg, 1,8 mmoles) en dioxano seco (4 ml) se agitó con terc-butóxido de sodio (220 mg, 2,3 mmoles). Después de una completa disolución del material de partida (aproximadamente 15 minutos) se añadió bromometilfosfonato de diisopropilo (700 mg, 2,7 mmoles) y la mezcla se calentó a 80°C durante 6 h, y a continuación se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizó gota a gota con ácido acético a pH 7 y se hizo precipitar. El residuo se cromatografió en gel de sílice (300 ml)
- 15 en el sistema de cloroformo - metanol - trietilamina (100:5:1). Después de la elución de una mezcla de sub-productos (R<sub>F</sub> 0,40), el producto deseado (R<sub>F</sub> 0,35) se eluyó; el resto del compuesto de partida que no reaccionó se eluyó con R<sub>F</sub> 0,30 (215 mg, 27%). Las fracciones que contenían el producto se evaporaron para dar 400 mg de 2 (36%) como una espuma blanca,
- 20 -  $[\alpha]_D -36,3$  (*c* 0,715, CHCl<sub>3</sub>),  
 - para C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P (606,6) calculado: 63,36% C, 6,50% H, 9,24% N, 5,11% P; encontrado: 63,18% C, 6,57% H, 9,04% N, 5,32% P,  
 - FAB MS, *m/z* (%): 629 (0,6) [M+Na], 365 (0,2) [M-trilito + 2H]; 243 (100) [trilito],  
 - <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 8,08 s, 1H (H-6); 7,41 d, 6H (H-arom.); 7,36 s ancho, 2H (NH<sub>2</sub>); 7,35 t, 6H y 7,27 t, 3H (H-arom.); 4,54 m, 2H (P-OCH); 3,93 dd, 1H,  $J(1'a,2') = 3,7$ ,  $J(\text{gem}) = 13,8$  (H-1'a); 3,85 m, 1H (H-2'); 3,77 d, 1H,  $J(\text{P,CH}) = 8,3$  (PCH<sub>a</sub>); 3,75 d, 1H,  $J(\text{P,CH}) = 8,4$  (PCH<sub>b</sub>); 3,64 dd, 1H,  $J(1'b,2') = 9,5$  (H-1'b); 3,23 dd, 1H,  $J(3'a,2') = 3,5$ ,  $J(\text{gem}) = 10,6$  (H-3'a); 2,92 dd, 1H,  $J(3'b,2') = 4,4$  (H-3'b); 1,22 d, 3H, 1,21 d, 3H, 1,20 d, 3H y 1,17 d, 3H,  $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,1$  (CH<sub>3</sub>).
- 25 - <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 166,615 (C-4); 159,665 (C-6); 154,09 (C-2); 143,65, 3C, 128,47, 6C, 128,10, 6C, 127,13, 3C y 86,36 (trilito); 77,87 d,  $J(\text{P,C}) = 12,2$  (C-2'); 70,40 d y 70,38 d,  $J(\text{P,C}) = 6,4$  (P-O-C); 63,97 d,  $J(\text{P,C}) = 165,05$  (P-C); 63,31 (C-3'); 48,04 (C-1'); 23,93 d, 23,91 d, 23,89 d y 23,77 d,  $J(\text{P,C}) = 3,9$  (CH<sub>3</sub>).
- 30 • *Método B.* Se añadió hidruro de sodio (suspensión al 60% en aceite mineral, 100 mg, 2,5 mmoles) a una suspensión de 1 (830 mg, 2,0 mmoles de dioxano (5 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se añadió bromometilfosfonato de diisopropilo (674 mg, 2,6 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla completa se aplicó sobre una columna de gel de sílice (150 ml) y se cromatografió en el
- 35

sistema de cloroformo - metanol - trietilamina (100:5:1). Después de la elución de los sub-productos cromatográficamente rápidos, el fosfonato deseado 2 ( $R_f$  0,35) se obtuvo con un rendimiento de 500 mg (41%), seguido del compuesto de partida regenerado (250 mg, 30%).

5 (c) Síntesis de *(S)*-1-[3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (3)

Una suspensión del éster diisopropílico anterior 2 (2,27 g, 6,23 mmoles) en acetonitrilo seco (60 ml) se agitó con bromotrimetilsilano (4,75 ml, 35 mmoles) en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla se hizo precipitar a 30°C y el residuo se coevaporó con acetonitrilo (2 x 100 ml). Se añadió una solución 0,2 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (100 ml), la solución resultante (pH  $\approx$  7,5) se dejó aparte durante 10 minutos y a continuación se añadió Dowex 50 (forma de piridinio) a la reacción neutra (pH 7,0). El sólido se retiró por filtración, un filtrado se concentró a aproximadamente 25 ml y se aplicó sobre una columna de Dowex 1 (forma de acetato, 150 ml). La elución se realizó con agua (1 l), y a continuación con un gradiente lineal de ácido acético (0,5-1 M, 500 ml) y finalmente, el producto puro 3 se eluyó con ácido fórmico 1 M. Las fracciones que contenían el producto se hicieron precipitar, el residuo se coevaporó con agua hasta una completa retirada del ácido fórmico (4 x 50 ml) y el residuo se cristalizó a partir de agua. Los cristales se recogieron por aspiración, se lavaron con etanol y éter y se secaron al vacío. Rendimiento 930 mg de 3 (53%),

- 20 - punto de fusión 175-178°C,  
 -  $[\alpha]_D -43,7$  ( $c$  0,308, H<sub>2</sub>O).  
 - UV,  $\lambda_{max}$ : 245 nm (pH 7), 254 nm (pH 2).  
 - Para C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P.H<sub>2</sub>O (298,2) calculado: 28,20% C, 5,07% H, 18,79% N, 10,39% P; encontrado: 28,29% C, 4,76% H, 18,55% N, 10,36% P.
- 25 - FAB MS, m/z (%): 281,1 (4) [M+H]. HR MS (FAB): Para C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P [M+H] calculado: 281,0651; encontrado: 281,0657.  
 - <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): 8,30 s (H-8); 4,13 dd, 1H,  $J(1'a,2') = 3,3$ ,  $J(gem) = 14,3$  (H-1'a); 3,835 dd, 1H,  $J(1'b,2') = 8,1$  (H-1'b); 3,85 dd, 1H,  $J(3'a,2') = 3,7$ ,  $J(gem) = 12,6$  (H-3'a); 3,76 dd, 1H,  $J(P,CH) = 9,3$ ,  $J(gem) = 12,9$  (PCH<sub>a</sub>); 3,74 m, 1H (H-2'); 3,62 dd,  
 30 1H,  $J(3'b,2') = 4,2$  (H-3'b); 3,56 dd, 1H,  $J(P,CH) = 9,8$ ,  $J(gem) = 12,9$  (PCH<sub>b</sub>).  
 - <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O): 166,20 (C-4); 160,77 (C-6); 156,64 (C-2); 79,18 d,  $J(P,C) = 12,2$  (C-2'); 66,36 d,  $J(P,C) = 156,25$  (P-C); 48,24 (C-1').

EJEMPLO 2: Síntesis de *(S)*-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (3) con el uso de HPMP-synthon (8).

35 (a) Síntesis de *(R)*-1-O-Bencil-3-O-tritilglicerol (4)

Se añadió cloruro de tritilo (56 g) por porciones a una solución de 1-O-bencil-(R)-glicerol (36,4 g, 0,2 moles) y 4-dietilaminopiridina (1 g) en piridina (300 ml) con agitación y se enfrió con hielo. Después de 20 h de agitación se añadió metanol (50 ml), la mezcla se agitó durante 30 minutos y se concentró al vacío a la mitad del volumen original. Se añadió

acetato de etilo (500 ml) y la mezcla se extrajo con agua (3 x 250 ml). La capa orgánica se secó brevemente con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó al vacío. El residuo 4 se codestiló con tolueno (porciones de 200 ml) para retirar la piridina residual y se usó para síntesis adicional.

5 (b) Síntesis de *(R)*-1-*O*-Bencil-2-(diisopropilfosforilmetil)-3-*O*-tritolglicerol (5).

- *Método A.* se añadió hidruro de sodio (3,0 g, 128 mmoles) a la solución de 4 (49,2 g, 0,112 moles) en tetrahidrofurano seco (120 ml) y la suspensión se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se llevó a reflujo durante 1 h. La mezcla se enfrió y se añadió tolilsulfoniloximetilfosfonato de diisopropilo (45 g) en una porción. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante tres días y se neutralizó mediante ácido acético. Se añadió metanol (100 ml) y los disolventes se hicieron precipitar al vacío. El residuo en acetato de etilo (800 ml) se lavó con agua (3 x 200 ml), se secó y se evaporó al vacío. El residuo cromatográficamente puro 5 (70 g) se usó para etapas adicionales.
- 15 • *Método B.* se añadió hidruro de sodio (1,8 g, 75 mmoles) a la solución de 4 (20 g, 47 mmoles) en dimetilformamida seca (200 ml). Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente se añadió bromometilfosfonato de diisopropilo (16 g, 62 mmoles) a la mezcla de reacción que se calentó a continuación durante 90 minutos a 60°C. El resto del tratamiento era idéntico al descrito en el Método A. El rendimiento de 5 era de 31 g.

20 (c) Síntesis de *(R)*-1-*O*-Bencil-2-(diisopropilfosforilmetil)glicerol (6).

El compuesto 5 (31 g) se agitó 4 h con una mezcla de dioxano (250 ml) y HCl 1 M (250 ml) hasta que el material de partida desaparecía (aproximadamente 3 h). Se añadió acetato de etilo (500 ml), y la fase acuosa después de la extracción se lavó dos veces más con acetato de etilo (250 ml cada vez). Los extractos combinados se lavaron con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 300 ml), se secaron con MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron al vacío para dar el material cromatográficamente puro 6 que se usó directamente para etapas adicionales.

25 (d) Síntesis de *p*-tolilsulfonato de (2*S*)-2-[(Diisopropilfosforil)metoxi]-3-benciloxi-propilo (7).

Se añadió cloruro de *p*-tolilsulfonilo (38,8 g, 204 mmoles) a una solución de compuesto 6 (31 g) en piridina seca (200 ml) enfriada a 0°C. Después de 1 h de agitación a 0°C la mezcla se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 24 h adicionales y se evaporó al vacío. El residuo similar a un jarabe se cromatografió en una columna de gel de sílice (1000 ml) en el sistema de tolueno - acetato de etilo (5:1). Después de la retirada de los restos de cloruro de *p*-tolilsulfonilo ( $R_F$  0,9) el compuesto 7 se eluyó con el sistema de tolueno - acetato de etilo (1:2), ( $R_F$  0,5). Las fracciones que contienen el producto se evaporaron para dar 18,7 g (77%) de 7 en forma de un jarabe incoloro.

- <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 7,79 d, 2H, 7,47 d, 2H y 7,35-7,20 m, 5H (H-arom.); 4,56 m, 2H (P-OCH); 4,46 m, 1H (OCH); 4,17 dd, 1H,  $J(\text{CH}_a, \text{CH}) = 3,2$ ,  $J(\text{gem}) = 10,6$  y 4,03 dd, 1H,  $J(\text{CH}_b, \text{CH}) = 5,4$  (OCH<sub>2</sub>); 3,83 dd, 1H,  $J(\text{P}, \text{CH}_a) = 9,1$ ,  $J(\text{gem}) = 13,8$  (PCH<sub>a</sub>);

3,77 dd, 1H,  $J(\text{P}, \text{CH}_b) = 8,8$  ( $\text{PCH}_b$ ); 3,50 dd, 1H,  $J(\text{CH}_a, \text{CH}) = 5,1$ ,  $J(\text{gem}) = 10,4$  y 3,47 dd, 1H,  $J(\text{CH}_b, \text{CH}) = 5,4$  ( $\text{OCH}_2$ ); 2,40 s, 3H ( $\text{CH}_3$ ); 1,22 d, 3H, 1,21 d, 3H, 1,19 d, 3H y 1,185 d, 3H,  $J(\text{CH}_3, \text{CH}) = 6,1$  ( $\text{CH}_3$ ).

- 5 -  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 145,17 (tosilo); 138,175 (bencilo); 132,18 y 130,34, 2C (tosilo); 128,32, 2C, 127,82, 2C y 127,67 (bencilo); 127,53, 2C (tosilo); 77,42 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 12,2$  ( $\text{OCH}$ ); 72,48 ( $\text{OCH}_2$ ); 70,43 d y 70,41 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 6,3$  ( $\text{P-OCH}$ ); 69,22 y 67,89 ( $\text{OCH}_2$ ); 63,94 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 165,0$  ( $\text{P-C}$ ); 23,96, 2C,  $J(\text{P}, \text{C}) = 3,9$  ( $\text{CH}_3$ ); 23,79 d, 2 C,  $J(\text{P}, \text{C}) = 4,4$  ( $\text{CH}_3$ ); 21,25 ( $\text{CH}_3$ ).

(e) Síntesis de *p*-tolilsulfonato de (2*S*)-2-[(Diisopropilfosforil)metoxi]-3-hidroxi-propilo (8)

- 10 Se añadió paladio sobre carbono al 10% (1,05 g) a una solución de 7 (11,5 g, 22,4 mmoles) en metanol (150 ml) y la mezcla se hidrogenó a temperatura ambiente a presión atmosférica durante 24 h. El sólido se retiró por filtración a través de Celite, se lavó con metanol (2 x 100 ml) y los filtrados combinados se combinaron al vacío. El residuo con  
15 textura de jarabe se cromatografió en una columna de gel de sílice (400 ml) en acetato de etilo. Las fracciones que contienen el producto se evaporaron para dar 7,7 g (81%) del compuesto 8 en forma de un jarabe incoloro,

- $[\alpha]_D +21,4$  ( $c$  0,337,  $\text{CHCl}_3$ ).
- Para  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{SP}$  (424,5) calculado: 48,11% C, 6,89% H, 7,55% S, 7,30% P; encontrado: 47,71% C, 6,99% H, 7,80% S, 7,48% P.
- 20 - FAB MS,  $m/z$  (%): 425 (39)  $[\text{M}+\text{H}]$ .
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 7,79 d, 2H y 7,49 d, 2H (H-arom.); 4,82 t, 1H,  $J(\text{OH}, \text{CH}_2) = 5,5$  (OH); 4,56 m, 2H ( $\text{P-OCH}$ ); 4,15 dd, 1H,  $J(\text{CH}_2, \text{CH}) = 3,1$ ,  $J(\text{gem}) = 10,6$  y 3,98 dd, 1H,  $J(\text{CH}_2, \text{CH}) = 6,0$ ,  $J(\text{gem}) = 10,6$  ( $\text{OCH}_2$ ); 3,81 dd, 1H y 3,71 dd, 1H,  $J(\text{P}, \text{CH}) = 8,8$ ,  $J(\text{gem}) = 13,9$  ( $\text{PCH}_2$ ); 3,62 m, 1H ( $\text{OCH}$ ); 3,45 dt, 1H,  $J(\text{CH}_2, \text{OH}) = J(\text{CH}_2, \text{CH}) = 5,0$ ,  $J(\text{gem}) = 11,2$  y 3,37 dt, 1H,  $J(\text{CH}_2, \text{OH}) = J(\text{CH}_2, \text{CH}) = 6,0$ ,  $J(\text{gem}) = 11,2$  ( $\text{OCH}_2$ ); 2,42 s, 3H ( $\text{CH}_3$ ); 1,225 d, 6H, 1,205 d, 3H y 1,20 d, 3H,  $J(\text{CH}_3, \text{CH}) = 6,2$  ( $\text{CH}_3$ ).
- 25 -  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 145,12, 132,32, 130,34, 2C y 127,80, 2C (arom.); 79,41 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 11,2$  ( $\text{OCH}$ ); 70,41 d y 70,39 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 6,3$  ( $\text{P-OCH}$ ); 69,73 y 59,13 ( $\text{OCH}_2$ ); 23,97 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 4,4$  y 23,81 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 4,4$  ( $\text{CH}_3$ ); 21,26 ( $\text{CH}_3$ ).
- 30

(f) Síntesis de diisopropil (S)-1-[3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (9)

- 35 Una mezcla de una sal sódica de 5-azacitosina (1,34 g, 10 mmoles) y el tosionato synthon 8 (4,2 g, 9,9 mmoles) en dimetilformamida (30 ml) se calentó a 90°C con exclusión de humedad durante 5 h. Una porción adicional del tosionato (1,2 g, 2,8 mmoles) se añadió junto con una cantidad catalítica de carbonato de cesio (10 mg) y el calentamiento continuó a 120°C durante 2 h. Durante ese tiempo, se produjo una disolución completa. La mezcla de reacción se hizo precipitar, el residuo se coevaporó con tolueno (2 x 50 ml) y xileno (50 ml) y se aplicó sobre una columna de gel de sílice (400 ml) en el sistema de cloroformo - metanol (95:5). La columna se eluyó en primer lugar con este sistema, después de la elución de

aproximadamente. 1,5 l de volumen, la polaridad del sistema se aumentó a la proporción de cloroformo - metanol (85:15). La elución produjo el producto de reacción principal con  $R_F$  0,33 (sistema de cloroformo - metanol 85:15). Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se coevaporaron con etanol absoluto. El rendimiento del éster diisopropílico 9 era de 2,4 g (62%): aceite incoloro que cristalizaba en reposo,

- 5
- $[\alpha]_D$  -43,0 ( $c$  0,49, etanol).
  - Para  $C_{13}H_{25}N_4O_6P \cdot \frac{1}{2} C_2H_5OH$  (387,4) calculado: 43,40% C, 7,29% H, 14,46% N, 8,00% P; encontrado: 43,58% C, 6,99% H, 14,45% N, 8,22% P.
  - FAB MS,  $m/z$  (%): 365 (100) [M+H], 281 (70) [ácido fosfónico libre + H], 113 (84) [5-azacitosina + H].
  - $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ): 8,06 s, 1H (H-6); 7,38 s ancho, 2H (NH<sub>2</sub>); 4,83 t, 1H,  $J(OH,3')$  = 5,5 (OH); 4,54 m, 2H (P-OCH); 3,96 dd, 1H,  $J(1'a, 2')$  = 2,4,  $J(gem)$  = 14,1 (H-1'a); 3,89 dd, 1H,  $J(1'b,2')$  = 8,1,  $J(gem)$  = 14,1 (H-1'b); 3,70 dd, 1H,  $J(P,CH_a)$  = 9,4,  $J(gem)$  = 14,0 (PCH<sub>a</sub>); 3,63 m, 1H (H-2'); 3,59 dd, 1H  $J(P,CH_b)$  = 8,2,  $J(gem)$  = 14,0 (PCH<sub>b</sub>); 3,51 tt, 1H,  $J(3'a,OH)$  =  $J(3'a,2')$  = 4,8,  $J(gem)$  = 12,0 (H-3'a); 3,45 ddd, 1H,  $J(3'b,2')$  = 4,4,  $J(3'b,OH)$  = 5,8,  $J(gem)$  = 12,0 (H-3'b); 1,23 d, 3H, 1,22 d, 3H, 1,21 d, 3H y 1,19 d, 3H,  $J(CH_3,CH)$  = 6,2.
  - $^{13}C$  RMN acoplado a protones (DMSO- $d_6$ ): 166,63 d,  $J(C-4,H-6)$  = 12,7 (C-4); 159,785 dt,  $^1J$  = 204,1,  $J(C-6,H-1'a)$  =  $J(C-6,H-1'b)$  = 3,9 (C-6); 154,29 dt,  $J(C-2,H-6)$  = 4,9,  $J(C-2,H-1'a)$  =  $J(C-2,H-1'b)$  = 2,9 (C-2); 79,28 d,  $J(P,C)$  = 10,7 (C-2'); 70,33 d, 2 C,  $J(P,C)$  = 6,4 (P-O-C); 63,61 d,  $J(P,C)$  = 165,0 (P-C); 60,34 (C-3'); 47,70 (C-1'); 23,95 d y 23,91 d,  $J(P,C)$  = 4,9 (CH<sub>3</sub>); 23,87 d y 23,78 d,  $J(P,C)$  = 4,4 (CH<sub>3</sub>).

