

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 743**

51 Int. Cl.:  
**C07D 493/04** (2006.01)  
**A61K 31/513** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06777595 .7**  
96 Fecha de presentación: **05.07.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1899352**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **DERIVADOS DE 1-[2',3'-DIDEOXY-3'C-(HIDROXIMETIL)-BETA-D-ERITRO-PENTOFURANOSIL]CITOSINA COMO INHIBIDORES DE VIH.**

30 Prioridad:  
**07.07.2005 GB 0513835**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.02.2012**

73 Titular/es:  
**MEDIVIR AB**  
**LUNASTIGEN 7**  
**141 44 HUDDINGE, SE**

72 Inventor/es:  
**ZHOU, Xiao-Xiong y**  
**SAHLBERG, Christer**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 743 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 1- [2',3'-dideoxy-3'-c-(hidroximetil)-beta-d-eritro-pentofuranosil]citosina como inhibidores de VIH

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de tetrahidrofurano bicíclicos y su uso en el tratamiento de retrovirus tales como VIH, especialmente mutaciones de escape de fármacos.

**Antecedentes de la técnica**

10 A diferencia de otros antivirales de VIH, tales como inhibidores de proteasa o inhibidores de transcriptasa inversa no nucleosídicos, los inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos (NRTI) son farmacológicamente inactivos en su forma administrada y requieren fosforilación por quinasas celulares del huésped para producir el metabolito trifosfato activo. Esta forma de trifosfato se asemeja a los sustratos desoxinucleótido trifosfatos de origen natural de la transcriptasa inversa viral y compiten por unión a RT de VIH-1 e incorporación al ADN viral.

15 Todas las NRTI aprobadas para el tratamiento de VIH, y la amplia mayoría de todas las demás NRTI propuestas en la bibliografía de patentes o académica, carecen de un función 3'-hidroxi en el resto de ribosa del nucleósido. Los ejemplos incluyen zidovudina (AZT), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), zalcitabina (ddC), abacavir (ABC), didanosina (ddI) y tenofovir (TNF) (administrándose esta última típicamente como el profármaco disoproxil fumarato). Tras la fosforilación, un análogo de nucleósido o nucleótido tal se une covalentemente por la enzima transcriptasa inversa a la cadena de ADN naciente, pero la falta de una función 3'-hidroxilo en el nucleósido o nucleótido evita más unión de nucleótidos adicionales. Estos NRTI terminan por lo tanto la prolongación de cadena de ADN viral, conduciendo de este modo a la inhibición de replicación de VIH (Mitsuya y col. 1990, Jacob Molina y col. 1993, Reardon 1993).

20 El fundamento de todas las terapias antirretrovirales actuales (ART) es el uso de NRTI. Los NRTI, sin embargo, sólo son capaces de retardar la propagación de VIH en el torrente sanguíneo y hasta la fecha han sido incapaces de erradicar VIH de los pacientes. VIH actúa insertando su ADN en células huésped latentes implicadas en la memoria inmunológica humana. Este modo de infección implica que los pacientes están obligados a tomar antivirales de VIH de por vida para evitar que la titulación de VIH rebote después de que la terapia haya terminado.

25 En la práctica, sin embargo, el período de administración eficaz de un fármaco de VIH particular para un paciente dado está limitado drásticamente por la aparición de "mutantes de escape". Un mutante de escape es un virus que contiene un grupo discreto de mutaciones que produce resistencia a fármacos y le permite proliferar en presencia del fármaco. Los mutantes de escape surgen en un paciente debido a la presión selectiva del antiviral o antivirales particulares que el paciente está tomando. Como consecuencia, un período de administración eficaz del fármaco depende de lo rápido que se induzcan y proliferen los mutantes de escape.

30 En países que prescriben sistemáticamente antivirales de VIH está resultando cada vez más evidente que la infección primaria en nuevos casos de VIH con frecuencia no es con VIH de tipo silvestre, sino en su lugar con una cepa de VIH que ya es parcialmente o de forma múltiple resistente a los antivirales actuales. En otras palabras, los mutantes de escape que se han generado *in situ* en pacientes infectados pueden también extenderse a pacientes sin tratamiento previo por transmisión lateral o vertical. Esto a su vez significa que incluso algunos pacientes que de otro modo se clasificarían como sin tratamiento previo ya están infectados con virus resistente a terapias de primera línea convencionales.

35 Múltiples factores contribuyen a la selección de mutantes de escape de fármacos incluyendo el tamaño de grupo de VIH total, la capacidad de procesamiento de RT y la infidelidad de la replicación genómica viral, el estado físico viral y múltiples disponibilidades de células diana. A finales de los años 90, las pruebas de uso a largo plazo de combinaciones basadas en zidovudina (AZT) o estavudina (d4T) sugirieron que se generaban sistemáticamente grupos de mutaciones particulares en la RT. Estos grupos de mutaciones son el prototipo conocido ahora como mutaciones análogas de timidina (TAM). La presencia de las TAM potenció la probabilidad de seleccionar mutaciones adicionales y condujo al desarrollo de fenotipos de resistencia en NRTI más avanzados que no estaban claramente dentro de la familia de análogos de timidina. Tales fenotipos se conocen ahora como VIH de mutación análoga de nucleósidos (NAM) y resistencia a fármaco múltiple (MDR).

**Hipótesis de resistencia a NRTI**

40 AZT fue el primer antirretroviral usado ampliamente y no resulta sorprendente que fuera el primero en generar mutantes de escape (Larder y col., 1989). Sin embargo a la vista del gran número de mutaciones por todo el genoma de VIH en aislados de paciente típicos no es posible producir el fenotipo de resistencia *in vitro* usando una enzima RT recombinante que porte la TAM particular. Como consecuencia, los mecanismos a través de los cuales TAM confiere resistencia no han sido fáciles de elucidar.

45 Diversos modelos hipotéticos y predicciones teóricas para el mecanismo tras la resistencia de TAM se han basado en la implicación de ataque nucleófilo por un donador de pirofosfato (Boyer y col., 2002 y Meyer y col., 2002).

Supuestamente la teoría de translocación de RT es una etapa clave en el entendimiento del mecanismo de resistencia asociado a TAM. Este, sin embargo, se entendió escasamente hasta el final de 2002 debido a que los intermedios de RT pre y post-translocación son transitorios y de vida corta y no se accede a ellos fácilmente por vía experimental.

5 El entendimiento moderno de la teoría de translocación de RT sostiene que la polimerización de ADN catalizada por RT tiene lugar de una manera de cascada detallada como se ilustra en la Fig. 3, que se adopta de Sarafianos y col (2003). Estas etapas son

- 1) La unión del sustrato de ADN por enzima E libre posiciona el extremo de cebador 3' en el sitio P (sitio del cebador).
- 10 2) La unión de un dNTP cerca del sitio N (sitio de dNTP) forma un complejo ternario "abierto".
- 3) Un complejo ternario "cerrado" se forma por cambios conformacionales de enzima.
- 4) La formación de enlace fosfodiéster entre el extremo de cebador 3'-OH terminal y el fosfato alfa del dNTP está acompañado de liberación de pirofosfato (PPi) para formar el complejo de RT pre-translocado en el sitio N.
- 15 5) Translocación del extremo del cebador del sitio N al sitio P formando un complejo post-translocado que es un pre-requisito para la siguiente unión de dNTP y continuación de síntesis de ADN.

20 Si se usa un nucleósido trifosfato terminador de cadena de ADN (NRTI) (típicamente un análogo de nucleósido sin una función 3'-hidroxi en el resto de desoxirribosa) imita a su homólogo de dNTP natural y se une a RT. Después del procesamiento químico análogo, el NRTI incorporado forma un complejo de pre-translocación en el sitio N de polimerización. Esto termina la síntesis de ADN adicional debido a la falta de un cebador 3'-hidroxilo en el resto de desoxirribosa de NRTI.

25 Por el contrario, las mutaciones de RT relacionadas con TAM emplean un mecanismo de incorporación de nucleótidos diferente en comparación con RT de tipo silvestre. Específicamente, el nuevo mecanismo da como resultado la liberación (escisión) del NRTI incorporado en el extremo del cebador, anulando la actividad de terminación de cadena del NRTI. Este nuevo mecanismo depende de la interacción entre la acumulación de complejos en estados pre-translocados (en el sitio N) y la disponibilidad de donadores de ATP o pirofosfato, que con frecuencia son abundantes en el sitio de infección, es decir, linfocitos normales.

30 El ATP o pirofosfato no participa normalmente en reacciones de polimerización de ADN viral, pero la estructura de una RT que expresa un fenotipo resistente relacionado con TAM facilita su entrada en un sitio adyacente a un NRTI de nueva incorporación. El equilibrio entre especies cinéticas pre y post-translocacionales proporciona un mecanismo para asegurar el acceso libre del extremo del cebador al sitio N y también permite la unión simultánea del ATP donador de pirofosfato en el sitio P después de la incorporación del terminador de cadena de NRTI y la liberación de pirofosfato. Cuando esto sucede, el ATP (o pirofosfato) ataca el enlace fosfodiéster que enlaza el NRTI incorporado en el extremo del ADN, dando como resultado la retirada del NRTI mediante pirofosforólisis. Cuando el donador de pirofosfato es ATP, el NRTI se libera como un producto de dinucleósido tetrafosfato. La Fig. 4 ilustra este "rescate de cebador" en un ADN terminado por AZT (adoptado de ClinicCareOptions™).