10

15

20

(g) *Síntesis de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (3)*

Se añadió bromotrimetilsilano (4,7 ml, 35 mmoles) a una solución de 9 (1,34 g, 3,13 mmoles) en acetonitrilo (30 ml) y la mezcla se apartó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla se evaporó a 30°C, el residuo se coevaporó con acetonitrilo (2 x 30 ml) y se añadió metanol acuoso al 90% (50 ml). La solución se neutralizó con hidrogenocarbonato de trietilamonio 1 M a pH 7 y se evaporó. El residuo se dividió entre agua (100 ml) y éter (100 ml), una capa acuosa se evaporó a un volumen de 5 ml y se aplicó sobre una columna de Dowex 1 (forma de AcO<sup>-</sup>, 100 ml). La elución se realizó con agua (500 ml), y a continuación con un gradiente lineal de ácido acético (0,1-1 M, 1,5 l) y finalmente, el producto se eluyó con ácido fórmico 1 M. Las fracciones que absorbían UV se recogieron al vacío y el residuo se coevaporó con agua (4 x 20 ml). El residuo se cristalizó a partir de agua. Rendimiento 350 mg (37%) de compuesto 3, idéntico al producto descrito en el Ejemplo 1. Punto de fusión 175-178°C,

35

EJEMPLO 3 - equilibrio con 3-formil-2-[(2S)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]carbamoil]guanidina sódica (3a).

Una solución de compuesto 3 (100 mg, 0,34 mmoles) en hidrogenocarbonato de trietilamonio 0,25 M (5 ml) se incubó a 37°C durante 72 h y a continuación 12 h a 80°C. La

evolución de la reacción se supervisó mediante la medición del descenso del máximo de absorción en el espectro de UV a  $\lambda_{\max}$  245 nm. Para cada medición una muestra de 10  $\mu$ l de la mezcla de reacción se diluyó con agua para un volumen global de 3 ml y se determinó el valor de absorbancia a 245 nm. El equilibrio se alcanzó cuando ya no se producía más descenso de la absorbancia. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, se coevaporó con agua (5 x 3 ml) y a continuación con metanol (2 x 3 ml). El residuo en agua (3 ml) se aplicó sobre una columna de Dowex 50 (forma de Na<sup>+</sup>, 20 ml) y la columna se eluyó con agua. El eluato que absorbe UV se evaporó y liofilizó para dar 105 mg (92%) de una sal sódica de 3a en forma de un material amorfo incoloro.

- 10 - <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): 8,46 s, 1H (CH=O). <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O): 171,04 (CH=O); 155,29 y 154,64 (C-2, C-4); 80,33 d, *J*(C,P) = 10,7 (C-2'); 66,72 d, *J*(C,P) = 153,8 (PCH<sub>2</sub>); 60,76 (C-3'); 39,96 (C-1').

EJEMPLO 4 - descomposición en 2-[[[(2S)-3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]carbamoil]guanidina (10)

- 15 Una solución del compuesto 3 (200 mg, 0,67 mmoles) en amoníaco acuoso 1 M (2,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 48 h, y a continuación se evaporó al vacío y se coevaporó con agua (5 ml). El producto impuro se purificó mediante elución en HPLC de fase inversa con agua. El producto deseado (no absorbente en UV) se detectó mediante TLC sobre placas de gel de sílice en el sistema isopropanol - NH<sub>4</sub>OH al 25% - agua 7:1:2  
20 seguido de pulverización de la placa con una mezcla de NaOH al 5% - K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] al 5% - Na[Fe(CN)<sub>5</sub>NO] al 5% (1:1:1) dando puntos naranja de producto. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron y se secaron al vacío. Rendimiento 150 mg (83%) de  
10, espuma blanca,

- [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +31,2 (c 0,226, H<sub>2</sub>O).
- 25 - FAB MS, *m/z* (%): 271 (100) [M+H]. HR MS (FAB): Para C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P [M+H] calculado: 271,0807; encontrado: 271,0808.
- <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): 3,75 dd, 1H, *J* = 3,2 y 11,2 (H-3'a); 3,73 dd, 1H, *J* = 9,0 y 12,7 (PCH<sub>3</sub>); 3,63 dd, 1H, *J* = 9,4 y 12,7 (PCH<sub>b</sub>); 3,61 m, 1H (H-2'); 3,59 dd, 1H, *J* = 5,1 y 11,2 (H-3'b); 3,47 dd, 1H, *J* = 3,2 y 14,3 (H-1'a); 3,29 dd, 1H, *J* = 7,3 y 14,3 (H-1'b).
- 30 - <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O): 155,25 y 154,60 (C-2, C-4); 80,25 d, *J* (P,C) = 11,2 (C-2'); 66,78 d, *J*(P,C) = 152,8 (PCH<sub>2</sub>); 60,68 (C-3'); 40,01 (C-1').

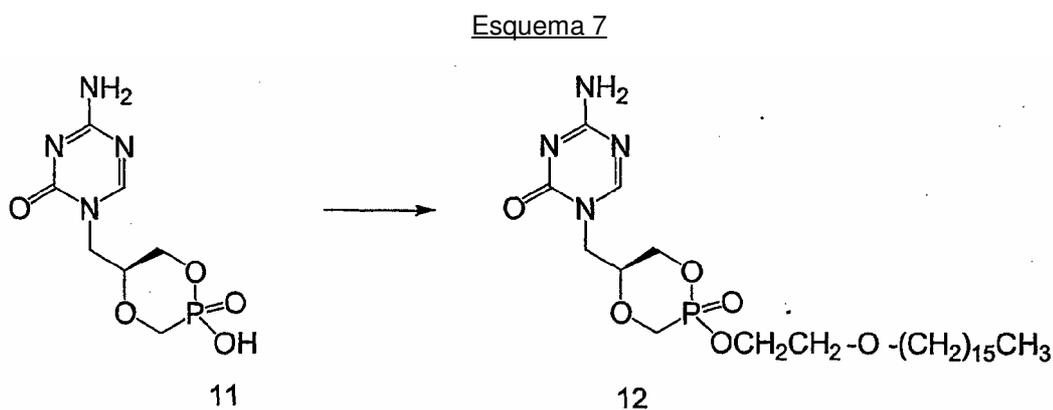
EJEMPLO 5: Síntesis de 1-[[[(5S)-2-Hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina ("HPMP-5-azacitosina cíclica" - "HPMP-5-azaCc" - 11)

- 35 Una suspensión de HPMP-5-azacitosina de partida (200 mg, 0,71 mmoles), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 155 mg, 0,75 mmoles) y N,N'-diciclohexil-4-morfolincarboxamidina (220 mg, 0,75 mmoles) en DMF (5 ml) se agitó a 85°C durante 3 h, y a continuación se añadieron porciones adicionales de DCC (20 mg) y N,N'-diciclohexil-4-morfolincarboxamidina (20 mg) y el calentamiento continuó durante 2 h (hasta que se completó la conversión). La evolución de la reacción se supervisó mediante TLC en el

sistema de 2-propanol - amoníaco acuoso al 25% - agua (7:1:2),  $R_F$  del producto: 0,45. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua (5 ml) y se aplicó sobre una columna de Dowex 1 (forma de acetato, 50 ml). La elución se realizó con agua (500 ml), seguida de ácido acético 1 M (200 ml) y finalmente, el producto se eluyó con ácido fórmico 1 M. Una fracción que contenía el producto se evaporó, el residuo se coevaporó con agua (4 x 30 ml). El producto impuro se purificó finalmente mediante HPLC de fase inversa: columna preparativa 21 x 250 mm (Luna Phenomenex® C-18), elución isocrática con metanol acuoso al 2% (12 ml/minuto), tiempo de retención: 10 minutos. La fracción que contenía el producto se evaporó y se secó al vacío. Rendimiento: 180 mg (97%), sólido blanco.

- $[\alpha]_D -46,6$  ( $c$  0,172,  $H_2O$ ).
- ESI MS: 263  $[M+H]^+$  (70), 525  $[2M+H]^+$  (100).
- HR MS (Q TOF): Para  $C_7H_{12}N_4O_5P$   $[M+H]$  calculado: 263,0545; encontrado: 263,0543.
- $^1H$  RMN ( $D_2O$ ): 8,46 s, 1H (H-6); 4,25 m, 2H (H-3'); 4,18 dd, 1H,  $J(1'a,2') = 2,9$ ,  $J(gem) = 14,6$  (H-1'a); 4,02 m, 1H (H-2'); 3,97 dd, 1H,  $J(P,CH_a) = 9,3$ ,  $J(gem) = 14,2$  ( $PCH_a$ ); 3,86 dd, 1H,  $J(1'b,2') = 8,3$  (H-1'b); 3,83 dd, 1H,  $J(P,CH_b) = 1,7$  ( $PCH_b$ ).
- $^{13}C$  RMN ( $D_2O$ ): 162,30 (C-6); 159,52 (C-4); 147,41 (C-2); 72,83 d,  $J(P,C) = 4,4$  (C-Z); 69,48 d,  $J(P,C) = 6,8$  (C-3'); 65,12 d,  $J(P,C) = 143,6$  (P-C); 46,57 (C-1').

EJEMPLO 6 - síntesis de éster hexadeciloxietílico de 1-[[5(S)-2-Hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina (12)



Una suspensión de 1-[[5(S)-2-Hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina de partida (es decir HPMP-5-azacitosina cíclica, 230 mg, 0,87 mmoles), hexadeciloxietanol (260 mg, 0,9 mmoles), DCC (300 mg, 1,5 mmoles) y dimetilaminopiridina (5 mg) en DMF seco (5 ml) se agitó a 110°C durante 20 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua (10 ml) y se aplicó sobre una columna de Dowex 1 (forma de  $AcO^-$ , 25 ml). La columna se eluyó con acetona (200 ml), seguida de agua (200 ml). Los eluatos que absorbían UV combinados se evaporaron y el residuo se cromatografió

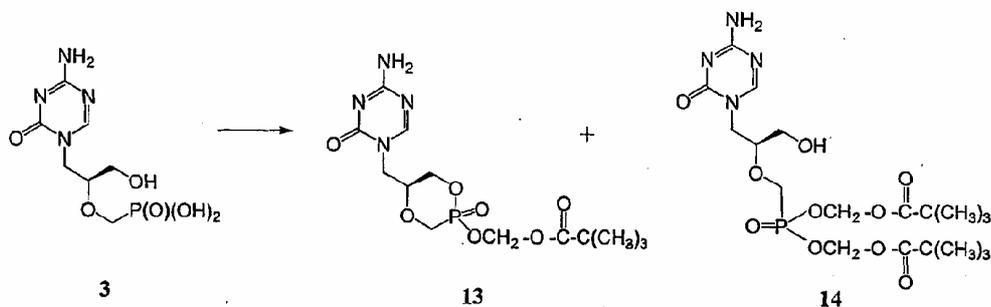
en una placa de gel de sílice preparativa (12 x 25 cm) en el sistema de cloroformo - metanol (85:15). Rendimiento: 30 mg (6,5%), sólido blanco. El producto se obtuvo en forma de una mezcla de dos diastereoisómeros (proporción 3:2).

- 5
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero A (componente principal): 7,93 s, 1H (H-6); 6,82 s ancho, 1H y 5,80 s ancho, 1H (NH); 4,42-3,37 m, 13H (H-T, H-2', H-3',  $\text{PCH}_2$ ,  $\text{OCH}_2$ ); 1,96 m, 4H, 1,54 m, 2H y 1,25 m, 22H ( $\text{CH}_2$ ); 0,88 t, 3H,  $J(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 7,1$  ( $\text{CH}_3$ ). Diastereoisómero B (secundario): 7,96 s, 1H (H-6); 6,69 s ancho, 1H y 5,87 s ancho, 1H (NH); otras señales idénticas.
  - 10 -  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero A (componente principal): 166,40 (C-4); 159,10 (C-6); 154,11 (C-2); 73,27 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 5,4$  (C-2'); 71,64 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 8,3$  (C-3'); 71,24, 66,31 y 64,63 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 7,3$  ( $\text{OCH}_2$ ); 63,57 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 145,0$  (P-C); 46,73 (C-T); 31,95, 30,78, 30,74, 29,64, 8C, 29,33, 26,16 y 22,66 ( $\text{CH}_2$ ); 14,10 ( $\text{CH}_3$ ). Diastereoisómero B (secundario): 166,40 (C-4); 159,10 (C-6); 154,04 (C-2); 72,96 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 3,9$  (C-2'); 71,22 ( $\text{OCH}_2$ ); 70,33 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 6,8$  (C-3'); 66,14 ( $\text{OCH}_2$ ); 63,57 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 145,0$  (P-C); 63,40 d,  $J(\text{P}, \text{C}) = 5,9$  ( $\text{OCH}_2$ ); 46,89 (C-T); 31,89, 30,88, 30,84, 29,64, 8C, 29,60, 26,11 y 22,66 ( $\text{CH}_2$ ); 14,10 ( $\text{CH}_3$ ).
  - 15

La HPMP-5-azacitosina cíclica de partida que no reaccionó puede recuperarse de Dowex 1. La columna se eluyó en primer lugar con ácido acético 1 M (250 ml) para retirar algunas impurezas y productos de degradación. El fosfonato cíclico puro se eluyó con ácido fórmico 1 M, las fracciones apropiadas se evaporaron, se coevaporaron con agua (4 x 30 ml) y con etanol absoluto (50 ml) y se secaron al vacío para dar 150 mg (65%) de HPMP-5-azacitosina cíclica.

25 EJEMPLO 7 - síntesis de éster pivaloiloximetilico de 1-[[[(5S)-2-Hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina (POM-HPMP-azaC cíclica - 13) y de éster Bis(pivaloiloximetilico) de 1-(S)-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (Bis(POM)-HPMP-azaC - 14).

Esquema 8



POM-HPMP-azaC cíclica

BiS(POM)-HPMP-azaC

30 Una suspensión de 1-(S)-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina 3 de partida (100 mg; 0,36 mmoles) en DMF seco (4 ml) se evaporó a  $\frac{1}{2}$  de su volumen original. Se añadieron N,N'-diciclohexil-4-morfolincarboxamida (200 mg, 0,68 mmoles) seguida de

pivalato de clorometilo (275 mg; 1,83 mmoles) y la mezcla se agitó durante 72 h a 25°C. La mezcla se evaporó, el residuo se coevaporó con xileno (4 ml) y se cromatografió en una placa de gel de sílice de TLC preparativa (40 x 17 cm) en el sistema de acetato de etilo - acetona - etanol - agua (15:3:4:3). Una banda apropiada de gel de sílice ( $R_F$  0,75) se separó, se eluyó con metanol y se filtró a través de una almohadilla de Celite seguida de filtración a través de un filtro de membrana de nylon (Whatman® 0,2  $\mu$ m). El filtrado se evaporó para dar 38 mg de una mezcla de ésteres de POM en forma de una espuma blanca.

- FAB MS,  $m/z$  (%): 509 (0,5) [M+H de bis(POM)-HPMP-azaC], 377 (1) [M+H de POM-HPMP-azaC cíclica], 294,2 (80) [M-pivaloilo+2H, fosfonato cíclico], 86 (10) [pivaloilo].
- HR MS (FAB, POM-HPMP-azaC cíclica): Para  $C_{13}H_{22}N_4O_7P$  [M+H] calculado: 377,1226; encontrado: 377,1218. HR MS (FAB, bis(POM)-HPMP-azaC): Para  $C_{19}H_{34}N_4O_{10}P$  [M+H] calculado: 509,2012; encontrado: 509,2004.

#### 15 EJEMPLO 8 - métodos para la determinación *in vitro* de la actividad antiviral

##### *Células*

- Fibroblastos de pulmón embrionario humano (HEL) (ATCC CCL137) o E<sub>6</sub>SM (fibroblastos diploides humanos) se usaron a pocos pases (de 10 a 17). Se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero fetal de ternero inactivado por calor al 10% (FCS), L-glutamina al 1% y bicarbonato de sodio al 0,3%.
- Se usaron células HeLa. Se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero fetal de ternero inactivado por calor al 10% (FCS), L-glutamina al 1% y bicarbonato de sodio al 0,3%.
- Se usaron células Vero. Se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero fetal de ternero inactivado por calor al 10% (FCS), L-glutamina al 1% y bicarbonato de sodio al 0,3%.
- Queratinocitos primarios humanos (PHK) se aislaron de prepucios de neonatos. Los fragmentos de tejido se incubaron con tripsina-EDTA durante 1 h a 37°C. Las células epiteliales se separaron y se cultivaron con medio para queratinocitos libre de suero (Gibco, Invitrogen Corporation, Reino Unido) suplementado con 0,5  $\mu$ g/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, suero fetal de ternero al 10%, 2 mmoles/litro de L-glutamina, 10 mmoles/litro de HEPES, 1 mmoles/litro de piruvato de sodio,  $10^{-10}$  moles/litro de toxina del cólera, 5  $\mu$ g/ml de insulina, 5  $\mu$ g/ml de transferrina y  $15 \times 10^{-4}$  mg/ml de 3,3',5'-triyodo-L-tironina.
- Queratinocitos primarios de cordero (PLK) se aislaron del tejido del prepucio de corderos de 3 a 12 meses de edad. Se cortaron finas láminas de tejido del prepucio en pequeños pedazos y a continuación se incubaron con tripsina-EDTA (Gibco,

- Invitrogen Corporation, Reino Unido) durante 30 minutos a 37°C. Las células tripsinizadas se filtraron y a continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm. El sedimento celular se resuspendió en el medio de cultivo (una mezcla de F12 de Ham y Medio Eagle modificado por Dulbecco (1:4), suplementado con
- 5 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, suero fetal de ternero al 10%, 2 mmoles/litro de L-glutamina, 10 mmoles/litro de HEPES, 1 mmol/litro de piruvato de sodio, 10-10 moles/litro de toxina del cólera, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, y  $15 \times 10^{-4}$  mg/ml de 3,3',5'-triyodo-L-tironina.
- 10 • Células UC1-B y BS-C-1: células UC1-B (fibroblastos embrionarios murinos, ATCC 6465-CRL) y células BS-C-1 (línea celular de riñón de mono verde africano, ATCC CCL-26) se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero fetal de ternero inactivado por calor al 10% (FCS), L-glutamina al 1% y bicarbonato de sodio al 0,3%.
  - 15 • Queratinocitos primarios humanos: Queratinocitos primarios humanos (PHK) se aislaron de prepucios de neonatos. Los fragmentos de tejido se incubaron con tripsina-EDTA durante 1 h a 37°C. Las células epiteliales se separaron y se cultivaron con Medio de queratinocitos libre de suero (Gibco, Invitrogen Corporation, Reino Unido) suplementado con 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, suero fetal de ternero al 10%, 2 mmoles/litro de L-glutamina, 10 mmoles/litro de HEPES, 1 mmol/litro de piruvato de sodio, 10-10
  - 20 moles/litro de toxina del cólera, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, y  $15 \times 10^{-4}$  mg/ml de 3,3',5'-triyodo-L-tironina.
  - 25 • También se usaron otros tipos celulares en los experimentos tal como se describe en este documento, concretamente T-linfoblastos humanos HSB-2 y células MOLT-3.

#### *Virus*

- 30 • Se usaron las cepas de referencia de citomegalovirus humano (CMVH) AD-169 (ATCC VR538) y Davis (ATCC VR 807). Las estirpes de virus se prepararon como se ha descrito anteriormente. las estirpes de virus se prepararon en células HEL. Cuando se había obtenido el 100% del efecto citopatógeno, las células y el sobrenadante se congelaron. Después de un ciclo de congelación/descongelación, los restos celulares se retiraron mediante centrifugado y el sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80°C.
- 35 • Se usaron las cepas de referencia del virus de la varicela-zóster (VVZ) Oka (ATCC VR-795) y YS así como las cepas deficientes en timidina quinasa (TK) YS-R y 07-1. Las estirpes de virus se prepararon como se ha descrito anteriormente (Andrei G. et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1995, 14 (4), 318-329). Las estirpes de virus se prepararon en células HEL. Cuando se había obtenido el 70% del efecto

citopatógeno, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en medio que contenía DMSO al 10% y se almacenaron en alícuotas a -80°C.

- Se usaron las cepas de referencia del virus del herpes simple (VHS) KOS (ATCC VR-1493), F (ATCC VR-733), McIntyre (ATCC VR-539), G (ATCC VR-734), 196 y Lyons así como la cepa deficiente en timidina quinasa (TK) KOS ACV<sup>f</sup>. Las estirpes de virus se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las estirpes de virus se prepararon en células E<sub>6</sub>SM. Cuando se había obtenido el 100% del efecto citopatógeno, las células y el sobrenadante se congelaron. Después de un ciclo de congelación/descongelación, los restos celulares se retiraron mediante centrifugado y el sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80°C.
- También se usaron las cepas de virus del herpes humano 6, concretamente VHH-6A (cepa GS) y VHH-6B (cepa Z29).
- el adenovirus humano de tipo 2: Ad2 en forma de aislado clínico se usó en células HEL.
- Para los ortopoxvirus, se usaron las cepas de virus de la variolovacuna Lederle corioalantoico (ATCC CCL-137), Western Reserve (ATCC VR-119), Lister (VR-1549, Elstree), cepa Copenhagen y la cepa del virus de la viruela aviar Brighton (ATCC VR-302). Para los parapoxvirus, se usó la cepa del virus del ectima contagioso NZ 2 (ATCC VR-1548). Las estirpes de virus se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las estirpes de virus se prepararon en células HEL. Cuando se había obtenido el 100% del efecto citopatógeno, las células y el sobrenadante se congelaron. Después de un ciclo de congelación/descongelación, los restos celulares se retiraron mediante centrifugado y el sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80°C. También se usaron cepas de virus recombinantes resistentes contra HPMPC para ensayar la actividad de los compuestos de la presente invención. Estas cepas de virus recombinantes se prepararon como se conoce en la técnica.
- el virus de la estomatitis vesicular, el virus de Coxsackie B4, el virus de la paragripe-3, el virus respiratorio sincitial, Reovirus-1, virus de Sindbis y virus de Punta Toro se tomaron como representativos para las siguientes respectivas familias de virus: rabdovirus, enterovirus, paramixovirus (neumovirus/VRS), reovirus, togavirus y bunyavirus. Las estirpes de virus se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las estirpes de virus se prepararon en la línea celular apropiada para cada virus. Cuando se había obtenido el 100% del efecto citopatógeno, las células y el sobrenadante se congelaron. Después de un ciclo de congelación/descongelación, los restos celulares se retiraron mediante centrifugado y el sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80°C.
- Poliomavirus: se usaron cuatro cepas de virus del polioma murino [MN/RDE Toronto, PTA, 2PTA2, y LID-1] tres cepas de virus del polioma de simio [SV40 (un

agente vacuolizante) cepa A2895, SV40 PML-1 cepa EK, y SV40 PML-2 cepa DAR]. Las cepas del virus del polio y las cepas de SV40 se propagaron y se evaluaron en células UC1-B y BS-C-1, respectivamente.

- Virus del molusco contagioso (VMC): se usaron lesiones recientes obtenidas de niños preadolescentes para recuperar muestras clínicas de virus del molusco contagioso.

*Ensayos antivirales para VVZ y CMVH en células HEL.*

Se realizaron ensayos de susceptibilidad al fármaco de VVZ y CMVH como se ha descrito anteriormente (Andrei G., et al, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1991, 10 (12), 1026-1033). Células HEL confluentes en placas de microvaloración de 96 pocillos se infectaron con 20 ufp de virus asociados a las células por pocillo (VVZ) o 100 ufp de virus libre de células (CMVH). Después de 2 horas de incubación, el inóculo se retiró y se sustituyó por las diferentes diluciones (por duplicado) de las moléculas ensayadas. Después de 5 (VVZ) o 7 (CMVH) días de incubación las células se fijaron y se tiñeron con Giemsa. La actividad se determinó contando el número de placas (VVZ) o evaluando el ECP (CMVH) para cada dilución. La actividad se expresa como  $CE_{50}$  o concentración eficaz del compuesto requerida para reducir la citopaticidad inducida por el virus (ECP) en un 50%, en comparación con el control no tratado.

*Ensayos antivirales para los virus VHS, VEV, Coxsackie, VRS, Para-gripe-3, Reovirus, y Punta Toro.*

Células E<sub>6</sub>SM confluentes (VHS y VEV), células HeLa (VEV, Coxsackie y VRS), células Vero (virus de la Para-gripe, Reovirus, Sindbis, y Punta Toro) cultivadas en placas de microvaloración de 96 pocillos se infectaron con 100 DICC<sub>50</sub> de virus libres de células. Después de 1 hora de incubación, (2 horas para VRS), el inóculo se retiró y se sustituyó por las diferentes diluciones (por duplicado) de las moléculas ensayadas. Después de 2 a 3 días de incubación el ECP se evaluó al microscopio. La actividad se expresa como  $CE_{50}$  o concentración eficaz del compuesto requerida para reducir la citopaticidad inducida por el virus (ECP) en un 50%, en comparación con el control no tratado.

Más específicamente para un ensayo anti-virus de Coxsackie: Placas de cultivo celular de noventa y seis pocillos pueden sembrarse con células Vero en medio DMEM que contiene suero fetal de ternero al 10% (FCS) de modo que las células alcancen la confluencia 24-48 h después. A continuación puede retirarse el medio y pueden añadirse diluciones sucesivas de 5 veces de los compuestos de ensayo en un volumen total de 100  $\mu$ l, después de lo cual el inóculo del virus (100  $\mu$ l) puede añadirse a cada pocillo. El inóculo del virus usado da como resultado normalmente una destrucción del 90 - 100% de la monocapa de células después de 5 días de incubación a 37°C. Pueden incluirse células no infectadas y células que reciben virus sin compuesto en cada placa de ensayo. Después de 5 días, el medio puede retirarse y se añaden 90  $\mu$ l de DMEM-FCS y 10  $\mu$ l de solución MTS/PMS (Promega) a cada pocillo. Después de un periodo de incubación de 2 h a 37°C,

puede leerse la densidad óptica de los pocillos a 498 nm en un lector de microplacas. El valor de concentración eficaz al 50% (CE<sub>50</sub>) puede definirse a continuación como la concentración de compuesto que protege al 50% de la monocapa de células del efecto citopático inducido por el virus.

5 *Ensayo antiviral para adenovirus humano de tipo 2*

Células fibroblastos de pulmón embrionario humano (HEL) se sembraron en placas de 96 pocillos a 10000 células por pocillo y se incubaron durante 4-5 días hasta confluencia. A cada pocillo, se le añadieron 50 µl de Ad2 (una aislado clínico de adenovirus de tipo 2), diluido en medio para obtener un aporte de virus de 5 UFP por pocillo. Después de 2 h a 10 37°C, el virus se aspiró y se sustituyó por diluciones sucesivas de los compuestos de ensayo (200 µl por pocillo). Se incluyeron cultivos tratados de forma simulada que solamente recibían los compuestos de ensayo en cada placa. Después de 10-12 días de incubación a 37°C, se realizó microscopía para valorar el efecto citopático inducido por el virus (ECP), y la toxicidad del compuesto, expresada como la concentración citotóxica 15 mínima. Las placas se sometieron a continuación al ensayo colorimétrico basado en MTS para comprobar la viabilidad celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Leiden, Países Bajos). Los valores de A<sub>490nm</sub>, corregidos para citotoxicidad ejercida por los compuestos de ensayo (según se determinó en cultivos infectados de forma simulada), se usaron para calcular el porcentaje de viabilidad celular. La concentración 20 eficaz al 50% (CE<sub>50</sub>) se determinó mediante extrapolación y se definió como la concentración de compuesto que producía un 50% de protección contra el virus. (Naesens et al., Antimicrob. Agents Chemother. (2005), 49: 1010-1016).

*Ensayos antivirales para virus del herpes humano 6*

Se realizaron ensayos de VHH-6 en células T-linfoblastos HSB-2 (para VHH-6A, 25 cepa GS) y MOLT-3 (para VHH-6B, cepa Z29) humanas. Las estirpes de virus se añadieron a suspensiones celulares concentradas a una multiplicidad de infección de 100 DIC<sub>50</sub> (dosis infectiva del 50% del cultivo celular) por 10<sup>6</sup> células. Después de 2 h, las células se centrifugaron para retirar virus no adsorbidos, se resuspendieron en medio que contenía diluciones sucesivas de los compuestos, y se transfirieron a placas de 48 pocillos. Después 30 de 10-12 días de incubación, el ECP viral y la toxicidad del compuesto se valoraron mediante microscopía, y el ADN total se extrajo de las células para la cuantificación del ADN viral mediante PCR cuantitativa. La actividad anti-VHH-6 se expresó como CE<sub>50</sub>, es decir, la concentración del compuesto que produce la inhibición del 50% de la replicación del virus, según se estima a partir del valor de ECP, o la cantidad de ADN viral según se mide en el 35 ensayo de PCR.

Para el análisis de PCR cuantitativa en los extractos de ADN, se usó el método de PCR cuantitativa SYBR® Green. Los cebadores directo e inverso se seleccionaron para amplificar un fragmento de 150 pb del gen U67 de VHH-6. Se obtuvo una curva patrón mediante la amplificación de cantidades conocidas de un vector pGEM T en el que un

fragmento de 511 pb del gen U67 del VHH-6 se insertó usando procedimientos de clonación habituales. Estas curvas patrón se usaron para convertir los valores de umbral del ciclo ( $C_t$ ) para los extractos celulares en el número absoluto de copias de ADN de VHH-6. El valor de  $CE_{50}$  se calculó mediante extrapolación como la concentración del compuesto a la cual el número de copias de ADN viral a los 10-12 días p.i. era del 50% en comparación con el valor obtenido para el control de virus. (De Bolle et al., *Biochem. Pharmacol.* (2004), 67: 325-336.)

*Ensayos antivirales para orto- y parapoxvirus.*

Estos ensayos de susceptibilidad se realizaron como se ha descrito anteriormente. Células HEL (orto y parapoxvirus), PHK (ortopoxvirus) y PLK (parapoxvirus) confluentes en placas de microvaloración de 96 pocillos se infectaron con un inóculo viral con un valor que variaba entre 20 y 60 ufp/pocillo. Después de 2 horas de incubación a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, el virus residual se retiró y las células infectadas se incubaron adicionalmente con medio que contenía diluciones sucesivas de los compuestos (por duplicado). Después de 2 a 3 días de incubación a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, se registró el efecto citopático viral (ECP). La actividad se expresa como  $CE_{50}$  o concentración eficaz del compuesto requerida para reducir la citopaticidad inducida por el virus (ECP) en un 50%, en comparación con el control no tratado.

*Ensayos antivirales para virus del polio (de primate o murino)*

Monocapas confluentes de células UC1-B o BS-C-1 cultivadas en placas de microvaloración de 96 pocillos se infectaron con 100  $DIC_{50}$  de virus libres de células. Después de 2 horas de incubación, el inóculo se retiró y se sustituyó por las diferentes diluciones (por duplicado) de las moléculas ensayadas. Después de 4 a 5 días (cepas del virus del polio) o de 6 a 7 días (cepas de SV40) de incubación, el efecto citopático inducido por el virus (ECP) se monitorizó microscópicamente. La actividad se expresa como  $CE_{50}$  o concentración eficaz del compuesto requerida para reducir la citopaticidad inducida por el virus (ECP) en un 50%, en comparación con el control no tratado.

*Ensayos de citotoxicidad.*

Monocapas confluentes de UC-B o BS-C-1 cultivadas en placas de microvaloración de 96 pocillos se incubaron con diferentes concentraciones de los compuestos (por duplicado) durante de 5 a 6 días. A continuación, las células se tripsinizaron y el número de células se determinó con un contador Coulter. La toxicidad de los compuestos se expresa como  $CC_{50}$  o concentración de compuesto requerida para reducir el número de células en un 50%, en comparación con un control no tratado. El índice de selectividad es la proporción de  $CC_{50}$  para toxicidad celular con respecto a  $CE_{50}$  para el ECP viral.

*Ensayos antivirales para el virus del molusco contagioso (VMC)*

Monocapas de veinticuatro horas de edad de PHK cultivadas en placas de microvaloración de 96 pocillos se infectaron con 100  $DIC_{50}$  de virus libres de células. Después de 2 horas de incubación, el inóculo se retiró y se sustituyó por las diferentes

diluciones (por duplicado) de las moléculas ensayadas. Después de 6 a 7 días de incubación el efecto citopático inducido por el virus (ECP), caracterizado por la aparición de grandes células infectadas, con orgánulos internos desubicados y destruidos por una gran inclusión intracitoplásmica, se supervisó microscópicamente. La actividad se expresa como

5 CE<sub>50</sub> o concentración eficaz del compuesto requerida para reducir la citopaticidad inducida por el virus (ECP) en un 50%, en comparación con el control no tratado.