35 Se cree ahora que dos mecanismos distintos están implicados en la resistencia fenotípica a NRTI (Sluis Cremer y col, 2000). El primero, conocido como actividad de "rescate de cebador", se ha descrito inmediatamente antes. Aquí, el nucleótido terminador de cadena se retira del extremo 3' del extremo del cebador a través de fosforólisis dependiente de ATP o dependiente de pirofosfato. Existe, sin embargo, otro grupo de fenotipos de resistencia indicados como "mutantes diferenciadores". Estos mutantes tienen una RT con capacidad potenciada para diferenciar entre NRTI y dNTP nativos. En este caso, el mecanismo conduce a RT que es capaz de seleccionar preferentemente el sustrato correcto (es decir, dNTP nativo), evitando de este modo la terminación de cadena por un NRTI y asegurando la propagación del genoma viral.

#### 45 *Generación de mutaciones en VIH*

Los retrovirus tales como VIH tienen el potencial de diversificación genética rápida. Aunque este es un proceso energéticamente ineficaz, ofrece claras ventajas adaptativas para el organismo. La maquinaria de replicación usada por VIH es particularmente tendiente a errores, genera un gran número de mutaciones y tiene el potencial de conducir a acumulación de mutaciones cuando el organismo está bajo presión selectiva.

50 En general, la amplia mayoría de mutaciones generadas por replicación viral dan como resultado enzimas menos viables. Aquí, la acumulación de una segunda y especialmente una tercera mutación es menos probable debido a que el grupo de población para el mutante menos viable, dentro del que debe acumularse la segunda mutación, se diluirá por el organismo de tipo silvestre de multiplicación más rápida. Sin embargo pueden surgir mutantes virales más viables y expandirse por dos rutas posibles. La primera se produce cuando hay un rápido crecimiento de una variante altamente resistente que ya está presente en la población viral global. Más frecuentemente esta es una mutación puntual sencilla que confiere resistencia fenotípica a una presión selectiva. En el contexto de mutaciones de escape de fármacos los ejemplos incluyen K103 inducida rápidamente por el inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídica nevirapina.

La segunda ruta se produce cuando hay replicación viral continuada en presencia de presión selectiva. Esto permite la acumulación progresiva de mutaciones que pueden después expandirse. En este caso, la probabilidad de acumulación de mutación se relaciona con la cantidad de replicación del virus que se produce. Es decir, a cargas virales más altas (por ejemplo, > 200.000 copias/ml), pueden producirse acumulaciones de dobles mutaciones. La acumulación de triples mutaciones, sin embargo, es poco común y puede resultar solamente como consecuencia de un régimen terapéutico complejo, que implica típicamente varios fármacos diferentes, que es difícil de seguir por el paciente. Es por lo tanto extremadamente difícil para incluso un paciente diligente asegurar que todos los principios activos están presentes en la sangre a niveles por encima de las concentraciones inhibitorias necesarias durante el período de 24 horas completo de cada día "nivel valle de 24 horas". Aquí, la retirada temporal de una cualquiera de las presiones selectivas del tratamiento de fármaco debido a fallos en la administración/nivel valle de 24 horas de uno o más fármacos permite replicación viral incontrolada, permitiendo de este modo la generación y establecimiento de muchos mutantes nuevos. Cuando la presión selectiva se aplica de nuevo (es decir, reanudación de la terapia de fármaco compleja), los pocos nuevos mutantes que han acumulado otra mutación puntual que confiere mejor resistencia a fármacos pueden expandirse de una manera similar a la vista para la primera ruta (véase anteriormente).

El análisis anterior se centra en la acumulación de mutaciones puntuales a diferencia de, por ejemplo, mutaciones de delección o adición. Aquí, sin embargo, es aplicable un escenario similar al descrito para una mutación triple. Es decir, la mayoría de las mutaciones de delección/adición implican inicialmente un nucleótido sencillo. Esto tiene el efecto de alterar completamente la secuencia de aminoácidos cadena abajo de la proteína codificada si el cambio se produce dentro de la región codificante y conduce a una proteína truncada y/o inactiva. Para conservar la fase de lectura y alterar la proteína final por la delección o adición de un aminoácido sencillo, deben deleccionarse/añadirse tres nucleótidos. Puesto que las enzimas inactivas reducen la viabilidad de un organismo de VIH, particularmente si la enzima afectada es RT, la delección/adiciones no se acumularán por sí mismas, pero deben producirse simultáneamente. En otras palabras el equivalente de una mutación triple debe producirse en un acontecimiento sencillo, lo que es muy poco habitual (véase Boyer y col (2004) J Virol 78(18):9987-9997).

Como consecuencia de este proceso para acumulación/introducción de mutante triple, no ha sido hasta un momento relativamente reciente que se ha establecido el virus VIH que muestra al menos tres mutaciones en RT que crea resistencia particularmente potente a fármacos múltiples. Por ejemplo, en los Estados Unidos fue en 1992 cuando la FDA aprobó el uso de terapia farmacológica de combinación (ddC y AZT). Sin embargo no fue hasta septiembre de 1995 que los ensayos clínicos mostraron que la combinación de AZT con ddC o ddl era más eficaz que AZT por sí sola. Ha sido sólo como resultado del uso de terapias de combinación, en las que se emplean múltiples fármacos, pero en regímenes de dosificación de hecho incapaces de garantizar un nivel valle de 24 horas adecuado de los fármacos respectivos, que las cepas particularmente problemáticas de virus VIH multirresistentes conocidas en el mundo occidental en la actualidad se han generado.

#### *Mutaciones de rescate de cebador*

El mutante de rescate de cebador de TAM originalmente descrito comprendía diversas permutaciones dentro de un grupo de seis fenotipos resistentes a fármaco en las posiciones de aminoácidos M41 L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E en RT (Larder y Kemp, 1989, Schinazi y col., 2000). Los datos tempranos apuntaban a dos rutas de mutación distintivas para el desarrollo de mutantes de rescate de cebador de TAM múltiples, produciéndose ambas por factores desconocidos. La primera ruta dio como resultado una sustitución de aminoácido en el codón 210 (210W) y se asoció preferentemente con mutaciones en los codones 41 (41 L; mayor de 98 %) y 215 (215Y; mayor de 94 %) así como una sustitución en el codón 67 (67N). La segunda ruta generó una mutación en el codón 219 (219 K/E), que se asoció preferentemente con mutaciones en los codones 67 (67N) y 70 (70R) (Yahi y col, 1999). Hubo por lo tanto dos patrones fenotípicos: (1) L210W, M41 L, T215Y/F, ± D67N, que confería altos niveles de resistencia viral a AZT y d4T y (2) K219K/E, D67N, K70R, que confería niveles moderados de resistencia viral a AZT y d4T.

Marcelin y col (2004) resumieron la prevalencia de mutaciones relacionadas con el rescate de cebador de TAM en pacientes con fracaso virológico. Aquí, se investigaron 1098 secuencias de RT y proporcionaron dos patrones genotípicos como se indica en la Fig. 1 y Fig. 2. Aunque pueden haber estado presentes diferentes fondos genéticos antes de la terapia, la secuencia y composición de la terapia antirretroviral emprendida cuando se combina con diferencias individuales en farmacología da como resultado resistencia viral no sólo a AZT y d4T sino también a otros NRTI. Dependiendo del patrón mutacional presente, la resistencia a fármacos incluyó abacavir (ABC), didanosina (ddl), tenofovir (TNF), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC) y zalcitabina (ddC). Por lo tanto, la aparición de TAM relacionadas con rescate de cebador con frecuencia desempeña un papel importante en el desarrollo adicional de patrones genotípicos de VIH resistentes de forma más pronunciada. Por lo tanto, una etapa en la prevención de resistencia a nucleósidos múltiple es desarrollar un nuevo NRTI con el objetivo de evitar la acumulación de TAM relacionados con rescate de cebador.

Las mutaciones de TAM relacionadas con rescate de cebador pueden evolucionar conjuntamente con otras familias de mutantes de escape que típicamente surgen de terapia antirretroviral de combinación (conocida de otro modo como terapia de cóctel). En la actualidad, el cóctel "combivir" (AZT + 3TC) es el régimen de terapia de primera línea más frecuentemente usado y recomendado para el tratamiento de pacientes con VIH sin tratamiento previo.

Conduce, sin embargo, a mutantes de escape que son resistentes a ambos fármacos. Por ejemplo, Miller y col (1998) indicó que se seleccionó virus resistente a 3TC con una mutación M184V solo 4-12 semanas después del inicio de la terapia de combinación de AZT + 3TC. Con el tiempo, surgieron gradualmente mutaciones asociadas con AZT adicionales, que proporcionan un patrón genotípico característico de M184V, M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E que se halla habitualmente en pacientes con experiencia en tratamiento en la actualidad. Se ha indicado que mutaciones adicionales en RT en las posiciones H208, R211 y L214 (Sturmer y col, 2003) y en la posición G333 (Kemp y col. 1998) están implicadas en resistencia doble a AZT-3TC y, en particular, que confieren un aumento de la capacidad para resistir AZT. Por lo tanto, el contexto genotípico de las TAM relacionadas con rescate de cebador se ha expandido para incluir permutaciones dentro de M184V, M41 L, D67N, K70R, H208Y, L210W, R211K, L214F, T215Y/F, K219Q/E y G333E.