*Ensayos de citotoxicidad y concentración citotóxica mínima*

- 10 • Concentración citotóxica mínima para las diferentes líneas celulares: La concentración citotóxica mínima (CCM) es la concentración más baja del compuesto en el ensayo antiviral a la que se registraron cambios morfológicos característicos de citotoxicidad.
- 15 • Ensayo de citotoxicidad para células HEL: La toxicidad de los compuestos para las células huésped se basaba en la inhibición del crecimiento celular. Las células se sembraron a  $4 \times 10^3$  células por pocillo en un volumen de 0,1 ml en placas de microvaloración de 96 pocillos y se dejaron proliferar durante 24 h en MEM que contenía FCS al 20%, L-glutamina al 0,1%, y bicarbonato de sodio al 0,3%. Veinticuatro horas más tarde, MEM (con FCS al 2%, L-glutamina al 0,1%, y bicarbonato de sodio al 0,3%) que contenía diferentes concentraciones (por duplicado) de los compuestos de ensayo, se añadió (0,1 ml/pocillo). Después de tres días de incubación a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, el número de células se determinó con un contador Coulter. La toxicidad de los compuestos se expresa como CC<sub>50</sub> o concentración de compuesto requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%, en comparación con un control no tratado.
- 20 • Ensayo de citotoxicidad para células PHK: La toxicidad de los compuestos para las células huésped se basaba en la inhibición del crecimiento celular. Las células se sembraron a  $4 \times 10^3$  células por pocillo en un volumen de 0,1 ml en placas de microvaloración de 96 pocillos y se dejaron proliferar durante 24 h en MEM que contenía FCS al 20%, L-glutamina al 0,1%, y bicarbonato de sodio al 0,3%. Veinticuatro horas más tarde, MEM (con FCS al 2%, L-glutamina al 0,1%, y bicarbonato de sodio al 0,3%) que contenía diferentes concentraciones (por duplicado) de los compuestos de ensayo se añadió (0,1 ml/pocillo). Después de tres días de incubación a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, el número de células se determinó con un contador Coulter. La toxicidad de los compuestos se expresa como CC<sub>50</sub> o concentración de compuesto requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%, en comparación con un control no tratado.
- 25
- 30
- 35

*Índice de selectividad*

El índice de selectividad (IS) se define como la proporción de la CC<sub>50</sub> (la concentración citotóxica al 50%, es decir la concentración que reduce en un 50% la viabilidad de células cultivadas) para el crecimiento celular con respecto a la CE<sub>50</sub>

(concentración eficaz al 50%, es decir la concentración requerida para inhibir el efecto citopático viral en un 50% en cultivo celular) para la formación de placa viral.

EJEMPLO 9 - métodos para la determinación *in vivo* de actividad antiviral y de toxicidad

*Ratones*

5 Los animales usados en todos los experimentos eran ratones NMRI (Naval Medical Research Institute) adultos o ratones atímicos desnudos (BALB/C nu/nu) de 18-20 g de peso.

*Infección por VHS de ratones NMRI.*

10 A los animales se les inoculó por vía intraperitoneal (i.p.) VHS-1 (cepa KOS) o VHS-2 (cepa Lyons) a de  $1 \times 10^3$  a  $2 \times 10^3$  UFP/0,2 ml por ratón. Los ratones se trataron durante 5 días una vez al día (comenzando 1 h después de la infección) con los compuestos de ensayo, que se administraron por vía subcutánea (s.c.) a las dosis indicadas.

*Infección por virus de la variolovacuna y virus de la viruela bovina de ratones NMRI.*

15 A los animales se les inoculó por vía intranasal (i.n.) con virus de la variolovacuna (Western Reserve) o virus de la viruela bovina (cepa Brighton) con  $4 \times 10^4$  UFP/20  $\mu$ l por ratón. Los ratones se trataron durante 5 días una vez al día (comenzando 1 h después de la infección) con los compuestos de ensayo, que se administraron por vía subcutánea (s.c.) a las dosis indicadas, adultos atímicos desnudos (nu/nu).

20 *Xenoinjertos de carcinoma de cuello del útero humano (SiHa) en ratones atímicos desnudos.*

A los animales adultos se les inyectó s.c. con  $5 \times 10^6$  células SiHa, una línea celular de carcinoma de cuello del útero humano que aloja el virus del papiloma humano integrado (VPH-16). Una vez que los tumores se establecieron (aproximadamente después de 1 semana), los ratones se dividieron en varios grupos, se determinó el tamaño de los tumores para cada ratón, y se inició el tratamiento con placebo (PBS) o los compuestos de ensayo. Las soluciones de ensayo se administraron por vía intratumoral (i.t.) a un volumen de 50  $\mu$ l. Los ratones se trataron una vez al día, 5 veces a la semana durante un periodo de 5 semanas. Cada semana, se midió el tamaño del tumor para cada animal con un calibre en dos dimensiones perpendiculares y el tamaño de los tumores se calculó multiplicando los dos diámetros medidos.

EJEMPLO 10 - actividad antiviral y actividad contra trastornos de proliferación celular inducidos por virus

35 El compuesto (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina y su producto de equilibrio y desformilado y su análogo 6-aza, (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-6-azacitosina, se evaluaron para su potencial para inhibir la replicación de diferentes virus *in vitro* e *in vivo*. Se muestran valores aproximados que son valores promedio tomados de múltiples experimentos (en su mayoría aproximadamente 3).

Para todas las tablas en esta solicitud que muestran actividades antivirales, se han usado las siguientes abreviaturas:

<sup>a</sup> CE<sub>50</sub>: Concentración eficaz requerida para reducir la citopaticidad inducida por el virus en un 50%.

<sup>b</sup> CCM: Concentración citotóxica mínima requerida para provocar una alteración detectable al microscopio de la morfología celular.

5 <sup>c</sup> CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%.

N.D.: No determinado.

#### *In Vitro*

10 El compuesto (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina ha mostrado una actividad significativa contra:

- CMV (AD-169 y Davis), VVZ (Oka, YS, YS-R y O7-1) y Poxvirus como virus de la variolovacuna (Lederle, Lister, WR y Copenhagen), virus de la viruela bovina (Brighton) y virus del ectima contagioso (NZ2) en células HEL
- 15 • virus del herpes simple-1 (KOS y TK- KOS ACV<sup>f</sup>), virus del herpes simple-2 (G) y virus de la variolovacuna en cultivos de células E<sub>6</sub>SM
- Poxvirus como el virus de la variolovacuna (Lederle, Lister, WR y Copenhagen), virus de la viruela bovina (Brighton) y virus del ectima contagioso (NZ2) en PHK.

20 La tabla 1 muestra los resultados de la determinación de la actividad de los compuestos de la invención contra miembros los *Herpesviridae* junto con HPMPc como punto de comparación.

Tabla 1

Compuesto (Nº)	CE <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>						Citotoxicidad	
	VVZ				CMVH		Morfología celular	Crecimiento celular
	Cepa YS (células HEL)	Cepa OKA (células HEL)	Cepa 07/1 (células HEL)	Cepa YS-R (células HEL)	Cepa AD-169 (células HEL)	Cepa Davis (células HEL)	(CCM) <sup>b</sup> células HEL	(CC50) <sup>c</sup> células HEL
12	<0,00002	<0,00002	<0,00002	<0,00002	<0,000	<0,000	>5	6,0
3	0,039	0,027	0,019	0,015	0,078	0,054	>50	>31
15	N.D.	0,063	N.D.	N.D.	0,0037	0,0014	≥100	>100
Análogo de HPMP-6- azaC	42	38,2	18,4	17	30,0	37,3	>100	>50
11	N.D.	0,08	0,05	N.D.	0,093	0,061	>100	>50
3a	N.D.	0,042	0,046	N.D.	0,10	0,12	100	>50
HPMPc cíclico	N.D.	0,18	0,08	N.D.	0,36	0,36	>100	>50
HPMPc	N.D.	0,2	0,05	N.D.	0,20	0,30	400	68,6

La Tabla 2 muestra los resultados de la determinación de la actividad de los compuestos de la invención contra miembros de los *Poxviridae* en células Hel junto con

HPMPC como punto de comparación.

Tabla 2

Compuesto	CE <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>						Citotoxicidad	
	Virus de la variolovacuna				Virus de la viruela aviar	Virus del ectima contagioso	Morfología	Crecimiento
	Lederie	Lister	WR	Copenhagen	Brighton	NZ2	(CCM) <sup>b</sup>	(CC <sub>50</sub> ) <sup>c</sup>
3	1,70	1,69	2,45	2,26	4,72	0,15	>100	≥31,1
HPMP-azaC	≥81,6	≥79,3	>100	>100	>100	≥63,8	>100	>50
11	3,1	1,38	2,08	1,76	5,64	0,09	>100	>50
3a	7,97	7,61	6,34	5,84	12,63	0,37	>100	N.D.
12	<0,032	<0,032	0,072	<0,032	<0,032	<0,032	20	N.D.
HPMPC cíclico	2,43	2,45	5,82	4,35	8,43	0,20	>100	68,6
HPMPC	7,61	2,19	4	3,06	8,94	0,21	>100	68,6

5 La Tabla 3 muestra el perfil de susceptibilidad a fármacos del virus de la variolovacuna (Western Reserve) y virus recombinantes que alojan las mutaciones A314T, A684V o A314T + A684V. Estas mutaciones se encontraron en mutantes virales seleccionados después de aproximadamente 40 pases en concentraciones en aumento de HPMPC y HPMP-5-azaC.

(CE<sub>50</sub> en µg/ml)

10

Tabla 3

Tipo de virus	HPMPC	HPMP-5-azaC (3)
Tipo silvestre	3,1	1,58
A314T	22,2	4,1
684	14,8	6,88
314 + 684	39,5	10,8

La Tabla 4 muestra la actividad antiviral de un profármaco de HPMP-5-azaC contra virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y de tipo 2 (VHS-2) en células HEL

Tabla 4

Compuesto	CE <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>		Citotoxicidad (µg/ml)	
	VHS-1	VHS-2	Morfología	Crecimiento
	(cepa KOS)	(cepa G)	(CCM) <sup>b</sup>	(CC <sub>50</sub> ) <sup>c</sup>
3	0,61	0,54	>100	N.D.
HPMPC	0,16	0,54	>100	N.D.
HPMPC cíclico	0,16	0,58	>100	N.D.
11	0,017	0,58	>100	N.D.
12	0,072	0,36	>20	N.D.
Aciclovir	0,032	0,032	>100	N.D.

15

La Tabla 5 muestra la actividad antiviral de (S)-HPMP-5-azaC y HPMP-5-azaC y

ésteres de los mismos (HDE-HPMP-5-azaCc = éster hexadeciloxietílico de cHPMP-5-aza-C) contra el virus del polio de primates en células BS-C-1

Compuesto	Actividad antiviral (CE <sub>50</sub> ) <sup>a</sup>			Citotoxicidad CC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	Índice de selectividad		
	SV40	SV40 PML-1	SV40 PML-2		SV40	SV40 PML-1	SV40 PML-2
	Cepa A2895	Cepa EK	Cepa DAR		Cepa A2895	Cepa EK	Cepa DAR
(S)-HPMPC	4,72	5,56	5,87	79,39	17	14	14
<b>3</b>	3,22	3,19	3,81	128,75	40	40	34
HPMPC	5,72	5,25	5,19	98,22	17	19	19
cíclico							
<b>11</b>	4,39	4,60	5,05	36,44	8	8	7
<b>3a</b>	5,92	10,00	8,24	>200	>34	>20	>24
<b>10</b>	>200	>200	>200	>200	1	1	1
<b>HDE-HPMP-5-azaCc (12)</b>	0,16	0,15	0,18	7,10	44,5	57,6	38,7

- 5 La Tabla 6 muestra la actividad antiviral de (S)-HPMP-5-azaC, HPMP-5-azaCc y ésteres de los mismos (HDE-HPMP-5-azaCc = éster hexadeciloxietílico de cHPMP-5-aza-C) contra virus del polio murino en células UC1-B

Compuesto	Actividad antiviral (CE <sub>50</sub> ) <sup>a</sup>				Citotoxicidad CC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	Índice de selectividad			
	MN/RD E Toronto	PTA	2PTA 2	LID-1		MN/RD E Toronto	PTA	2PTA 2	LID-1
(S)-HPMPC	2,76	6,54	5,78	5,89	84,34	31	13	15	14
<b>3</b>	1,94	3,89	3,35	4,98	109,46	56	28	33	22
HPMPC	12,28	16,22	18,60	21,17	71,02	6	4	4	3
cíclico									
<b>11</b>	3,43	8,59	4,39	8,05	58,44	17	7	13	7
<b>3a</b>	7,57	N.D.	14,84	N.D.	>200	>26	-	13	-
<b>10</b>	>200	>200	200	>200	>200	1	1	1	1
<b>HDE-HPMP-5-azaCc (12)</b>	0,29	0,28	0,30	0,47	10,0	34,9	6	33,8	3

- 10 La Tabla 7 muestra la actividad de (S)-HPMP-5-azaC en comparación con (S)-HPMPC contra aislados clínicos de virus del molusco contagioso (VMC) en queratinocitos primarios humanos.

Tabla 7

Compuesto	CE <sub>50</sub> (µg/ml)				CCM (µg/ml)
	VMC 06/02	VMC 06/03	VMC 06/04	VMC 06/06	
(S)-HPMPC	0,76	0,55	0,55	0,6	50
3	0,4	0,23	0,4	1,26	50

La Tabla 8 muestra la actividad de larga duración de (S)-HPMPC en comparación con (S)-HPMP-5-azaC (3). Se infectaron células HEL con VHS-1 (cepa Kos) o virus de la variolovacuna (cepa Lederle) y los compuestos se añadieron antes o después de la infección y permanecieron en contacto con las células durante el periodo de tiempo indicado. Los cultivos se lavaron a continuación 3x para retirar el compuesto residual. El tiempo de infección se considera como 0 h.

5

Tabla 8

Tiempo de incubación	CE <sub>50</sub> (µg/ml)			
	Variolovacuna (cepa Lederle)		VHS-1 (cepa Kos)	
	(S)-HPMPC	(S)-HPMP-5-azaC	(S)-HPMPC	(S)-HPMP-5-azaC
Pretratamiento (-16 horas)	5	1,59	1	0,25
Tratamiento 2-4 horas	20	5	2,51	1
Tratamiento 2-6 horas	9,06	3,98	1,1	0,37
Tratamiento 2-8 horas	10	6,3	1	0,32
Tratamiento desde 2 h hasta finalizar el experimento	3,98	2	0,43	0,16

10

La Tabla 9 muestra actividad anti-adenovirus de compuestos de la invención en células HEL fibroblastos de pulmón embrionario humano infectadas con adenovirus humano de tipo 2. Los resultados muestran que el compuesto 3 (5-aza-HPMPC) es claramente más activo contra Ad2 que el cidofovir.

Tabla 9

Producto	Actividad antiviral (µg/ml)		Toxicidad (µg/ml)	
	CE <sub>50</sub> (ECP)	CE <sub>50</sub> (MTS)	CCM (microscop.)	CC <sub>50</sub> (MTS)
HPMPC	1,4	3,2	>79	>79
3	0,6	1,1	>100	>100
3a	11,3	31,8	>100	>100

Tabla 10 - resultados anti-VHH-6

A) actividad anti-VHH-6A en células HSB-2 infectadas por VHH-6A, cepa GS

Producto	Actividad antiviral (µg/ml)		Toxicidad (µg/ml)
	CE <sub>50</sub> (ECP)	CE <sub>50</sub> (PCR cuantitativa)	CCM (microscopía)
HPMPC	3,9	2,1	19
3	0,55	0,56	16
3a	5,8	20,8	>200
10	>200	ND	>200

A) actividad anti-VHH-6B en células MOLT-3 infectadas por VHH-6B, cepa Z29

Producto	Actividad antiviral (µg/ml)		Toxicidad (µg/ml)
	CE <sub>50</sub> (ECP)	CE <sub>50</sub> (PCR cuantitativa)	CCM (microscopía)
HPMPC	0,84	0,56	32
3	0,23	0,34	16
3a	3,6	5,5	200

### *In vivo*

La administración subcutánea del compuesto (1/día) produjo una tasa de supervivencia del 100% en un experimento in vivo en ratones con VHS-1 (KOS) durante 20 semanas, mientras que en el grupo de control el 80% no sobrevivieron. Para el modelo de VHS-2 (Lyons), la tasa de supervivencia con el compuesto era del 100% después de 20 días, mientras que era del 40% en el grupo de control. Además, la administración subcutánea del compuesto produjo una supervivencia del 100% en un modelo en ratones con virus de la viruela bovina (Brighton) después de 20 días, mientras que en el grupo de control había una supervivencia del 0% después de 10 días.

En un modelo en ratones con virus de la variolovacuna (WR), la administración del compuesto produjo una tasa de supervivencia del 100% después de 20 días, mientras que ningún ratón sobrevivió el día 7 en el grupo de control. Además, el número de lesiones el día 7 se redujo a 0 en un modelo de lesión caudal de viruela, en comparación con una media de 17 lesiones en el grupo de control.

En los experimentos con xenoinjertos de carcinoma de cuello del útero humano (SiHa) en ratones atímicos desnudos, el tamaño del tumor no aumentó durante un tratamiento intratumoral de 5 semanas con el compuesto, mientras que en el grupo de control no tratado el tamaño del tumor aumentaba un 600%. En todos los experimentos in vivo, los pesos corporales medios de los ratones se investigaron y dieron un patrón normal.

Las Figuras 2 a 12 muestran los resultados de los experimentos in vivo con más detalle.

Los resultados de las investigaciones de los efectos de (S)-HPMP-5-azaC sobre el carcinoma de cuello del útero humano son claramente visibles a partir de la figura 12 y se muestra que dosis de 5 y 10 mg/ml de (S)-HPMP-5-azaC inhiben el crecimiento de tumores.

### EJEMPLO 11 - citotoxicidad renal

Estos experimentos se refieren a la investigación de la actividad citostática de los compuestos de la invención para cultivos primarios de células renales humanas, en

comparación con HPMPC.

*Materiales y métodos:* se usaron dos células renales humanas primarias diferentes: RPTEC (células epiteliales del túbulo proximal renal) y células epiteliales de la corteza renal humana (HRCE). La actividad citostática de los compuestos se midió en células en crecimiento (células en la fase exponencial del crecimiento) o células en reposo (monocapas confluentes).

Células cultivadas en placas de microvaloración de 96 pocillos se incubaron con diferentes concentraciones de los compuestos (por duplicado) durante el periodo de tiempo indicado. A continuación, las células se tripsinizaron y el número de células se determinó con un contador Coulter. El porcentaje de control se calculó como el número de células en las muestras tratadas dividido por el número de células en los controles no tratados. La actividad citostática de los compuestos se expresa como  $CC_{50}$  o la concentración de compuesto requerida para reducir el número de células en un 50%, en comparación con un control no tratado.

*Los resultados* de estos experimentos son los siguientes:

Tabla 11: A, B, C, D, E y F muestran la actividad citostática en células renales humanas en diferentes condiciones

A) Actividad citostática para células epiteliales del túbulo proximal renal en crecimiento (RPTEC) #4 después de 7 días de incubación con o sin renovación del medio.

Compuestos	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Sin renovación del medio	Renovación del medio
<b>3</b>	>50	>50
<b>3a</b>	>50	>50
<b>10</b>	>50	>50
(S)-HPMPC	44,23	45,94

B) Actividad citostática para células epiteliales del túbulo proximal renal en reposo (RPTEC) #4 después de 16 días de incubación sin renovación del medio.

Compuesto	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>3</b>	>50
<b>3a</b>	>50
<b>10</b>	>50
(S)-HPMPC	12,7

C) Actividad citostática para células epiteliales del túbulo proximal renal en crecimiento (RPTEC) #6 después de 6 u 8 días de incubación sin renovación del medio.

Compuestos	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	6 días	8 días
<b>3</b>	≥200	149,4
<b>3a</b>	>200	>200
<b>10</b>	>200	>200
(S)-HPMPC	42,2	14,2

D) Actividad citostática para células epiteliales del túbulo proximal renal en crecimiento (RPTEC) #6 después de 5 ó 7 días de incubación sin renovación del medio.

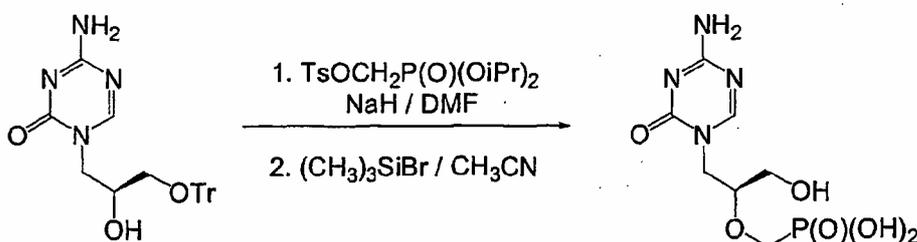
Compuestos	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	5 días	7 días
<b>3</b>	≥200	135,8
<b>3a</b>	>200	>200
<b>10</b>	>200	>200
(S)-HPMPC	42,2	55,6

5

E) Actividad citostática para células epiteliales del túbulo proximal renal en reposo (RPTEC) #7 después de 6 u 8 días de incubación sin renovación del medio.

Compuestos	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	5 días	7 días
<b>3</b>	≥200	≥200
<b>3a</b>	>200	>200
<b>10</b>	>200	>200
(S)-HPMPC	94,6	86,8

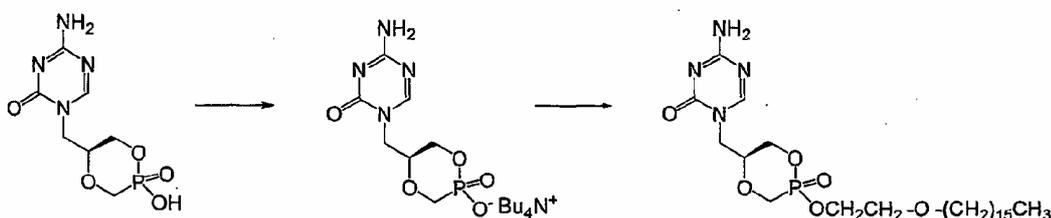
10 EJEMPLO 12 Síntesis de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina (HPMP-5-azaC)



15 Una solución de 1-[(2S)-2-hidroxi-3-(trifenilmetoxi)propil]-5-azacitosina (934 mg, 2,18 mmoles) y tosiloimetilfosfonato de diisopropilo (1,05 g, 3 mmoles) en DMF (30 ml) se enfrió a -20°C y se añadió una dispersión oleosa al 60% de NaH (240 mg, 6 mmoles). La mezcla se agitó a -20°C durante 15 minutos, y a continuación se dejó que la temperatura se elevara a aproximadamente 25°C (temperatura ambiente) y la agitación continuó durante 15

h adicionales. Se añadió ácido acético gota a gota hasta pH 7, la mezcla se evaporó y el residuo se coevaporó con tolueno (2 x 50 ml). Se añadió acetonitrilo (30 ml), seguido de bromotrimetilsilano (2,7 ml, 20 mmoles), la suspensión resultante se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 48 h y se evaporó. En residuo se coevaporó con acetonitrilo (3 x 50 ml). Se añadió una solución acuosa al 90% de metanol (50 ml) y la solución se neutralizó a pH 7,0 con hidrogenocarbonato de trietilamonio 0,2 M. La solución se concentró a volumen mínimo (aproximadamente 5 ml) y se dividió entre agua (100 ml) y éter (100 ml). Una capa acuosa se concentró a un volumen de 5 ml y se aplicó sobre una columna de Dowex 1 (forma de  $\text{AcO}^-$ , 60 ml). La elución se realizó con agua (300 ml), y a continuación con un gradiente lineal de ácido acético (0,5-1 M, 1 l) y finalmente, el producto puro se eluyó con ácido fórmico 1 M. Las fracciones que absorbían UV se hicieron precipitar al vacío y el residuo se coevaporó varias veces con agua hasta una completa retirada del ácido. El residuo se cristalizó a partir de etanol acuoso, los cristales se recogieron por aspiración, se lavaron con etanol y éter y se secaron al vacío. Rendimiento: 200 mg (33%) de HPMP-5-azaC puro.

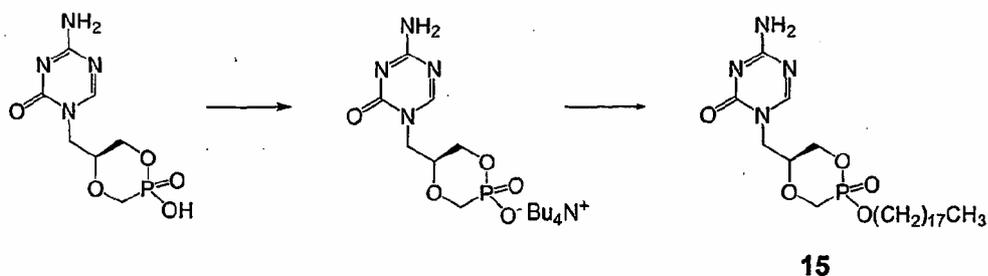
Ejemplo 13: Síntesis de éster hexadeciloxietílico de 1-[[[(5S)-2-hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina



Una solución metanólica 1 M de hidróxido de tetrabutilamonio (1,73 ml; 1,73 mmoles) se añadió a una solución de HPMP-5-azaC cíclica (454 mg, 1,73 mmoles) en metanol absoluto (50 ml), la mezcla se agitó durante 5 minutos, y a continuación se evaporó y el residuo se coevaporó con tolueno (2 x 40 ml). El residuo se disolvió en DMF (5 ml) y se calentó con bromuro de hexadeciloxietilo (1,4 g, 4,0 mmoles) a  $100^\circ\text{C}$  durante 6 h. La mezcla de reacción se evaporó, el residuo se coevaporó con xileno (2 x 25 ml) y se cromatografió en una columna de gel de sílice (100 ml) en el sistema de cloroformo - metanol (85:15) para dar 1 g de un sólido blanco, que sigue conteniendo restos de sales de tetrabutilamonio (control de RMN). El producto impuro se cristalizó a partir de metanol, los cristales se recogieron por aspiración, se lavaron con metanol seguido por éter dietílico y se secaron al vacío. Rendimiento del producto puro: 450 mg (49%). Las aguas madre se purificaron mediante la técnica de HPLC de fase inversa (instrumento Waters Delta 600 con un detector de absorbancia Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector, usando columna preparativa Luna Phenomenex® C-18 (21 x 250 mm), caudal 12 ml/minuto, gradiente: 20-

90% CH<sub>3</sub>OH en agua durante 45 minutos). Rendimiento global de producto puro: 485 mg (53%).

EJEMPLO 14: Síntesis de éster octadecílico de 1-[[[(5S)-2-hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina (15)

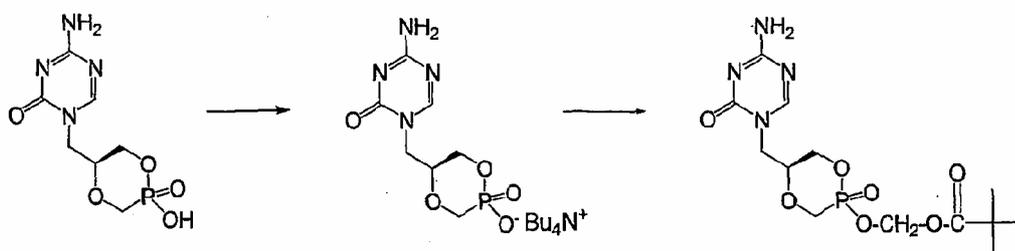


5

Hidróxido de tetrabutilamonio metanólico 1 M (0,61 ml; 0,61 mmoles) se añadió a una solución de HPMP-5-azaC cíclica (161 mg, 0,61 mmoles) en metanol absoluto (50 ml), la mezcla se agitó durante 5 minutos, a continuación se evaporó y el residuo se coevaporó con tolueno (20 ml), seguido de dioxano seco (20 ml). El residuo se disolvió en dioxano (10 ml) y se agitó con bromuro de octadecilo (500 mg, 1,5 mmoles) a 95°C durante 3 h. La mezcla de reacción se evaporó, el residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice (30 ml) en el sistema de cloroformo - metanol (85:15). Rendimiento: 250 mg, 80%, sólido blanco. ESI MS: 1051,0 (2M+Na)<sup>+</sup> (41), 537,3 (M+Na)<sup>+</sup> (64), 515,3 (23) (MH)<sup>+</sup>. HRMS (ESI): Para C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>P (MH<sup>+</sup>) calculado: 515,3362; encontrado: 515,3382. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 8,11 s, 1H (H-6); 7,46 s ancho, 1H y 7,45 s ancho, 1H (NH<sub>2</sub>); otras señales no se distinguían. <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 166,50 (C-4); 159,62 (C-6); 153,95 (C-2); 73,19 d, J(P,C) = 4,9 (C-2'); 72,04 d, J(P,C) = 12,4 (C-3'); 65,19 d, J(P,C) = 5,9 (OCH<sub>2</sub>); 62,70 d, J(P,C) = 141,6 (P-C); 45,75 (C-T); 31,44, 30,03, 29,18, 5C, 29,09, 25,09, 23,24, 5C, 22,24 y 19,37 (CH<sub>2</sub>); 13,65 (CH<sub>3</sub>).

15

EJEMPLO 15: éster pivaloiloximetílico de 1-[[[(5S)-hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina (POM-HPMP-azaC cíclica).



25

Hidróxido de tetrabutilamonio metanólico 1 M (1,022 ml; 1,022 mmoles) se añadió a una solución de HPMP-5-azaC cíclica (268 mg, 1,022 mmoles) en metanol absoluto (50 ml), la mezcla se agitó durante 5 minutos, a continuación se evaporó y el residuo se coevaporó con tolueno (20 ml), seguido de dioxano seco (20 ml). El residuo se disolvió en dioxano (10

ml) y se agitó con pivalato de clorometilo (1,5 ml, 10,4 mmoles) a 100°C durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se interrumpió con metanol (1 ml) y la mezcla se evaporó. El residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice (50 ml) en el sistema de cloroformo - metanol (85:15) para dar 270 mg (70%) de POM-HPMP-5-azaC cíclica que contenía restos de sales de tetrabutilamonio. El producto se purificó finalmente mediante la técnica de HPLC de fase inversa (instrumento Waters Delta 600 con un Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector, usando una columna preparativa Luna Phenomenex® C-18 (21 x 250 mm), caudal 12 ml/minuto, elución isocrática con metanol al 20%, tiempo de retención 12 minutos). Rendimiento: 200 mg (52%), espuma blanca. El compuesto es una mezcla de diastereoisómeros - 5:2. HRMS (FAB): Para C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P (MH<sup>+</sup>) calculado: 377,1226; encontrado: 377,1218. Datos de RMN:

Diastereoisómero principal:

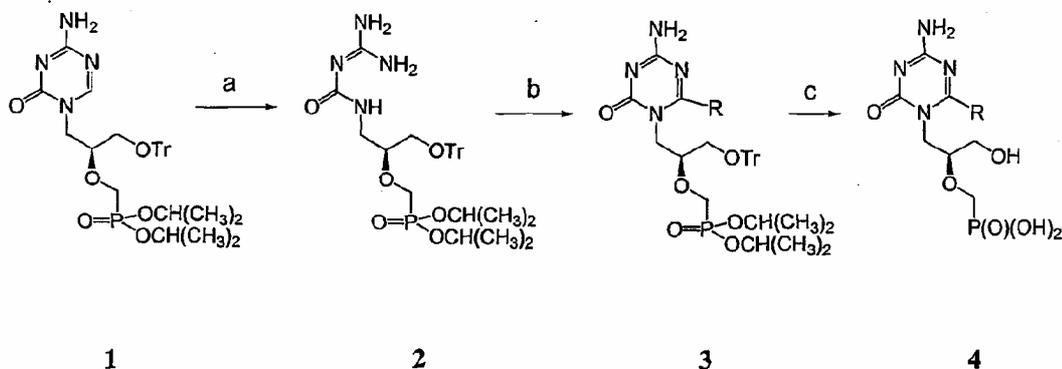
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,25 (s, 8H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C); 3,51 (dd, 1H, J<sub>gem</sub> = 14,1, J<sub>vic</sub> = 7,8, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>N); 3,97 (d, 1H, J<sub>gem</sub> = 14,8, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>P); 4,09 (m, 1H, CHO); 4,10 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>N); 4,18 (dd, 1H, J<sub>gem</sub> = 14,8, J<sub>H,P</sub> = 11,2, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>P); 4,27 (t ancho, 1H, J<sub>gem</sub> ~ J<sub>vic</sub> = 10,7, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>O); 4,42 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>O); 5,71 y 5,75 (2 x dd, 2H, J<sub>gem</sub> = 11,9, J<sub>vic</sub> = 5,2, OCH<sub>2</sub>O); 6,35 y 7,30 (2 x s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,95 (s, 1H, H-6).

<sup>13</sup>C RMN (125,7 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 26,76 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C); 38,69 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 46,61 (CH<sub>2</sub>N); 64,07 (d, J<sub>C,P</sub> = 144, CH<sub>2</sub>P); 72,24 (d, J<sub>C,P</sub> = 9, CH<sub>2</sub>O); 73,23 (d, J<sub>C,P</sub> = 5, CHO); 81,44 (d, J<sub>C,P</sub> = 6, OCH<sub>2</sub>O); 154,19 (C-2); 158,98 (CH-6); 166,43 (C-4); 176,94 (CO).

Diastereoisómero secundario:

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,22 (s, 8H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C); 3,67 (dd, 1H, J<sub>gem</sub> = 13,8, J<sub>vic</sub> = 7,9, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>N); 3,88 (dd, 1H, J<sub>gem</sub> = 14,1, J<sub>H,P</sub> = 1,9, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>P); 4,11 (m, 1H, CHO); 4,13 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>N); 4,29 (dd, 1H, J<sub>gem</sub> = 14,1, J<sub>H,P</sub> = 9,4, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>P); 4,45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O); 5,60 y 5,77 (2 x dd, 2H, J<sub>gem</sub> = 13,8, J<sub>vic</sub> = 5,2, OCH<sub>2</sub>O); 6,45 y 7,19 (2 x s ancho, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,04 (s, 1H, H-6).

<sup>13</sup>C RMN (125,7 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 26,71 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C); 38,62 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 46,61 (CH<sub>2</sub>N); 64,39 (d, J<sub>C,P</sub> = 147, CH<sub>2</sub>P); 70,84 (d, J<sub>C,P</sub> = 6, CH<sub>2</sub>O); 72,87 (d, J<sub>C,P</sub> = 4, CHO); 81,77 (d, J<sub>C,P</sub> = 5, OCH<sub>2</sub>O); 154,27 (C-2); 159,16 (CH-6); 166,43 (C-4); 176,94 (CO).

EJEMPLO 16 - Síntesis de derivados de 5-azacitosina 6-alquil sustituidos

HPMP-6-alkil  
-5-azacitosina

- 5            Condiciones: (a)  $\text{NH}_4\text{OH}$  acuoso al 25% +  $\text{CH}_3\text{OH}$  1:1, temperatura ambiente, 5 días; (b) Ortoéster, DMF,  $150^\circ\text{C}$ , 3 h; (c)  $(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , temperatura ambiente, 24 h

          Ortoésteres:  $\text{CH}_3\text{C}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$  para  $\text{R} = \text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{OCH}_3)_3$  para  $\text{R} =$  butilo,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{OCH}_3)_3$  para  $\text{R} =$  fenilo.

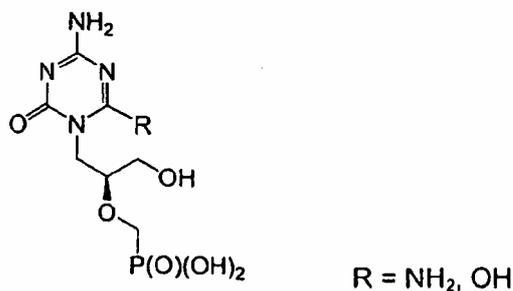
- 10           Una mezcla de 1 (1,45 g, 2,39 mmoles), metanol (30 ml) y amoniaco acuoso al 25% (30 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Se realizó un control por TLC en el sistema de acetato de etilo - acetona - etanol - agua 18:3:1:1. El punto de 2 (que carece la absorción de UV) se detectó pulverizando con una mezcla de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  al 5% +  $\text{NaOH}$  al 5% +  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$  al 5% (punto naranja). La mezcla se evaporó y el residuo se coevaporó con etanol absoluto para dar el residuo oleoso de 2 (1,4 g). Este material se
- 15           disolvió en DMF (15 ml) y se calentó con el ortoéster apropiado (1 ml) a  $150^\circ\text{C}$  durante 1,5-3 h (control de TLC). La mezcla se evaporó a continuación, el residuo se cromatógrafió en una columna de gel de sílice (200 ml) en el sistema de acetato de etilo - acetona - etanol - agua 18:3:1:1. Rendimiento de 3: 50-70%. La desprotección de 3 a la 6-alkil HPMP-5-azaC (4) final se realizó mediante el mismo procedimiento que el descrito para HPMP-5-azaC.