Otros tipos de mutaciones generalmente vistos en pacientes con experiencia en tratamiento son V118I y E44D/A. Estas mutaciones están fuertemente correlacionadas con exposición previa a ddI y d4T. Además, con frecuencia se asocian con la presencia de grupos de TAM específicos incluyendo M41 L más T215Y/F o D67N más L210W. El resultado es aumento de la resistencia de TAM relacionada con rescate de cebador a la familia de análogos de timidina así como un papel característico en el resistente dual a AZT + 3TC (Montes y col, 2002, Girouard y col., 2003).

La prevalencia de mutantes de escape de fármaco aumenta en función del número de NRTI usados durante el transcurso de la terapia y forma un patrón de TAM o NAM expandidas que comprenden diversas permutaciones dentro de M41 L, E44D/A, D67N, K70R, V118I, M184V, H208Y, L210W, R211K, L214F, T215Y/F, K219Q/E y G333E. Este grupo también es habitualmente refractario a terapias de combinación que contienen AZT y d4T y tiene resistencia cruzada a la clase completa de NRTI.

También se encuentra resistencia significativa a análogos de timidina, notablemente AZT, d4T y TNF, en mutantes de escape que tienen una delección de aminoácidos en la posición 67 (▲67) en la región de dedo de RT con frecuencia en asociación con una sustitución de aminoácido en T69G conjuntamente con TAM (véase Imamichi y col, 2000 y 2001). Se ha propuesto que una actividad de polimerización de RT potenciada, que se asocia con este genotipo particular, da como resultado escisión de cebador dependiente de pirofosforólisis más eficaz (descrito anteriormente), que conduce al aumento de resistencia. Boyer y col., (2004) también han observado que ▲67 conjuntamente con TAM confirió una capacidad aumentada para facilitar la resistencia viral de rescate de cebador (escisión) a AZT y a TNF en comparado con TAM solamente.

VIH co-evolucionan a medida que se desarrolla la terapia antirretroviral. Surgieron nuevos fenotipos de mutación cuando se emplearon cócteles análogos de dobles y triples nucleósidos en el tratamiento clínico de VIH, especialmente en pacientes sin tratamiento previo. Los regímenes terapéuticos complejos, que requieren múltiples fármacos tomados en diversos momentos a lo largo del día, algunos con y otros sin alimentos, son difíciles para los pacientes. La falta de conformidad exacta con estos regímenes de dosificación que conducen a fracasos de valle de 24 horas ha facilitado la aparición de múltiples virus VIH resistentes a NRTI, predominantemente como resultado de NAM o MDR adquiridas por el virus. Por ejemplo, varios grupos (por ejemplo, Mas y col, 2000) han observado la aparición del virus mutante T69S-XX asociado con uso de AZT. Este mutante tiene una inserción de 6 pb en la región codificante de su RT entre los ácidos nucleicos que especifican los aminoácidos 69 y 70. Los complejos de doble inserción de aminoácidos resultante (típicamente inserciones de SS, SG o AG) no condujeron solamente a resistencia viral a AZT sino también a casi la colección completa de NRTI incluyendo d4T, 3TC, ddI, ddC y ABC y TNF. Se ve un rescate de cebador dependiente de pirofosforólisis potenciado con la inserción de aminoácido doble + T69S, particularmente en presencia de TAM. Este fenómeno se asocia típicamente con los fenotipos resistentes "M41 L/T215Y" o "M41L/L210W/R211K/L214F/T215Y" y desempeña un papel fenotípico importante en la resistencia a nucleósidos múltiples (Meyer y col, 2003).

Otra clase de MDR tiene una sustitución de aminoácido en el codón Q151M. Esta mutación se observa a una frecuencia relativamente baja en la clínica y con frecuencia se presenta junto con mutaciones secundarias de A62V, V75I, F77L y F116Y. Confiere, sin embargo, una resistencia significativa a casi la clase completa de NRTI. Además, se ha observado asociada con TAM, típicamente los genotipos "M41 L, L210W y T215Y/F" o "D67N, K70R y K219K/E". Aparece en pacientes que han experimentado tratamiento fuerte con regímenes de combinación de AZT/ddI y AZT/ddC.

L74V se selecciona más frecuentemente por monoterapia con ddI (Martin y col, 1993) y presenta resistencia cruzada a ABC y 3TC. Su efecto en la producción de escapes virales depende de la presencia de otras mutaciones. Estudios de resistencia sugieren que la frecuencia de L74V está ligada significativamente a TAM, típicamente en un fondo de M41 L, L210W y T215Y/F (Marcelin y col, 2004) incluso aunque se creía que la mutación L74V provocaba un efecto de disminución en la replicación viral y que volvía a sensibilizar virus resistentes a AZT que contenían varias TAM (St. Clair y col, 1991). Una combinación de las mutaciones L74V y M184V en RT de VIH-1 es el patrón más frecuente asociado con resistencia a tanto ABC como ddI (Harrigan y col., 2000 y Miller y col., 2000).

Aunque la resistencia de alto nivel a ABC típicamente requiere múltiples mutaciones que comprenden K65R, L74V, Y115F y M184V, con frecuencia surge primero una mutación sencilla, M184V. Esta mutación, ahora reconocida como una mutación clave en el mecanismo diferenciador de resistencia de escape de fármaco, confiere una

reducción moderada de la susceptibilidad a ABC (Tisdale y col, 1997). Un estudio de CNA3005 en el que un total de 562 pacientes recibieron aleatoriamente AZT y 3TC con ABC o ddI, mostró un aumento lento pero constante de la proporción de pacientes que portaban una TAM en la rama de AZT y 3TC más ABC. En la semana 48, hasta el 56 % de los pacientes tenían al menos una TAM relacionada con rescate de cebador (1xTAM) por encima de la mutación M184V inducida rápidamente (Melby y col, 2001), lo que ilustra la importancia de evitar la aparición de resistencia relacionada con rescate de cebador. De forma similar, el pase *in vitro* de virus resistente a AZT que porta el patrón genotípico de 67, 70, 215 y 219 bajo presión selectiva de 3TC dio como resultado la selección de la mutación M184V y confirió resistencia cruzada a ABC (Tisdale y col, 1997). Esto destaca de nuevo el concepto de que tratar la TAM relacionada con rescate de cebador preexistente y evitar la acumulación de mutantes relacionados con rescate de cebador es una etapa clave para evitar el desarrollo de resistencia a nucleósidos múltiples.

Se ha hecho crecientemente evidente que la mutación K65R aparece rápidamente en una proporción muy alta de pacientes que reciben TNF o ABC. Valer y col (2004) indicaron que K65R aumentó su prevalencia en su hospital de Madrid de < 1 % entre 1997 y 2000 a 7 % en 2003 y 12 % en los primeros 4 meses de 2004. El efecto del mutante K65R se agrava en presencia de otras mutaciones asociadas con reducción de susceptibilidad a ABC, 3TC, ddI y ddC (Parikh y col, 2003). Aún así la aparición simultánea de K65R de genotipos de TAM relacionados con rescate de cebador, aunque se produce con poca frecuencia, conduce a un efecto más profundo en el rescate de cebador (escisión) de TNF que de AZT (Naeger y col, 2001). Se indicó que TNF era activo contra VIH-1, con hasta 3xTAM a no ser que el grupo de TAM incluyera una mutación M41L o L210W. En la actualidad no está claro por qué las TAM pueden revertir algunos de los efectos de K65R, que se cree de otro modo que impide mutantes de escisión de cebador con respecto a susceptibilidad a TNF y ABC.

Por último, la mutación T69D se identificó inicialmente para su papel en la provocación de resistencia a ddC. También se ha indicado que está asociada con una reducción de la respuesta a ddI cuando se produce en combinación con la mutación T215Y y otros de los genotipos de TAM relacionados con el rescate de cebador.

Durante muchos años la OMS y DHHS (departamento de salud y servicio de salud humana de Estados Unidos) han recomendado terapia antirretroviral de primera línea en el tratamiento de pacientes sin tratamiento previo que consiste en administrar d4T o AZT en combinación con 3TC más nevirapina o efavirenz (Guidelines for the Use of Antiviral Retroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents, 14 de julio de 2003 y 23 de marzo de 2004). Un número sustancial de pacientes infectados con VIH han experimentado, sin embargo, fracaso del tratamiento durante sus regímenes de terapia antirretroviral altamente activa inicial (HAART), lo que sugiere que estos pacientes ya estaban infectados con virus con escape de fármaco. Los mutantes de resistencia a TAM relacionados con rescate de cebador continúan desempeñando un papel principal en el desarrollo de resistencia a fármacos. Por lo tanto el desarrollo de fármacos o procedimientos terapéuticos que contrarresten el efecto de mutantes de resistencia de TAM relacionada con el rescate de cebador podría potenciar o prolongar el uso de los NRTI existentes para tratar pacientes sin tratamiento previo y podría usarse también para tratar a la población infectada con VIH que porta mutante de resistencia relacionado con rescate de cebador en una terapia de recuperación.

#### *Estrategias farmacológicas para prevenir/inhibir mutantes de rescate de cebador*

Las mutaciones de rescate de cebador y diferenciadoras con frecuencia aparecen juntas en el mismo genotipo mutante, en gran medida debido a la estrategia terapéutica actual. Una mutación M184V es representativa de la familia de mutantes diferenciadores. Si, sin embargo, aparece junto con mutantes relacionados con rescate de cebador tales como M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E, desempeña un papel en la resistencia dual a AZT y 3TC (Miller y col., 1998).