- 20           EJEMPLO 17 Síntesis de derivados de azacitosina 6-sustituidos por  $\text{R} = \text{COOH}$ ,  $\text{CONH}_2$ ,  $\text{COOC}_2\text{H}_5$

          Estos compuestos se preparan a partir del compuesto 2 del ejemplo 17, mediante reacción de ciclación con ésteres de ácido oxálico, por ejemplo  $\text{KOOCCOOC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{H}_2\text{NCOCOOC}_2\text{H}_5$ ,  $(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$ .

- 25           EJEMPLO 18 Síntesis de derivados de azacitosina 6-sustituidos por  $\text{R} = \text{OH}$  o  $\text{NH}_2$ .

          Se preparan el derivado 6-amino y derivados 6-hidroxi mediante condensación de una sal sódica de 6-amino-5-azacitosina (amelina) o 6-hidroxi-5-azacitosina (con el grupo OH protegido) y HPMP synthon, es decir 4-metilbencenosulfonato de (2S)-2-[(diisopropilfosforil)metoxi]-3-hidroxiopropilo.



#### EJEMPLO 19: Síntesis y actividad de derivados 5,6-dihidro de derivados de 5 azacitosina

El derivado 5,6-dihidro de HPMP-5-azaC, mostraba una actividad contra virus del herpes con una CE<sub>50</sub> que variaba entre 3 y 12 µg/ml y demostró ser inhibidor para el virus de la variolovacuna (CE<sub>50</sub> = 38 µg/ml). El derivado 5,6-dihidro de HPMP-5-azaC fue el único compuesto en esta serie que mostraba actividad contra virus de ARN, concretamente era capaz de inhibir la replicación del replicón genómico subgenómico de VHC en células Huh-5-2 con una CE<sub>50</sub> de 24 µg/ml y CC<sub>50</sub> en células Huh-5-2 de 120 µg/ml.

(S)-1-[3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5,6-dihidro-5-azacitosina. Una mezcla de compuesto (S)-HPMP-5-azaC (110 mg, 0,39 mmoles) en metanol (15 ml) y ácido acético (0,5 ml) se agitó hasta una disolución completa (1 h, aproximadamente) y a continuación se hidrogenó en paladio sobre carbono al 10% (20 mg) a presión atmosférica a temperatura ambiente hasta que la absorción de UV desaparece (48 h). El catalizador se eliminó por filtración a través de una almohadilla de Celite, el filtrado se pasa a través de un filtro de membrana de Nylon Whatman de 0,2 µm, se evaporó al vacío y el producto se liofilizó. Rendimiento: 80 mg, 73%.  $[\alpha]_D^{20}$  -2,9 (c 0,259, H<sub>2</sub>O). FABMS: 283 (MH<sup>+</sup>) (16). HRMS (FAB): Para C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P (MH<sup>+</sup>) calculado: 283,0807; encontrado: 283,0807. <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): 4,88 d, 1H y 4,79 d, 1H, J<sub>gem</sub> = 10,5 (NCH<sub>2</sub>N); 3,87 dd, 1H, J(P,CH<sub>a</sub>) = 9,2, J<sub>gem</sub> = 13,2 (PCH<sub>a</sub>); 3,87 dd, 1H, J(3'a,2') = 3,8, J<sub>gem</sub> = 12,2 (H-3'a); 3,74 m, 2H (H- 2',PCHb); 3,67 dd, 1H, J(1'a,2') = 3,3, J(gem) = 14,9 (H-1'a); 3,60 dd, 1H, J(3'b,2') = 4,0 (H-3'b); 3,46 dd, 1H, J(1'b,2') = 7,7 (H-1'b). <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O): 153,94 (C-4); 151,54 (C-2); 80,51 d, J(C,P) = 11,7 (C-2'); 65,35 d, J(C,P) = 159,7 (P-C); 60,99 (C-3'); 56,28 (C-6); 46,46 (C-1').

#### EJEMPLO 20 - ensayo anti-VHC/ Ensayo de replicón

Células Huh-5-2 [una línea celular con un replicón de VHC persistente l389luc-ubi-neo/NS3-3'/5.1; replicón con proteína de fusión luciferasa de luciérnaga-ubiquitina-neomicina fosfotransferasa y poliproteína NS3-5B VHC impulsada por EMCV-IRES] se cultivó en medio RPMI (Gibco) suplementado con suero fetal de ternero al 10%, L-glutamina 2 mM (Life Technologies), 1x aminoácidos no esenciales (Life Technologies); 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina y 250 µg/ml de G418 (Geneticina, Life Technologies). Las células se sembraron a una densidad de 7000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos View Plate™ (Packard) en medio que contenía los mismos

componentes que se han descrito anteriormente, excepto por G418. Se dejó que las células se adhiciesen y proliferasen durante 24 h. En ese momento, el medio de cultivo se retiró y se añadieron diluciones sucesivas de los compuestos de ensayo en medio de cultivo que carecía de G418. Se incluyó Interferón alfa 2a (500 IU) como control positivo. Las placas se incubaron adicionalmente a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 72 horas. La replicación del replicón de VHC en células Huh-5 da como resultado actividad de luciferasa en las células. La actividad de luciferasa se mide añadiendo 50 µl de 1 x tampón Glo-lysis (Promega) durante 15 minutos seguida de 50 µl del reactivo del ensayo de luciferasa Steady-Glo (Promega). La actividad de luciferasa se mide con un luminómetro y la señal en cada pocillo individual se expresa como un porcentaje de los cultivos no tratados. Cultivos paralelos de células Huh-5-2, sembradas a una densidad de 7000 células/pocillo de placas de cultivo celular de 96 pocillos convencionales (Becton-Dickinson) se tratan de una manera similar excepto que no se añade tampón Glo-lysis ni reactivo de luciferasa Steady-Glo. En su lugar, la densidad del cultivo se mide por medio del método MTS (Promega).

15 Ejemplo 21 : Síntesis de diisopropil (S)-1-[3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-6- azacitosina

Una mezcla de a sal sódica de 6-azacitosina (1 equivalente molar) y el tosilato synthon 8 (1 equivalente molar) en dimetilformamida se calienta a 90°C con exclusión de humedad durante 5 h. Una porción adicional del tosilato (0,3 equivalentes molares) se añade junto con una cantidad catalítica de carbonato de cesio y el calentamiento continúa a 120°C hasta que se produce una disolución completa. La mezcla de reacción se hizo precipitar, el residuo se coevaporó con tolueno y xileno y se aplica sobre una columna de gel de sílice en el sistema de cloroformo - metanol. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se coevaporaron con etanol absoluto.

25 EJEMPLOS 22 a 24 - síntesis de análogos 6-alkilsustituidos del compuesto de 5-azacitosina 3

El método del ejemplo 1, es decir siguiendo el principio del esquema 1, se repite excepto que 4-amino-1,3,5-triazin-2(1H)-ona como material de partida se sustituye respectivamente por:

- 4-amino-6-metil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (ejemplo 22),
- 30 - 4-amino-6-isopropil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (ejemplo 23), o
- 4-amino-6-(terc-butil)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (ejemplo 24).

Los siguientes compuestos se obtienen con rendimientos similares:

- (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-aza-6-metil-citosina (ejemplo 22),
- (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-aza-6-isopropil-citosina (ejemplo 23), y
- 35 - (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-aza-6-(terc-butil)-citosina (ejemplo 24).

EJEMPLOS 25 a 27 - síntesis alternativa de análogos 6-alkilsustituidos del compuesto de 5-azacitosina 3

El método del ejemplo 2, es decir siguiendo el principio del esquema 3, se repite excepto que la sal sódica de 4-amino-1,3,5-triazin-2(1H)-ona como material de partida en la

etapa (f) se sustituye respectivamente por las sales sódicas de:

- 4-amino-6-metil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (ejemplo 25),
- 4-amino-6-isopropil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (ejemplo 26), o
- 4-amino-6-(terc-butil)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (ejemplo 27).

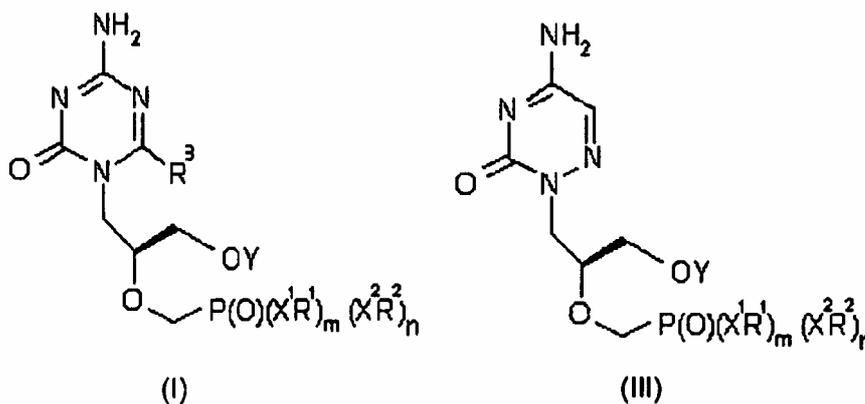
5 Los análogos 6-alkilsustituídos del compuesto 3 se obtienen con rendimientos similares.

**EJEMPLO 28 - síntesis del análogo de 6-azacitosina del compuesto 3**

10 El método del ejemplo 1, i.e. es decir siguiendo el principio del esquema 1, se repite excepto que 4-amino-1,3,5-triazin-2(1H)-ona como material de partida se sustituye por 4-amino-1,2,4-triazin-2(1H)-ona. El análogo de 6-azacitosina del compuesto 3 se obtiene con un rendimiento similar.

## REIVINDICACIONES

1. Un derivado de azacitosina de acuerdo con la fórmula estructural (I) o la fórmula (III), una forma estereoquímicamente isomérica, un solvato, una sal, un derivado 5,6-dihidro del mismo:



en la que

- R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C<sub>1-30</sub>, alquenilo C<sub>2-30</sub>, alquinilo C<sub>2-30</sub>, arilo, alquilfenilo C<sub>1-30</sub> y arilalquilo C<sub>1-30</sub> en la que cada uno de dichos alquilo C<sub>1-30</sub>, alquenilo C<sub>2-30</sub> o alquinilo C<sub>2-30</sub> opcionalmente contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por oxígeno, nitrógeno y azufre en la cadena principal y/o está opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo constituido por hidroxilo, oxo y halógeno o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos mediante uno o más enlaces para formar un anillo de cinco, seis o siete miembros que comprende P, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup>, estando dicho anillo opcionalmente condensado con un anillo fenilo;
- X<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo constituido por NR<sup>4</sup> y oxígeno;
- X<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo constituido por NR<sup>5</sup> y oxígeno;
- R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C<sub>1-30</sub>, alquenilo C<sub>2-30</sub> y alquinilo C<sub>2-30</sub>, en la que cada uno de dichos alquilo C<sub>1-30</sub>, alquenilo C<sub>2-30</sub> o alquinilo C<sub>2-30</sub> opcionalmente contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por oxígeno, nitrógeno y azufre en la cadena principal y/o está opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo constituido por hidroxilo y halógeno;
- Y es hidrógeno o es un enlace que une oxígeno a fósforo para formar un éster de ácido fosfónico cíclico de seis miembros;
- cada uno de m y n es 1 cuando Y es hidrógeno, o uno de m y n es 1 y el otro de m y n es 0 cuando Y es un enlace que une oxígeno a fósforo para formar un éster de ácido fosfónico cíclico de 6 miembros;

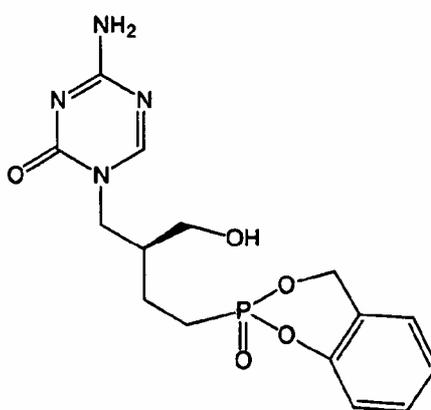
- R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, amino, hidroxilo, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R, CONH<sub>2</sub>, NR<sub>2</sub>, CONR<sub>2</sub>; y
  - R es un alquilo C<sub>1-30</sub>.
- 5 2. Un derivado 5-azacitosina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
- R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por hidrógeno y alquilo C<sub>1-30</sub>, conteniendo dicho alquilo C<sub>1-30</sub> opcionalmente uno o más oxígenos en la cadena principal y/o está opcionalmente sustituida por un oxo o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos mediante uno o más enlaces para formar un anillo de seis miembros que
- 10 comprende P, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup>, estando dicho anillo opcionalmente condensado con un anillo fenilo.
- X<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo constituido por NR<sup>4</sup> y oxígeno;
  - X<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo constituido por NR<sup>5</sup> y oxígeno;
  - R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por
- 15 hidrógeno, alquilo C<sub>1-30</sub>;
- Y es hidrógeno o es un enlace que une oxígeno a fósforo para formar un éster de ácido fosfónico cíclico de seis miembros;
  - cada uno de m y n es 1 cuando Y es hidrógeno, o uno de m y n es 1 y el otro de m y n es 0 cuando Y es un enlace que une oxígeno a fósforo para formar un éster de
- 20 ácido fosfónico cíclico de 6 miembros; y
- R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, amino, hidroxilo, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R, CONH<sub>2</sub>, NR<sub>2</sub>, CONR<sub>2</sub>, y
  - R es un alquilo C<sub>1-30</sub>.
- 25 3. Un derivado de 5-azacitosina de acuerdo con la fórmula estructural (I) de la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo constituido por:
- éster bis(hexadeciloxietílico) de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina,
  - éster cis(octadecílico) de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina,
- 30 - éster bis(pivaloiloximetílico) de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina,
- éster mono(hexadeciloxietílico) de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina,
  - éster mono(octadecílico) de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina,
- 35 - éster mono(pivaloiloximetílico) de (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]-5-azacitosina,
- éster hexadeciloxietílico de 1-[[[(5S)-2-hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina,
  - éster octadecílico de 1-[[[(5S)-2-hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-

azacitosina, y

- éster pivaloiloximetílico de 1-[[5(5S)-2-hidroxi-2-oxido-1,4,2-dioxafosfinan-5-il]metil]-5-azacitosina,
- (S)-1-[3-hidroxi-2-fosfonometoxipropil]-5-azacitosina, formas estereoquímicamente isoméricas, solvatos, sales, o derivados 5,6-dihidro de la misma.

5

4. Un derivado de 5-azacitosina de acuerdo con la fórmula estructural (I) de la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural (IV), una forma estereoquímicamente isomérica, un solvato, o una sal del mismo:



(IV)

10

5. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección vírica y/o un trastorno de proliferación celular inducido por un virus en un mamífero.

15

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la infección vírica es una infección por un virus de ADN.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el virus de ADN es un virus de la familia *Herpesviridae*, *Poxviridae* o *Papillomaviridae*.

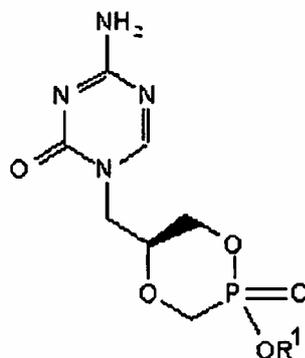
20

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el virus es virus del herpes simple, citomegalovirus o virus de la varicela-zóster, o virus de la viruela o virus del papiloma humano.