Estos fenotipos de resistencia de rescate de cebador y diferenciadora parecen correlacionarse con diferentes grupos de mutaciones en RT. Por ejemplo, las mutaciones asociadas con AZT comprenden diversas permutaciones dentro de M41L, E44D/A, D67N, K70R, V118I, M184V, H208Y, L210W, R211K, L214F, T215Y/F, K219Q/E y G333E, una mutación MDR T69S con inserciones de 6-pb y una a<sup>67</sup> típicamente muestran actividades mutantes de rescate de cebador. Por otro lado, las mutaciones en las posiciones, 65, 74, 89, 151 y 184 conducen a la capacidad de diferenciar entre los NRTI y los homólogos de dNTP respectivos o pueden estar implicadas en el reposicionamiento del complejo de cebador-molde.

En el reciente artículo "Designing anti-AIDS drugs targeting the major mechanism of HIV-1 RT resistance to nucleoside analog drugs" (IJBCB 36 (2004) 1706-1715), Sarafianos y col concluyen que el mecanismo de rescate de cebador (escisión) sólo podría aparecer antes de la translocación de RT en el sitio N y concluyen además que se ha convertido en el mecanismo dominante de resistencia a NRTI. En el capítulo titulado "Estrategias para inhibición de la reacción de escisión" (véase página 1711), proponen tres enfoques para derrotar dicho mecanismo de resistencia:

1. uso de nuevos antivirales que interfieran con la unión productiva de ATP (en el sitio P), supuestamente mediante unión en o cerca del sitio de unión a ATP, bloqueando de este modo la reacción de escisión sin afectar a la reacción directa de síntesis de ADN.

2. Uso de compuestos que puedan bloquear la síntesis de ADN pero que sean resistentes de algún modo a escisión, tales como variantes de fosfato alfa borano o tio sustituido de los NRTI actuales. De forma similar,

pueden obtenerse por ingeniería genética variantes de los NRTI actuales para resituar el molde/cebador extendido/terminado de un modo no escindible, como se sugiere por la escasa capacidad de escisión de los mutantes M184I/V inducidos por 3TC.

- 5 3. Uso de inhibidores basados en dinucleótido tetrafosfato para proporcionar unión bidentada en sitios tanto N como P.

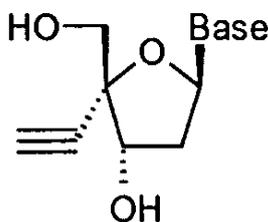
10 Cada uno de estos tres enfoques propuestos para prevenir mecanismos de rescate de cebador de resistencia a NRTI está abierto a crítica por diversos defectos teóricos. Por ejemplo, en el primer enfoque la unión de ATP no se requiere para las funciones de RT normales. Por lo tanto, las contramedidas basadas en inhibir la unión de ATP o pirofosfato por competición o bloqueo no evitarán el desarrollo de resistencia debido a que el estado físico del virus subyacente no se verá comprometido por tales agentes. En otras palabras, surgirán mutaciones de resistencia sin coste evolutivo. La abundante cantidad de ATP presente en linfocitos normales también desafía el fundamento detrás de este enfoque.

15 En el segundo enfoque propuesto, parece probable que los análogos de fosfato alfa borano o tio sustituido seleccionarían los mutantes resistentes diferenciadores, como se ha visto con 3TC y FTC y producirían mutantes de resistencia a VIH.

El tercer enfoque propuesto está limitado por la necesidad de captación farmacocinética en la célula diana de la especie de dinucleótido tetrafosfato grande y altamente cargada. Esto será un problema farmacéutico y de suministro de fármaco grave.

20 Es notable que cada uno de los enfoques de Serafaniano, incluyendo el enfoque 1 que no es antiviral en sí mismo, pero presupone la co-administración de un NRTI convencional, se basa en variantes de la generación actual de NRTI. Es decir, compuestos sin una función 3-hidroxi y que actúan por lo tanto como terminadores de cadena obligados.

25 A diferencia de los NRTI "clásicos" analizados anteriormente (es decir, los que carecen de una función 3'-hidroxi), Ohruí y col (J Med Chem (2000) 43, 4516-4525,) describen inhibidores de VIH de 4'-C etinilo:

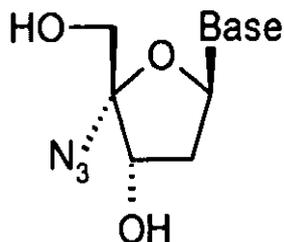


Fórmula I

30 Estos compuestos conservan la función 3'-hidroxi pero no obstante muestran actividad frente a VIH-1, incluyendo una cepa MDR diferenciadora típica que porta las mutaciones A62V, V75L, F77L, F116Y y Q151 M. Se postuló que el mecanismo de acción era a través de la afinidad por la quinasa que fosforila nucleósidos. También se observó, sin embargo, que estos compuestos podrían actuar como terminadores de cadena de ADN debido a su carácter de alcohol neopentílico y el grave impedimento estérico del sustituyente 4' cis adyacente, que dio como resultado una reactividad fuertemente disminuida del 3'-hidroxi.

35 Kodama y col (Antimicrob Agents Chemother (2001) 1539-1546,) describen un conjunto muy similar de compuestos que portan un grupo de 4'-C-etinilo adyacente a la función 3'-hidroxi conservada que se ensayaron en cultivo celular con cepas resistentes a VIH adicionales. Puesto que Kodama y col no prepararon los trifosfatos de sus compuestos, fueron incapaces de elucidar el mecanismo de acción pero infirieron a partir de diversas observaciones circunstanciales que los compuestos actúan de hecho como NRTI. Kodama y col indicaron posteriormente (resumen 388-T, 2003 9ª Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas,) que bajo la presión selectiva de su nucleósido de 4-C-etinilo *in vitro*, se hallaron VIH resistentes novedosos que portaban mutaciones T165I y M184V localizadas en el sitio catalítico de RT. Este fenotipo mutante es evidentemente un tipo diferenciador de mutación y es fuertemente resistente de forma cruzada a 3TC. Se implicó por lo tanto el conflicto estérico que bloquea la incorporación de nucleósido 4-C-etinilo. Este se ha establecido con el mecanismo inhibitor de 3TC y por lo tanto casi con certeza representa el mecanismo de resistencia diferenciador. Parece por lo tanto poco probable que los compuestos de Kodama proporcionen orientación para enfocar los mutantes que facilitan rescate de cebador (escisión mediada por ATP o pirofosfato).

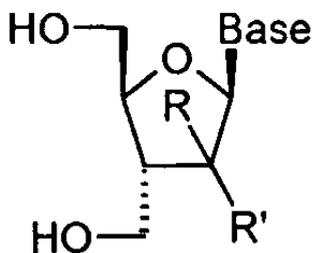
45 Chen y col (Biochemistry (1993) 32:6000-6002,) realizaron investigaciones mecánicas extensivas en una serie de compuestos relacionados estructuralmente que portaban un grupo azido en 4':



Fórmula II

Chen demostró que la RT incorpora de forma eficaz dos nucleótidos monofosfato de 4'-azidoimidina consecutivos lo que termina la elongación de cadena. Además, RT también fue capaz de incorporar un primer 4'-azidotimidina monofosfato, seguido de un dNTP nativo y después un segundo nucleótido de 4'-azidotimidina, que también condujo a terminación de cadena. Obsérvese que ambos de estos mecanismos dieron como resultado un 4'-azidotimidina monofosfato que residía en el extremo del cebador de ADN terminado, que es un mecanismo inhibitor muy similar a los NRTI actuales. También fue evidente que las polimerasas celulares (es decir no virales)  $\alpha$  y  $\beta$  fueron cada una capaces de incorporar un nucleótido 4'-azido sencillo, pero no un segundo, en la cadena naciente del ADN del huésped. Estas polimerasas celulares permitieron después que la cadena de ADN del huésped se elongara con dNTP nativos adicionales e incorporaran de este modo permanentemente el nucleótido NRTI en genes del ADN del huésped. Estos compuestos no se han aplicado en seres humanos debido a que la incorporación errónea de nucleótidos no nativos por enzimas celulares tiene claras implicaciones en carcinogénesis. De forma similar, el desarrollo farmacéutico de los compuestos de 4'-C-etinilo correspondientes de Kodama se detuvo, supuestamente debido a grave toxicidad en organismos superiores.

El documento EP 341 911 describe una familia extensiva de nucleósidos de 3'-C-hidroximetilo de la fórmula



Fórmula III

y propone su uso predominantemente contra herpes virus tales como CMV, pero también contra retrovirus. El documento WO92/06201 también desvela un conjunto similar de compuestos e indicaciones.

El documento US 5.612.319 desvela la actividad retroviral de 2'-3' dideoxi-3'-C-hidroximetilcitosina contra VIH-1<sub>III B</sub> de tipo silvestre y el equivalente de simio, VIS-1, en un modelo de mono cynomolgus agudo de infección por VIH. Esta publicación propone el uso del compuesto como un agente de profilaxis post-exposición, especialmente contra lesiones por pinchazos. La profilaxis post-exposición implica que el principio activo se administra inmediatamente a personas tales como personal médico, que se han clavado involuntariamente una jeringa potencialmente infectada por VIH. Para asegurar el tratamiento rápido de un profesional de cuidado de la salud comprensiblemente impactado, una jeringa de resorte auto-administrada, tal como las que se usan para antídotos para guerra química y biológica, es una vía de administración preferida.