25

9. Un derivado de 5-azacitosina de acuerdo con la fórmula estructural (I) de la reivindicación 1, en el que Y es un enlace que une oxígeno a fósforo para formar un éster de ácido fosfónico cíclico de 6 miembros, m es 1 y n es 0, que está representado por la fórmula

estructural:



- 5 en la que R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C<sub>1-30</sub>, alquenilo C<sub>2-30</sub> y alquinilo C<sub>2-30</sub>, en la que cada uno de dichos alquilo C<sub>1-30</sub>, alquenilo C<sub>2-30</sub> o alquinilo C<sub>2-30</sub> opcionalmente contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por oxígeno, nitrógeno y azufre en la cadena principal y/o está opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo constituido por hidróxido y halógeno.
- 10 10. Un producto de apertura de anillo de 1,3,5-triazina de un derivado de 5-azacitosina de acuerdo con la fórmula estructural (I) de la reivindicación 1, que se obtiene haciendo reaccionar a dicho derivado con un tampón de trialquilamonio.
- 15 11. Un producto de apertura de anillo de 1,3,5-triazina de acuerdo con la reivindicación 10, que es 3-formil-2-[[2S]-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]carbamoil}guanidina.
- 20 12. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección vírica y/o un trastorno de proliferación celular inducido por un virus en un mamífero.
- 25 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la infección vírica es una infección por un virus de ADN.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el virus de ADN es un virus de la familia *Herpesviridae*, *Poxviridae* o *Papillomaviridae*.
- 30 15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 10 u 11, mezclado con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