La intención de la profilaxis post-exposición es evitar que la infección se establezca en lugar de tratar una infección en curso. Como tal, se pretendía que el tratamiento se llevara a cabo durante un período de tiempo corto tal como 24-48 horas, usando dosis extremadamente altas del compuesto. Esta publicación indica que debido al período de tiempo de administración discreto, la toxicidad transitoria es aceptable debido a que se intenta evitar una enfermedad incurable. El procedimiento profiláctico post-exposición descrito en el documento US 5.612.319 nunca se ha ensayado en humanos, de hecho en el conocimiento de los inventores 2'-3'-dideoxi-3'-C hidroximetilcitosina no se ha administrado a seres humanos en absoluto.

En 1994, cuando la solicitud con concesión US 5.612.319 se presentó, el VIH multirresistente como se conoce hoy en día no había surgido de ninguna forma contundente. En la actualidad el VIH multirresistente tiene mutaciones de rescate de cebador inducidas y acumuladas por muchos años de presión selectiva de terapia con NRTI. En otras palabras, el VIH y especialmente la RT existente en el momento en que se concedieron estas patentes era estructuralmente y mecanísticamente muy diferente de los virus actuales.

La solicitud de patente internacional PCT/EP2005/057196, que no estaba publicada en la fecha de prioridad de la presente solicitud, desvela el uso de 2',3'-dideoxi-3'-hidroximetilcitosina y profármacos de la misma en el tratamiento de mutantes de escape de VIH.

5 Se cree que 2',3'-dideoxi-3'-C-hidroximetilcitosina está fosforilada en el 5'-trifosfato correspondiente por enzimas celulares. La RT fuertemente mutada de VIH multiresistente, en particular RT mutante relacionada con rescate de cebador, incorpora este trifosfato como el 5'-(2',3'-dideoxi-3'-C-hidroximetilcitosina) monofosfato en la cadena de ADN naciente.

10 Los NRTI convencionales actúan como terminadores de cadena obligados, terminando la síntesis de ADN en el sitio N y son por lo tanto susceptibles al mecanismo de rescate de cebador (escisión) mediado por pirofosfato o ATP descrito anteriormente único para VIH multiresistente. Por el contrario, 5'-(2',3'-dideoxi-3'-C- hidroximetilcitosina) monofosfato no actúa como un terminador de cadena obligado, sino que en su lugar permite que un resto adicional se una covalentemente a la función 3' hidroximetilo del 5'-(2',3'-dideoxi-3'-C- hidroximetilcitosina) monofosfato. Esto promueve después que la RT experimente el cambio transformacional necesario para translocarse al sitio P para el siguiente ciclo de polimerización. Las pruebas preliminares sugieren que este resto terminal unido es un nucleótido nativo en lugar de un 5'-(2',3'-dideoxi-3'-C- hidroximetilcitosina) monofosfato adicional.

15 Resulta importante que los datos sugieren que el último nucleótido no 2',3'-dideoxi-3'-C- hidroximetilcitosina incorporado no es susceptible de adición posterior de nucleótidos por la transcriptasa inversa mutada. Es decir, parece que la terminación de cadena se produce una base después del NRTI de la invención en lugar de en el NRTI. Además, después de la incorporación de 2',3'-dideoxi-3'-hidroximetilcitosina, parece que la RT se transloca de forma exitosa al sitio P para aceptar el siguiente nucleótido entrante. Esta prueba sugiere que 2',3'-dideoxi-3'-hidroximetilcitosina, junto con una RT mutada relacionada con rescate de cebador, consigue una forma de terminación de cadena que no es susceptible de escisión inducida por ATP o pirofosfato. Como consecuencia, 2',3'-dideoxi-3'-hidroximetilcitosina permite el tratamiento eficaz de infecciones por VIH que no son sensibles a los regímenes farmacológicos actuales.

20 El mecanismo inhibidor analizado inmediatamente antes es por lo tanto fundamentalmente diferente del mecanismo de terminación de cadena de los nucleótidos 4'-sustituidos de Chen y col (véase anteriormente), que permite que varios nucleótidos se incorporen después del compuesto 4 sustituido incorporado. En primer lugar, el mecanismo de Chen aumenta drásticamente el riesgo de "translectura". Es decir, la ADN polimerasa continúa siguiendo la hebra codificante y continúa añadiendo los restos codificados al codón de parada normal, incorporando erróneamente de este modo el nucleósido anómalo dentro de la cadena de ADN. La eficacia antiviral puede perderse, sin embargo, cuando una cadena de ADN viral se construye por la polimerasa viral (es decir, RT) puesto que la construcción de translectura aún puede ser viable, a pesar del nucleósido 4' sustituido incorporado de forma errónea. Resulta más importante que si el nucleósido 4' sustituido experimenta translectura por una polimerasa celular (es decir, huésped), como describe Chen, la construcción resultante representa a continuación un teratógeno y aumenta drásticamente el riesgo de daño celular y cáncer.

25 Los compuestos de Chen requieren adicionalmente la adición de un segundo nucleótido 4'-sustituido, inmediatamente adyacente al primer nucleótido 4' sustituido incorporado de forma errónea (es decir, X-X) o intercalado por un nucleótido nativo (es decir, X-N-X). En la práctica esto significa que el nucleótido en la última posición del extremo del cebador es el nucleótido no nativo (es decir, farmacológico). Esta es una situación análoga al caso de la terminación de cadena de los NRTI clásicos (es decir, los que carecen de un grupo 3-hidroxi). Aquí, el nucleótido de NRTI también reside en la última posición del extremo del cebador en el que, como se analizado anteriormente, es susceptible a escisión mediada por ATP o pirofosfato.

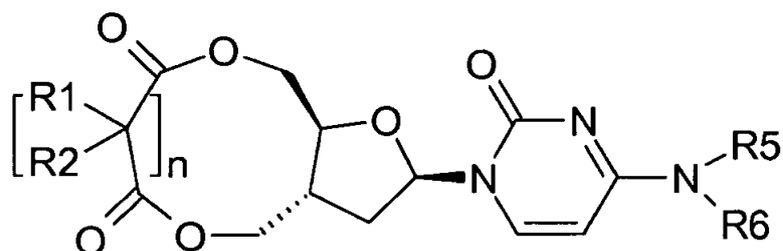
30 Se citan múltiples unidades del nucleótido 4' sustituido de Chen para que funcione como un inhibidor de RT eficaz. Como consecuencia, la eficacia del fármaco depende de la secuencia de la hebra de lectura. Por ejemplo, si el compuesto de Chen es un análogo de timidina tendrá la mejor afinidad si la hebra de lectura tiene una secuencia AA o A-N-A. Aquí, el fármaco sería eficaz y efectivo en la terminación de síntesis de ADN. Pero si la secuencia de la hebra de lectura no contiene series abundantes de la secuencia AA o A-N-A, el fármaco de Chen será menos capaz de terminar la síntesis de ADN a una concentración dada. Puesto que un doblete AA o un triplete A-N-A es mucho menos común en el genoma que una A sencilla, el fármaco de Chen será mucho menos eficaz que otros en NRTI que no tienen un requisito de múltiples unidades.

35 Mauldin y col Bioorganic and Medical Chemistry 1998 6:577-585 desvela varios profármacos de 2',3'-dideoxi-3'-hidroximetilcitosina. Cabe destacar el hecho de que los autores descubrieron que los profármacos que implicaban sustituyentes de las posiciones de alcohol dieron como resultado una reducción de la actividad antiviral en prácticamente todos sus ensayos.

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos profármacos de 2',3'-dideoxi-3'-hidroximetilcitosina, de uso en el tratamiento de VIH y en particular en el tratamiento de mutantes de escape de VIH.

#### **Breve descripción de la invención**

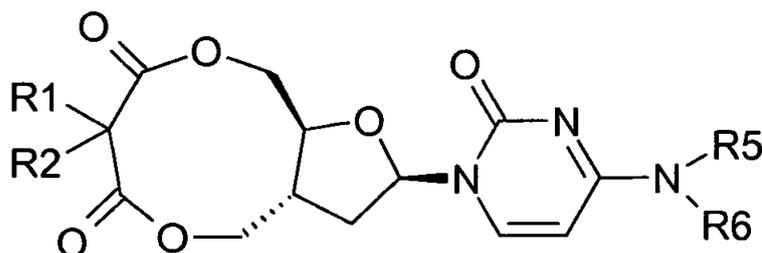
De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporcionan nuevos compuestos de fórmula I:



en la que:

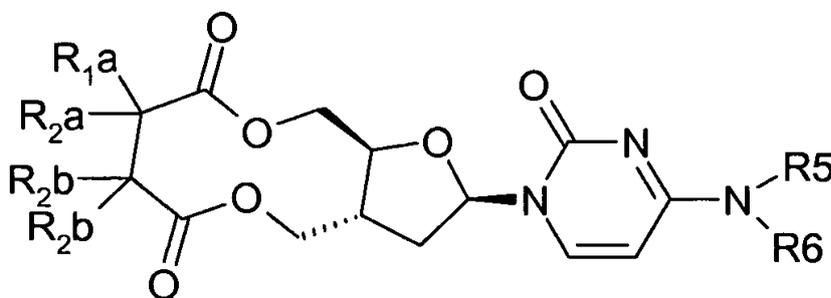
- R<sup>1</sup> es independientemente H, -OR<sup>3</sup>, -NHR<sup>4</sup>; alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
 o, cuando n es 2, los R<sup>1</sup> adyacentes definen juntos un enlace olefínico;  
 R<sup>2</sup> es H;  
 o cuando el R<sup>1</sup> geminal es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, que R<sup>2</sup> puede ser también alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
 o cuando el R<sup>1</sup> geminal es -OR<sup>3</sup>, que R<sup>2</sup> puede ser también -C(=O)OH o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 R<sup>3</sup> es, independientemente, H o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 R<sup>4</sup> es, independientemente, H o una amida farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 R<sup>5</sup> es H;  
 R<sup>6</sup> es H;  
 n es 1, 2 ó 3;  
 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, n es 1 y los compuestos tienen la fórmula general:



Las variantes favorecidas para R<sup>1</sup>:R<sup>2</sup> en esta realización incluyen H:H, H:OH o un éster farmacéuticamente aceptable de los mismos y Me:Me. Las variantes particularmente favorecidas de esta realización tienen H como R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup>.

Una realización alternativa de la invención tiene n = 2, produciendo de esta manera compuestos de la fórmula general:

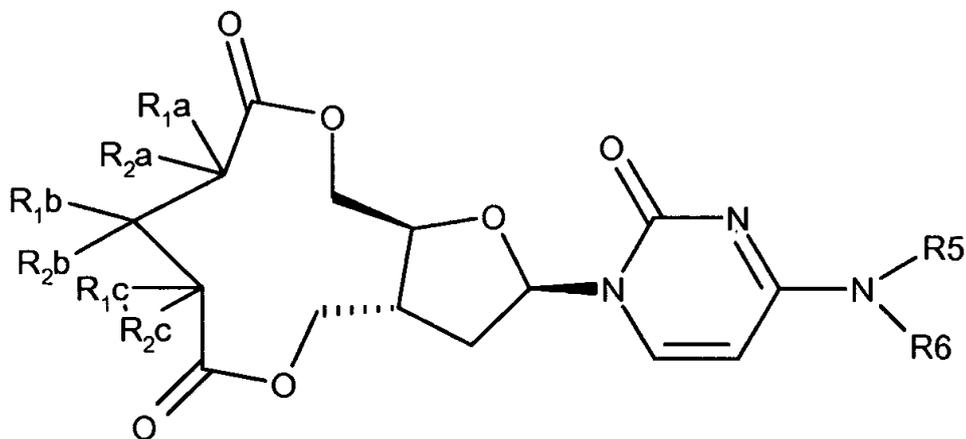


En esta realización las variantes favorecidas para R<sup>1</sup>a:R<sup>1</sup>b:R<sup>2</sup>a:R<sup>2</sup>b incluyen:

- H:H:H:H  
 H:H:H:OH o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo  
 H:H:H:NH<sub>2</sub> o una amida farmacéuticamente aceptable del mismo  
 H:OH o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo:H:H  
 H:NH<sub>2</sub> o una amida farmacéuticamente aceptable del mismo:H:H  
 Me:Me:H:H

H:H:Me:Me  
 H:OH:H:OH  
 H:C=C:H

5 Las variantes particularmente favorecidas de esta realización tienen H como R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup>. Una realización adicional de la invención tiene n igual a 3, con la fórmula general:



Las variantes favorecidas de R<sup>1</sup>a:R<sup>2</sup>a:R<sup>2</sup>a:R<sup>2</sup>b:R<sup>1</sup>c:R<sup>2</sup>c incluyen  
 H:H:H:H:H:H  
 H:H:Me:Me:H:H  
 10 H:H:OH:H:H:H  
 H:H:OH:COOH:H:H  
 H:H:H:H:H:NH<sub>2</sub>  
 o un éster o amida farmacéuticamente del mismo.

15 Las realizaciones actualmente preferidas incluyen los compuestos de fórmula I designados  
 2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,10-trioxaciclopentaciclodecen-6,9-diona; o  
 2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,11-trioxaciclopentacicloundecen-6,10-diona;  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Estos compuestos liberan subproductos inocuos tras la hidrólisis *in vivo*, tal como ácido succínico o glutárico.

20 Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los compuestos de la invención o metabolitos activos de los mismos, son activos frente a transcriptasa inversa de retrovirus tales como HIV-1, HIV-2, HTLV y SIV.

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de compuestos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de infecciones retrovirales, en seres humanos o animales. Típicamente, el medicamento está en una forma adaptada para administración oral.

25 Se desvela en el presente documento un procedimiento para inhibir la aparición o propagación de mutantes de rescate de cebador de VIH que son capaces de retirar un nucleótido de NRTI terminador de cadena incorporado en un complejo de molde/cebador de VIH en el que la retirada se efectúa por un mecanismo de escisión dependiente de pirofosfato o dependiente de ATP. El procedimiento comprende la administración simultánea o secuencial a un individuo infectado con VIH de una cantidad eficaz del compuesto de la invención y al menos un NRTI terminador de  
 30 cadena que induce mutantes de rescate de cebador.

Los NRTI convencionales actúan como terminadores de cadena obligados, terminando la síntesis de ADN en el sitio N y son por lo tanto susceptibles al mecanismo de rescate de cebador (escisión) mediado por pirofosfato o ATP descrito anteriormente único para VIH multiresistente. Por el contrario, las pruebas preliminares sugieren que los  
 35 compuestos de la invención no actúan como un terminador de cadena obligado, sino que permiten que un resto adicional se una covalentemente a la función 3' hidroximetilo del 5'-(2',3'-dideoxi-3'-C-hidroximetilcitosina) monofosfato. Este promueve después que la RT experimente el cambio transformacional necesario para translocarse al sitio P durante el siguiente ciclo de polimerización. Las pruebas preliminares basadas en la secuencia de molde presentada posteriormente sugieren que este resto terminal unido es un nucleótido nativo.

El VIH multiresistente típicamente capaz de tratarse o prevenirse de acuerdo con la invención típicamente tendrá  
 40 una RT que porte un patrón genético que comprende al menos uno de

- (a) M41, ± D67, L210 y T215;
- (b) D67, K70 and K219;

- (c) T69S-XX o
- (d) ▲67

en el que XX representa una adición a la secuencia de RT de dos aminoácidos naturales cualesquiera y ▲67 representa la delección del aminoácido del codón 67.

- 5 Aunque se cree que los cuatro patrones genéticos anteriores representan la base esencial del fenotipo de escape de fármaco de escisión, resultará evidente que los mutantes tratados o prevenidos por el uso de la invención típicamente comprenderán mutaciones adicionales en el gen de RT y en otros sitios, con frecuencia al menos tres mutaciones en el gen de RT.

- 10 Generalmente, pero no exclusivamente, el grupo M41, ± D67, L210 y T215 comprenderá con frecuencia M41L, ± D67N, L210W y T215Y o T215F.

Opcionalmente, los grupos inmediatamente anteriores pueden comprender además al menos una mutación adicional en la posición E44, K70, V118, H208, R211K, L214, K219 o G333.

Los grupos inmediatamente anteriores pueden comprender además al menos una mutación adicional en la posición ▲67, T69, E203, L210, D218, H221, D223 o L228.

- 15 Generalmente, pero no exclusivamente, el grupo D67, K70 y K219 comprende D67N, K70R y K219Q o K219E.

Opcionalmente, el grupo D67, K70 y K219 puede comprender además al menos una mutación adicional en la posición M41, E44, V118, H208, L210, R211K, L214, T215, o G333.

Además, el grupo D67, K70 y K219 comprende opcionalmente también al menos una mutación adicional en la posición ▲67, T69, E203, L210, D218, H221, D223 o L228.

- 20 Generalmente, pero no exclusivamente, el grupo T69S-XX puede comprender además al menos una mutación adicional en la posición M41, E44, D67, K70, V118, H208, L210, R211K, L214, T215, K219 o G333.

Opcionalmente, el grupo T69S-XX puede comprender además al menos una mutación adicional en la posición P67, T69, E203, L210, D218, H221, D223 o L228. Generalmente, pero no exclusivamente, el grupo ▲67 puede comprender adicionalmente al menos una mutación adicional en la posición M41, E44, D67, K70, V118, H208, L210, R211K, L214, T215, K219 o G333.

- 25

Opcionalmente, el grupo ▲67 puede comprender además al menos una mutación adicional en la posición T69, T69S+XX, E203, L210, D218, H221, D223 o L228.

Opcionalmente, la transcriptasa inversa puede portar además al menos una mutación diferenciadora en la posición K65, L74, M184 o Q151, especialmente K65R, L74V o M184V o Q151M.

- 30 Típicamente, el grupo de mutantes diferenciadores puede ligarse con al menos una mutación adicional en la posición A62, V75, F77, Y115 o F116.

Entre las cepas de VIH capaces de tratarse por la invención están las cepas de VIH multirresistentes cuya RT tiene mutaciones que promueven el rescate de cebador (escisión) mediado por ATP o pirofosfato de nucleótidos de NRTI terminadores de cadena y que ha surgido dentro del paciente como resultado del tratamiento de VIH previo con al menos un antiviral seleccionado de zudovudina (AZT, ZDV), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), didanosina (ddl), abacavir, (ABC), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC), adefovir (ADV), entacavir (BMS 200475) alovudina (FLT), tenofovir disoproxil fumarato (TNF), amdoxavir (DAPD), D-d4FC (DPC-817), - dOTC (SPD754), SPD-756, racivir, D-FDOC o GS7340.

- 35

Como alternativa, las cepas de VIH son las que se hallan en pacientes que han recibido una cepa de VIH resistente o multirresistente tal directa o indirectamente de otro individuo que habían inducido en sí mismo una cepa de VIH resistente o multirresistente por tratamiento prolongado con al menos un antiviral de la lista anterior de antivirales NRTI. Frecuentemente las cepas de VIH multirresistentes contienen al menos tres mutaciones en la RT viral en comparación con tipo silvestre.