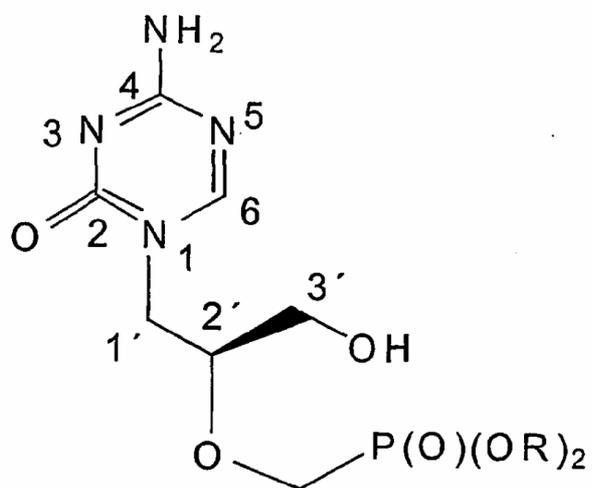


Figura 1

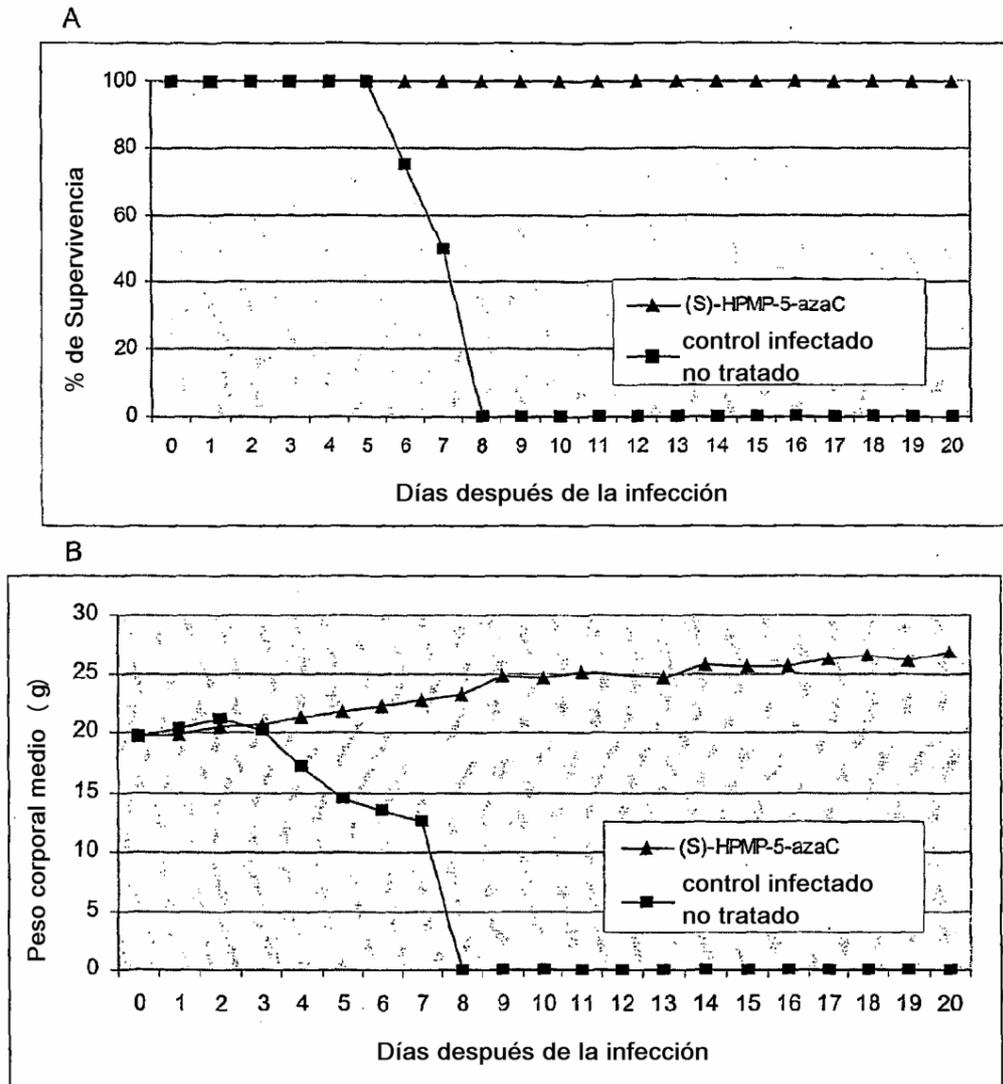


Figura 2

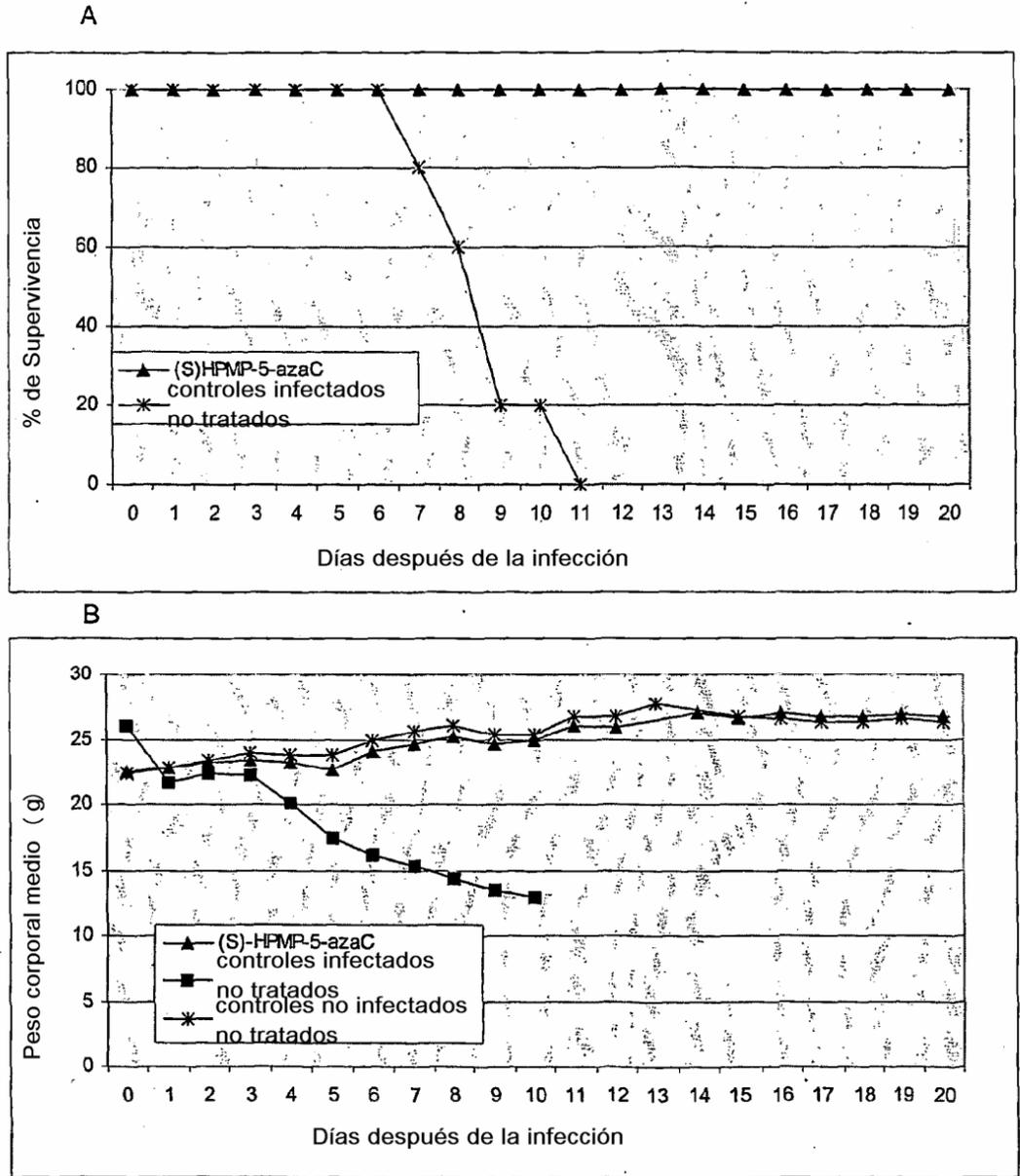


Figura 3

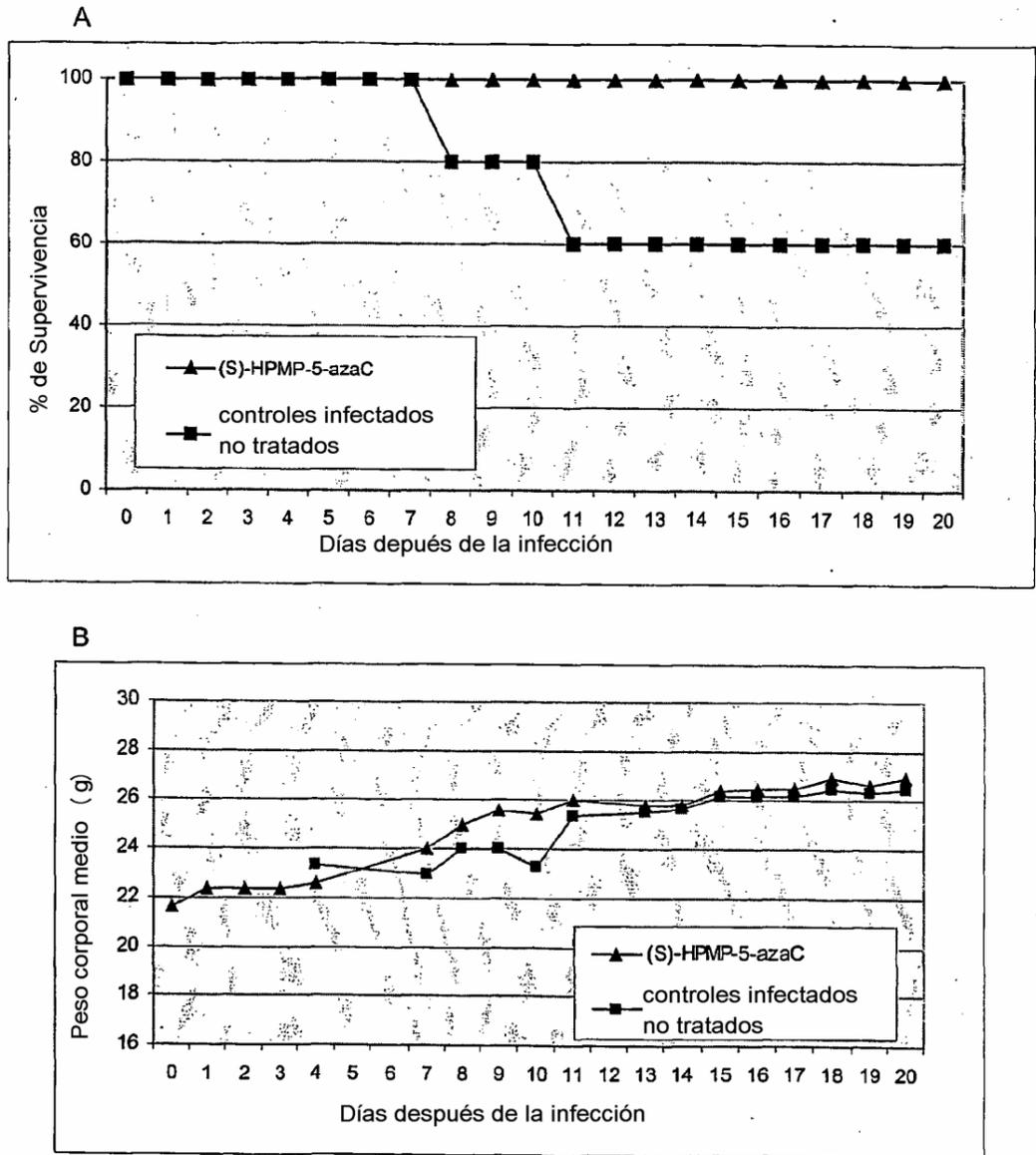


Figura 4

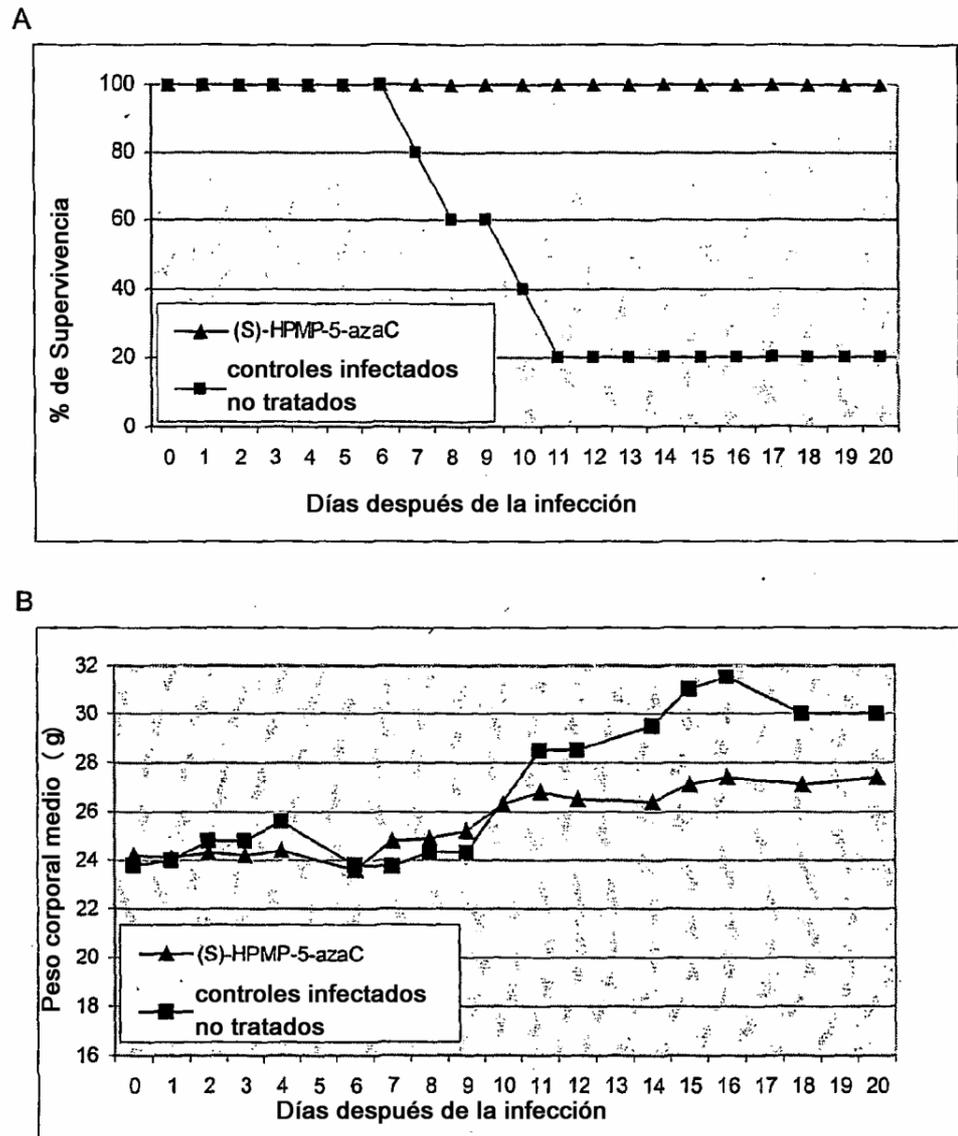


Figura 5

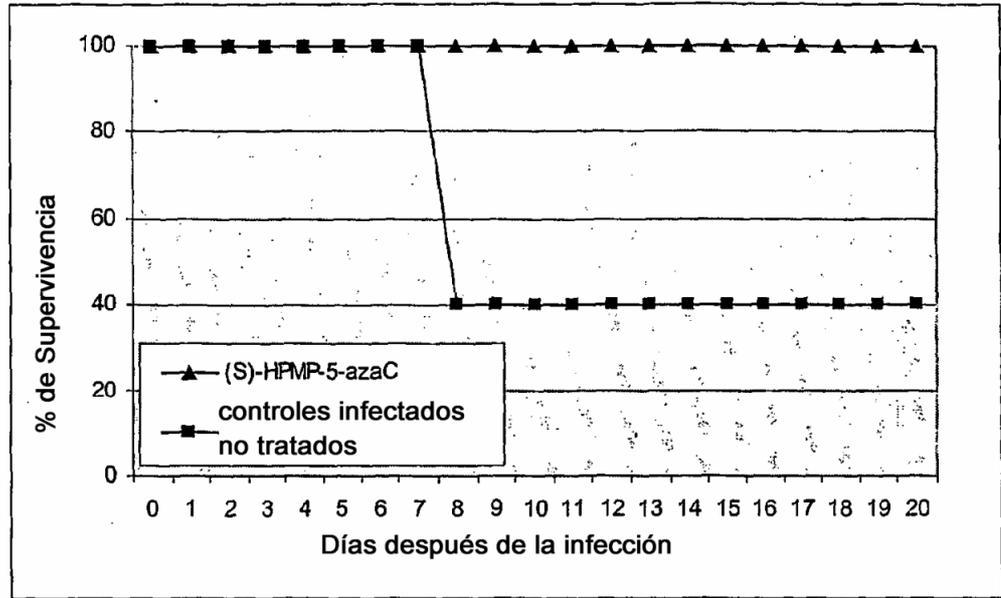


Figura 6

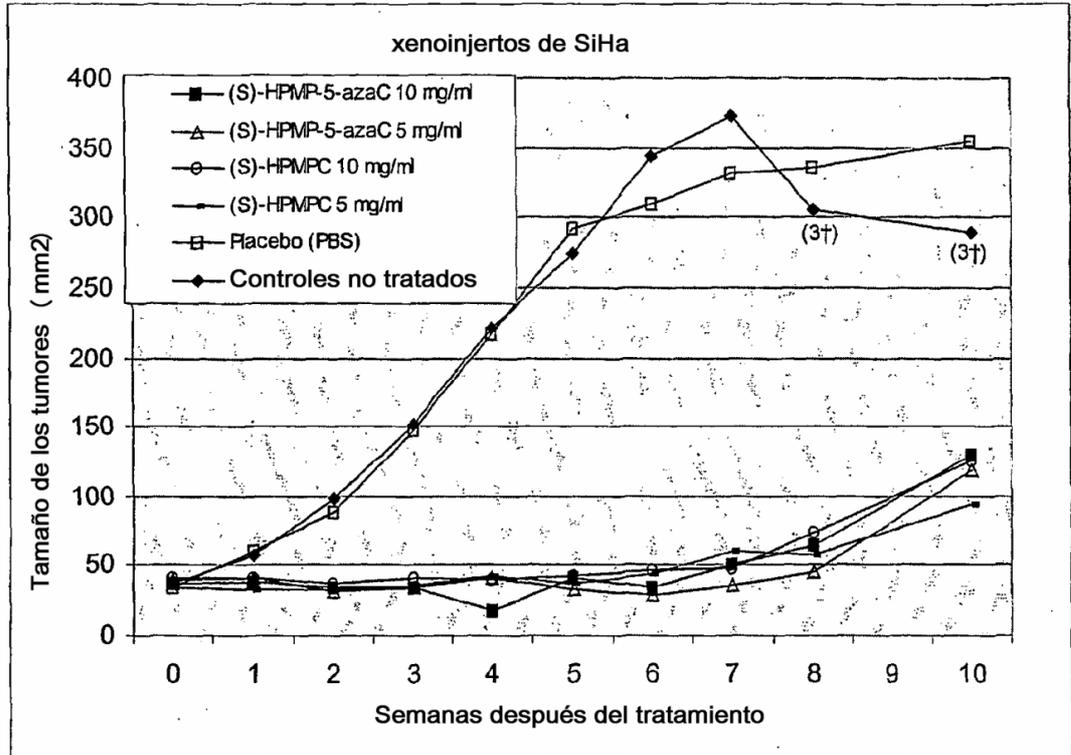


Figura 7

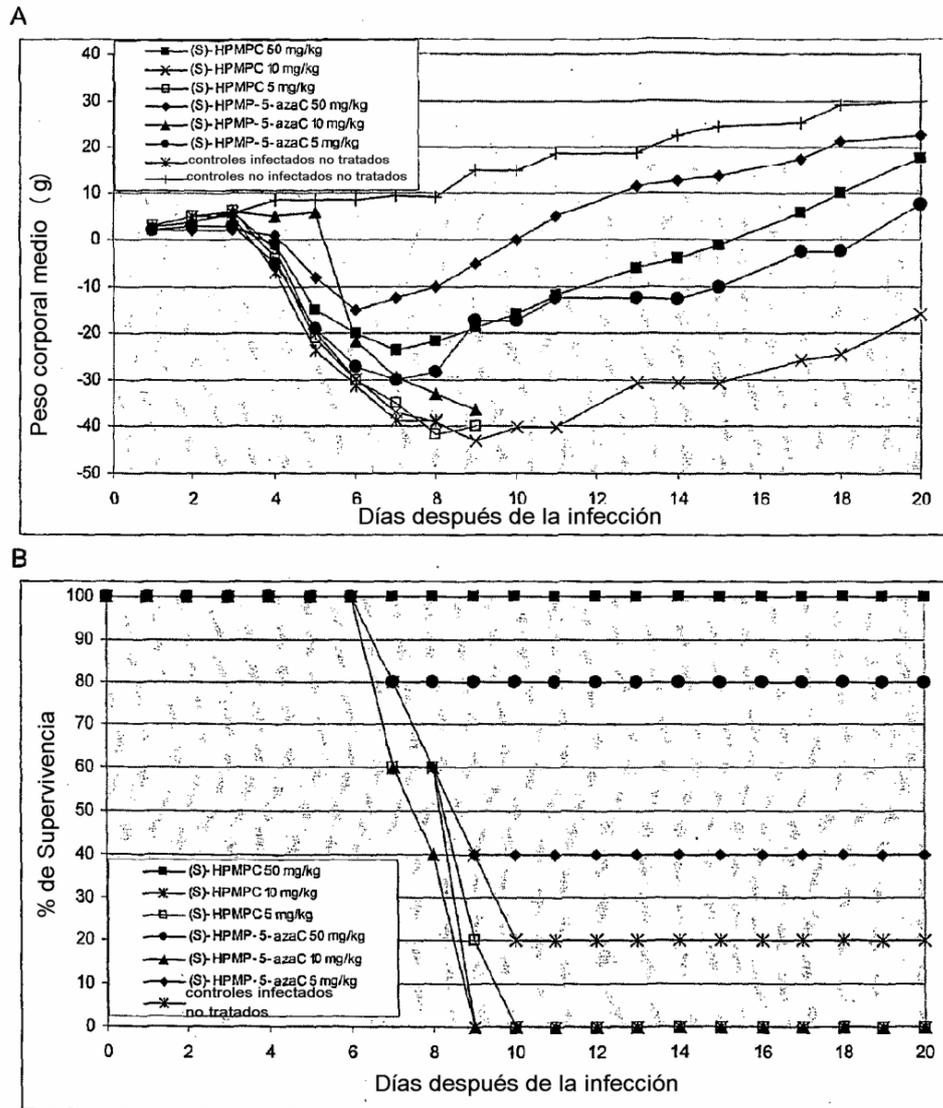
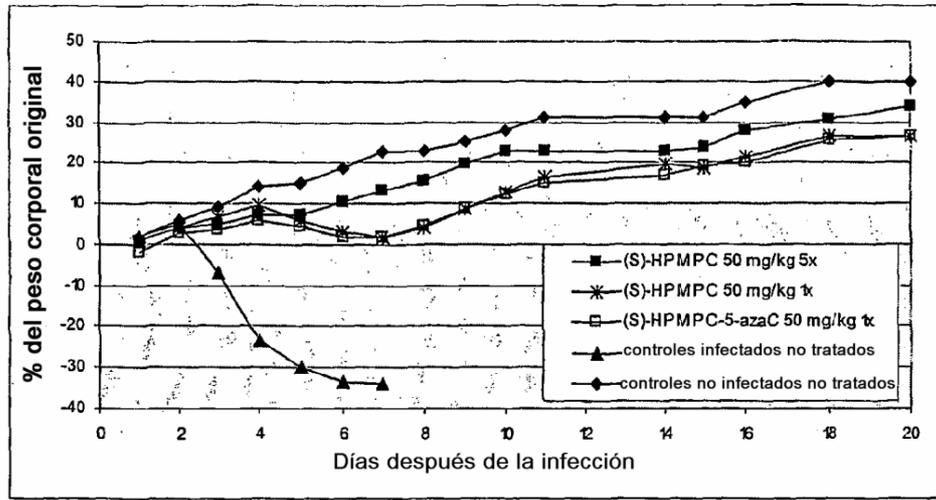


Figura 8

A



B

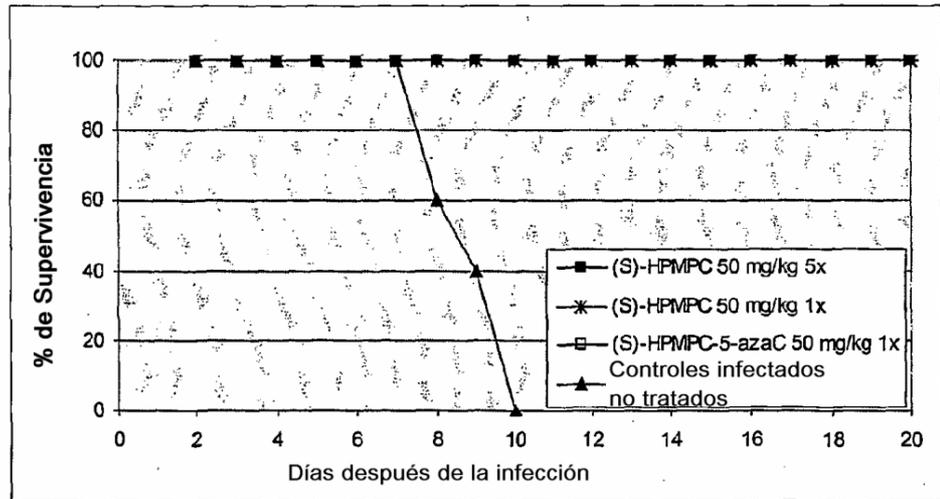
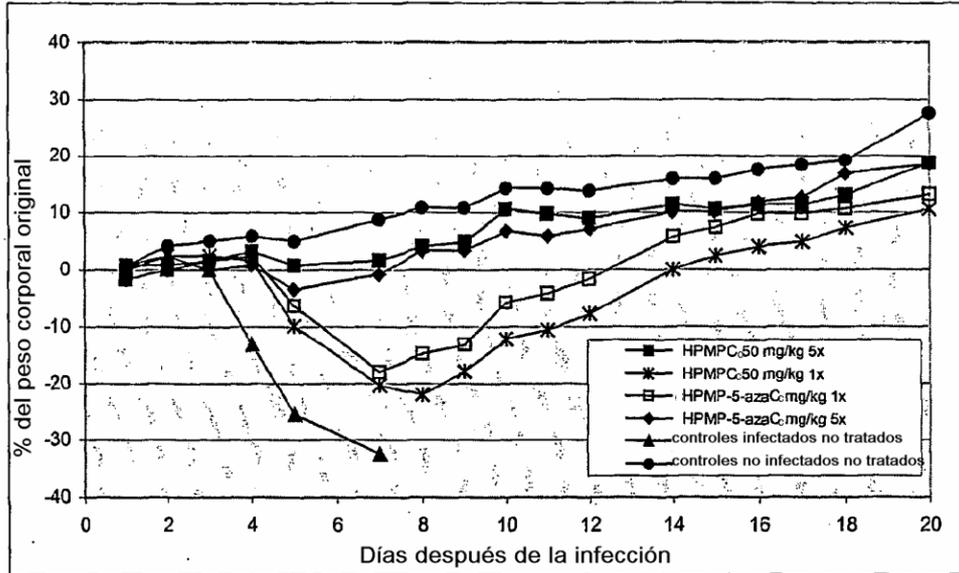


Figura 9

A



B

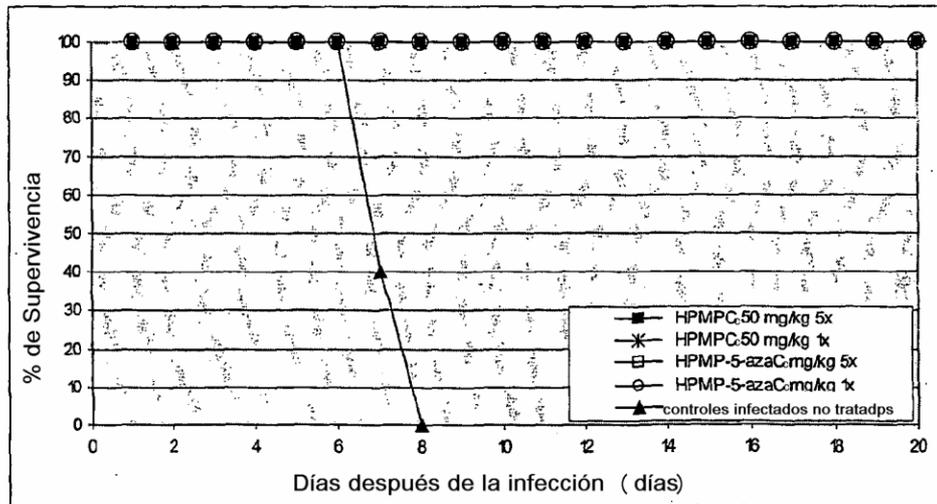


Figura 10

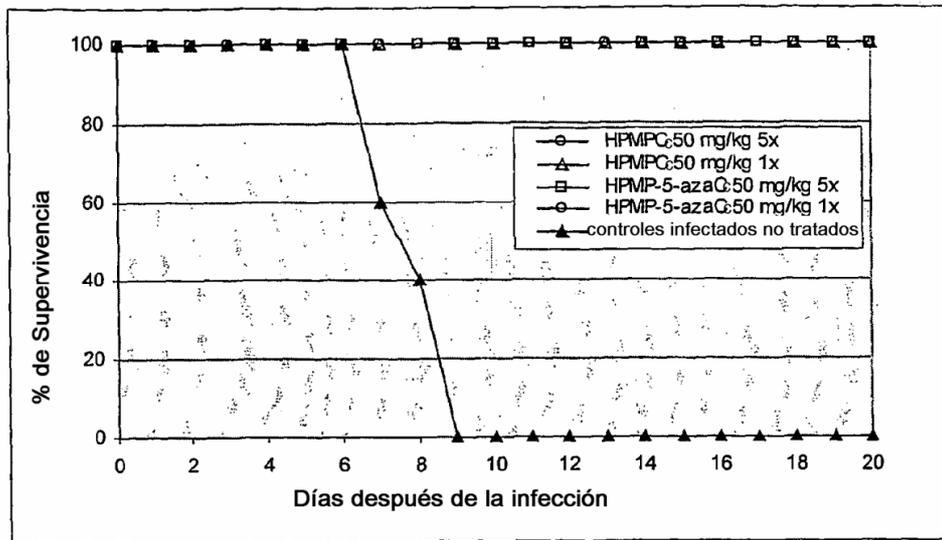
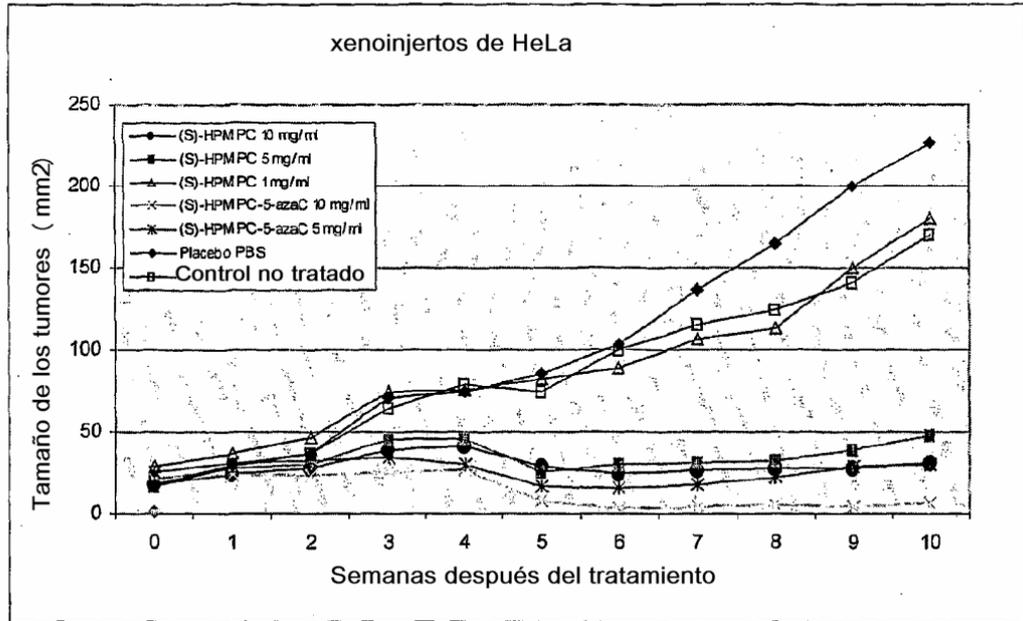


Figura 11

A



B

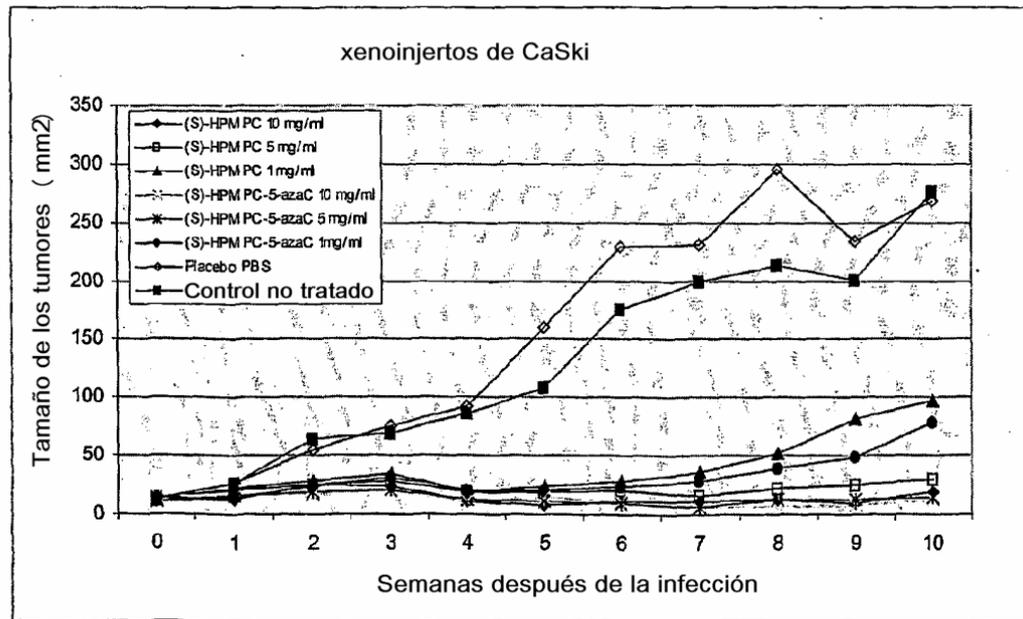


Figura 12

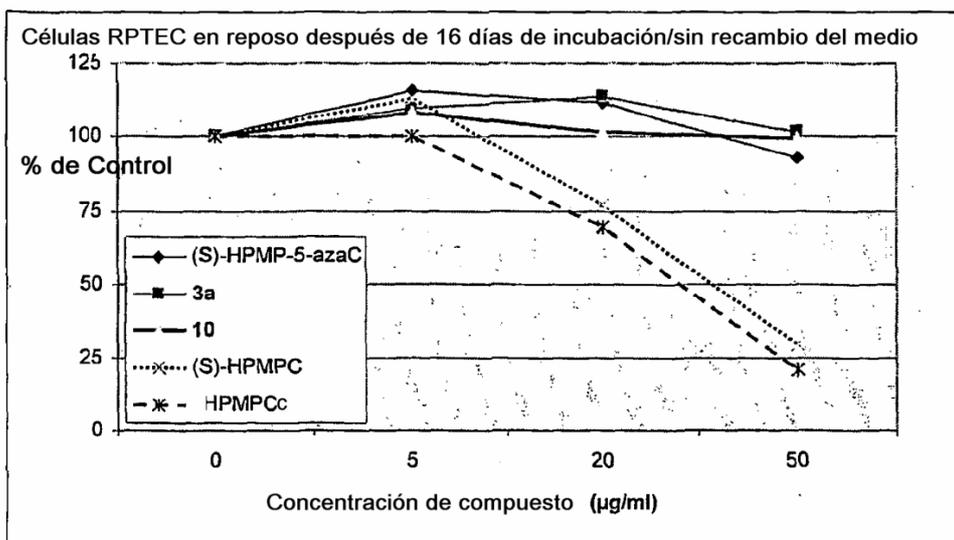


Figura 13