- 40

Resultará por lo tanto evidente que la composición de la invención puede usarse como un complemento para terapias antirretrovirales actuales, tales como HAART, o en algunos casos como una terapia de rescate o de recuperación. Este será típicamente el caso cuando el VIH multirresistente se ha inducido en el paciente real por el historial de tratamiento con fármaco antirretroviral anterior de ese paciente. Como alternativa, las composiciones de la invención constituirán una terapia de primera línea, típicamente en pacientes cuya infección por VIH primaria se produjo con una cepa multirresistente ya mutada. Los siguientes fármacos antivirales con frecuencia inducen dichas cepas de VIH multirresistentes que tienen mutaciones de rescate de cebador de RT que promueven la escisión mediada por ATP o pirofosfato de nucleótidos de NRTI terminadores de cadena:

- 50

zudovudina, lamivudina o las formas farmacéuticas combinadas Combivir o Trizivir;

lamivudina, abacavir o la forma farmacéutica combinada Epzicom;  
tenofovir, emtricitabina o la forma farmacéutica combinada Truvada.

Aunque estos fármacos frecuentemente inducen tales cepas de VIH multirresistentes, esta lista de fármacos no es exclusiva.

- 5 Es por lo tanto evidente que el compuesto de la invención se administra para prevenir la aparición de una o más cepas de VIH multirresistentes que tienen mutaciones de rescate de cebador de RT que promueven la escisión mediada por ATP o pirofosfato de nucleótidos de NRTI terminadores de cadena. Esta prevención se produce incluso cuando se administran conjuntamente fármacos NRTI que inducen tales mutaciones.

- 10 Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica en forma farmacéutica unitaria que comprende el compuesto de fórmula I y al menos un NRTI terminador de cadena, tras lo que la dosificación prolongada con el NRTI induce mutaciones de rescate de cebador de RT de VIH que promueven la escisión dependiente de ATP o dependiente de pirofosfato de monofosfato NRTI incorporado del extremo 3' terminal del complejo de cebador/molde y permite la reanudación de la síntesis de ADN.

- 15 Las realizaciones preferidas de la composición farmacéutica de la invención incluyen en las que el NRTI se selecciona de zidovudina (AZT, ZDV), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), didanosina (ddI), abacavir, (ABC), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC), adefovir (ADV), entacavir (BMS 200475), alovedina (FLT), tenofovir disoproxil fumarato (TNF), amdoxavir (DAPD), D-d4FC (DPC-817), -dOTC (SPD754), SPD-756, racivir, D-FDOC o GS7340 y combinaciones de los mismos.

- 20 Las realizaciones particularmente preferidas incluyen en las que NRTI se selecciona de: zidovudina, estavudina, didanosina, lamivudina, abacavir, tenofovir, emtricitabina o combinaciones de los mismos.

- 25 La experiencia con fármacos de VIH, e inhibidores de transcriptasa inversa de VIH en particular, ha enfatizado adicionalmente que la farmacocinética subóptima y los regímenes de dosificación complejos den como resultado rápidamente fracasos de conformidad involuntarios. Esto a su vez significa que la concentración valle de 24 horas (concentración mínima en plasma) para los fármacos respectivos en un régimen de VIH frecuentemente queda por debajo del umbral de  $Cl_{90}$  o  $DE_{90}$  durante gran parte del día. Se considera que un nivel valle de 24 horas de al menos la  $Cl_{50}$  y de forma más realista la  $Cl_{90}$  o  $DE_{90}$  es esencial para ralentizar el desarrollo de los mutantes de escape del fármaco.

- 30 Los compuestos de la invención se administran típicamente al paciente a una dosis proporcionada con la esperanza de un tratamiento antirretroviral mantenido y largo. El régimen de tratamiento se dirige por lo tanto a asegurar un nivel de fármaco definido, pero para evitar la toxicidad, aunque el uso del compuesto de fórmula I en un tratamiento de profilaxis de dosis alta, agudo, post-exposición puede tolerar algo de toxicidad transitoria, es aceptable. Los compuestos de fórmula I se administran típicamente en intervalos de 1-25 mg/kg/día, preferentemente menos de 10 mg/kg/día, preferentemente en el intervalo de 0,05-0,5 mg/kg/día. La dosificación apropiada dependerá de las indicaciones y del paciente y se determina fácilmente por metabolismo y farmacocinética farmacológica (DMPK)
- 35 animal convencional o ensayos clínicos y software de predicción *in silico*.

- 40 Las composiciones farmacéuticas de dosificación unitaria de la invención tienen cantidades correspondientes del compuesto de fórmula I, típicamente cambiadas de escala para un adulto de 60 kg o 75 kg y se dividen opcionalmente una vez, dos veces o tres veces para un régimen de dosificación QD, BID o TID. Si la dosis terapéutica está en el intervalo de 0,05 - 0,5 mg/kg/día, entonces una dosis clínica QD por persona por día sería de 3 mg - 30 mg para un adulto de 60 kg o 3,75 - 37,5 mg para un adulto de 75 kg. Las restricciones de dosificación y régimen del NRTI convencional adicional en el aspecto de la composición farmacéutica unitaria de dosificación combinada de la invención pueden necesitar dosificación QD, BID o TID.

- 45 La presente invención incluye sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de ácidos orgánicos, especialmente ácidos carboxílicos incluyendo, aunque sin limitación, acetato, trifluoroacetato, lactato, gluconato, citrato, tartrato, maleato, malato, pantotenato, isetionato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, butirato, digluconato, ciclopentanato, glucoheptanato, glicerofosfato, oxalato, heptanoato, hexanoato, fumarato, nicotinato, palmoato, pectinato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tartrato, lactobionato, pivolato, alcanforato, undecanoato y succinato. Se incluyen también las sales de ácidos sulfónicos orgánicos, tales como metanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietano sulfonato, alcanforsulfonato, 2-naftalenosulfonato, bencenosulfonato, p-clorobencenosulfonato y p-toluenosulfonato. Las sales aceptables incluyen también aquellas de ácidos inorgánicos,
- 50 tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, hemisulfato, tiocianato, persulfato, ácidos fosfórico y sulfónico.

- La presente invención se extiende a agentes activos que son hidratos, solvatos, complejos y otras formas físicas que liberan el compuesto de fórmula I.

- 55 Aunque es posible que el agente activo se administre en solitario, es preferible presentarlo como parte de una formulación farmacéutica. Dicha formulación comprenderá el compuesto de fórmula I como agente activo junto con uno o más vehículos/excipientes aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El vehículo o vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no

perjudiciales para el destinatario.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Preferentemente, la formulación es una formulación administrada por vía oral. Las formulaciones pueden presentarse, convenientemente, en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, comprimidos y cápsulas de liberación sostenida, y pueden prepararse por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica farmacéutica.

Dichos procedimientos bien conocidos incluyen la etapa de asociar el compuesto de fórmula I como agente activo con el vehículo. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después conformando el producto, si fuera necesario. La invención se amplía a procedimientos para la preparación de una composición farmacéutica que comprende juntar o asociar un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, con un vehículo o soporte farmacéuticamente aceptable. Si la fabricación de formulaciones farmacéuticas implica la mezcla íntima de excipientes farmacéuticos y el ingrediente activo está en una forma de sal, entonces a menudo se prefiere usar excipientes que no son de naturaleza básica, sino ácidos o neutros.

Las formulaciones para administración oral de la presente invención pueden presentarse en forma de unidades discretas, tales como cápsulas, obleas o comprimidos, cada una de los cuales contiene una cantidad predeterminada del agente activo. Como alternativa, pueden presentarse en forma de polvo o gránulos; como una solución o una suspensión del agente activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso, o en forma de una emulsión líquida de aceite-en-agua o una emulsión de agua-en-aceite en forma de un bolo, etc.

Con respecto a composiciones para administración oral (por ejemplo, comprimidos y cápsulas), la expresión "excipiente adecuado" incluye vehículos tales como excipientes comunes, por ejemplo agentes aglutinantes tales como jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; cargas y vehículos, por ejemplo almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato sódico y otros estearato metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, silicona fluida, talco, ceras, aceites y sílice coloidal. Los agentes aromatizantes, tales como menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza, o similares, pueden usarse también. Puede ser deseable añadir un agente colorante para hacer a la forma de dosificación fácilmente identificable. Los comprimidos pueden recubrirse también por procedimientos bien conocidos en la técnica.

Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos que se comprimen pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el agente activo en una forma que fluye libremente, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo, humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse tal como para proporcionar liberación lenta o controlada del agente activo.

Otras formulaciones adecuadas para administración oral incluyen grageas que comprenden el agente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el agente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el agente activo en un vehículo líquido adecuado.

"Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" (abreviado también como alq C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o usado en expresiones compuestas tales como alquiloxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, etc.), como se aplica en el presente documento, pretende incluir cadenas de carbono alifáticas, de cadena lineal o ramificada, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, heptilo y cualquier isómero sencillo de las mismas. El grupo alquilo puede tener un enlace insaturado. Adicionalmente, cualquier átomo de C en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> puede estar sustituido opcionalmente con uno, dos o, cuando la valencia lo permita, tres halógenos, y/o sustituido, o la cadena de alquilo puede estar interrumpida con un heteroátomo S, O, NH. Si el heteroátomo está localizado en un extremo de la cadena, entonces está apropiadamente sustituido con uno o 2 átomos de hidrógeno. Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>n</sub> tiene el significado correspondiente a alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ajustado según sea necesario para número de carbonos.

"Alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> arilo" como se aplica en el presente documento pretende incluir un resto arilo tal como fenilo, naftilo o fenilo condensado a un cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, por ejemplo indanilo, arilo que está unido directamente (es decir, C<sub>0</sub>) o a través de un grupo metilo, etilo, propilo o isopropilo intermedio, como se define para el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> anterior. A menos que se indique de otra manera, el arilo y/o su resto cicloalquilo condensado está sustituido opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, nitro, ciano, carboxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcanoilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, amino, azido, oxo, mercapto, nitro alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> carbociclilo, alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> heterociclilo. "Arilo" tiene el significado correspondiente, es decir, donde la unión alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> está ausente.

"Alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>", como se aplica en el presente documento, pretende incluir un grupo cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo, cicloalquilo que está unido directamente

(es decir, alquilo C<sub>0</sub>) o a través de un grupo intermedio metilo, etilo o propilo, como se define para el alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> anterior. El grupo cicloalquilo puede contener un enlace insaturado. A menos que se indique de otra manera, el resto cicloalquilo está opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes, seleccionados entre halo, hidroxilo, nitro, ciano, carboxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcanilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, amino, azido, oxo, mercapto, nitro alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> carbociclilo, alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> heterociclilo.

“Alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> carbociclilo”, como se aplica en el presente documento, pretende incluir alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> arilo y alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>. A menos que se indique de otra manera, el grupo arilo o cicloalquilo está sustituido opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, nitro, ciano, carboxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcanilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, amino, azido, oxo, mercapto, nitro, alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> carbociclilo y/o alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> heterociclilo. “Carbociclilo” tiene el significado correspondiente, es decir, cuando la unión alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> está ausente.

“Alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> heterociclilo” como se aplica en el presente documento, pretende incluir un anillo que contiene heteroátomo monocíclico, saturado o insaturado, tal como piperidinilo, morfinilo, piperazinilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazinilo, isotiazinilo, tiazolilo, oxadiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, tetrazolilo, furanilo, tienilo, piridilo, pirimidilo, piridazinilo, pirazolilo o cualquiera de estos grupos condensado a un anillo de fenilo, tal como quinolinilo, benzimidazolilo, benzoxazolilo, benzisoxazolilo, benzotiazinilo, benzisotiazinilo, benzotiazolilo, benzoxadiazolilo, benzo-1,2,3-triazolilo, benzo-1,2,4-triazolilo, benzotetrazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzopiridilo, benzopirimidilo, benzopiridazinilo, benzopirazolilo, etc., anillo que está unido directamente, es decir (C<sub>0</sub>), o a través de un grupo intermedio metilo, etilo, propilo o isopropilo como se define para el alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> anterior. Cualquiera de estos anillos no saturados que tienen un carácter aromático puede denominarse heteroarilo en el presente documento. A menos que se indique de otra manera, el hetero-anillo y/o su resto fenilo condensado está opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, nitro, ciano, carboxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcanilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, amino, azido, oxo, mercapto, nitro alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> carbociclilo, alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> heterociclilo. “Heterociclilo” y “Heteroarilo” tienen el significado correspondiente, es decir, donde la unión alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> está ausente.

Típicamente, los restos heterociclilo y carbociclilo dentro del alcance las definiciones anteriores son, por tanto, un anillo monocíclico con 5 o especialmente 6 átomos del anillo, o una estructura de anillo bicíclica que comprende un anillo de 6 miembros condensado a un anillo de 4, 5 ó 6 miembros.

Dichos grupos típicos incluyen cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, fenilo, bencilo, tetrahidronaftilo, indenilo, indanilo, heterociclilo tal como a partir de azepanilo, azocanilo, pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo, indolinilo, piranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, tiopiranilo, furanilo, tetrahydrofuranilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, tetrazolilo, pirazolilo, indolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzisoxazolilo, quinolinilo, tetrahydroquinolinilo, isoquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, quinazolinilo, tetrahydroquinazolinilo y quinoxalinilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido como se define en el presente documento.

El resto heterociclo saturado incluye, por lo tanto, radicales tales como pirrolinilo, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piranilo, tiopiranilo, piperazinilo, indolinilo, azetidino, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahydrofuranilo, hexahidropirimidinilo, hexahidropiridazinilo, 1,4,5,6-tetrahidropirimidinilamina, dihidro-oxazolilo, 1,2-tiazinil-1,1-dióxido, 1,2,6-tiadiazinil-1,1-dióxido, isotiazolidinil-1,1-dióxido e imidazolidinil-2,4-diona, mientras que el heterociclo insaturado incluye radicales con un carácter aromático, tales como furanilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolizino, indolilo, isoindolilo. En cada caso, el heterociclo puede estar condensado con un anillo de fenilo para formar un sistema de anillo bicíclico.

Los compuestos de fórmula I incluyen ciertos ésteres o amidas farmacéuticamente aceptables. Los ésteres representativos incluyen, por tanto, ésteres de ácido carboxílico en los que el resto no carbonilo de la parte ácido carboxílico de la agrupación éster se selecciona entre alquilo de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metilo, n-propilo, t-butilo, o n-butilo), cicloalquilo, alcoxialquilo (por ejemplo, metoximetilo), aralquilo (por ejemplo, bencilo), ariloxialquilo (por ejemplo, fenoximetilo), arilo (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido, por ejemplo con halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub>, o alcoxi C<sub>1-4</sub>) o amino); ésteres de sulfonato, tales como alquil- o aralquilsulfonilo (por ejemplo, metanosulfonilo); ésteres de aminoácido (por ejemplo, L-valilo o L-isoleucilo); y ésteres de mono-, di- o trifosfato. En dichos ésteres, a menos que se especifique de otra manera, cualquier resto alquilo presente contiene ventajosamente de 1 a 18 átomos de carbono, particularmente de 1 a 6 átomos de carbono, más particularmente de 1 a 4 átomos de carbono. Cualquier resto cicloalquilo presente en dichos ésteres ventajosamente contiene de 3 a 6 átomos de carbono. Cualquier resto arilo presente en dichos ésteres ventajosamente comprende un grupo fenilo, opcionalmente sustituido, como se muestra en la definición de carbociclilo anterior.

Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen, por tanto, ésteres de ácido graso C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>, tales como acetilo, t-butilo o ácidos grasos mono-insaturados omega-6 o insaturados, de cadena larga lineal o ramificada, tales como palmoilo, estearoilo y similares.

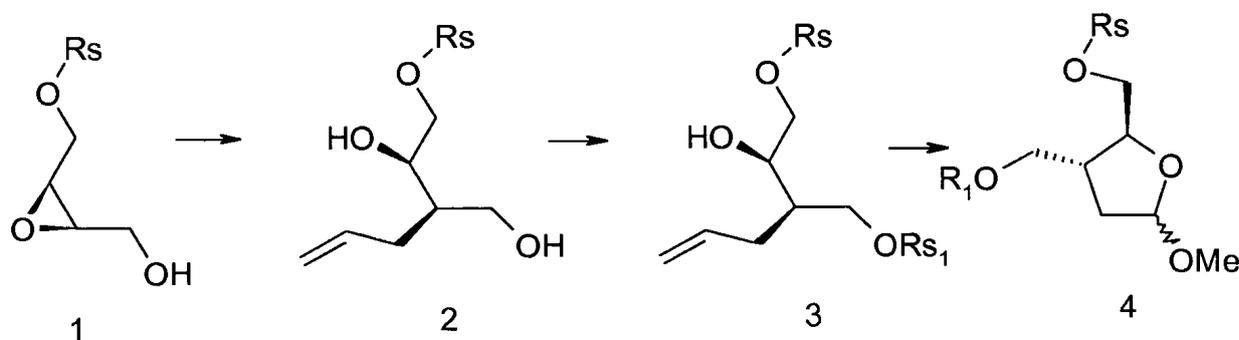
Los ésteres de arilo o heterarilo alternativos incluyen benzoilo, piridilmetiloilo y similares, cualquiera de los cuales

puede estar sustituido, como se ha definido en el carbociclilo anterior. Los ésteres farmacéuticamente aceptables preferidos incluyen ésteres de L-aminoácido alifático, tales como leucilo, isoleucilo y especialmente valilo. Los ésteres de aminoácido preferidos adicionales incluyen los ésteres de ácido graso 2-O-AA-C<sub>3</sub>-C<sub>22</sub> descritos en el documento WO99 09031, donde AA es un éster de aminoácido alifático, especialmente aquellos derivados de ácido L-láctico y L-valilo.

Las amidas farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de aminoalquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub> que opcionalmente incluyen 1 a 3 insaturaciones y/o están opcionalmente sustituidas con los sustituyentes definidos en el carbociclilo anterior, o anilinas o bencilaminas. Las amidas preferidas incluyen aquellas formadas a partir de la reacción de la amina con un ácido alcanoico C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, de cadena lineal o ramificada. Otras amidas farmacéuticamente aceptables de las funciones aminas corresponden a las amidas de los ácidos carboxílicos preferidos para los ésteres indicados anteriormente.

### Síntesis

Los compuestos de la invención se sintetizan típicamente a partir de un derivado de bis-4,5-hidroximetiltetrahidrofurano protegido diferencialmente, preparado análogamente a Svansson L. y col. en J. Org. Chem (1991) Vol 56: 2993-2997, como se describe en el Esquema 1:

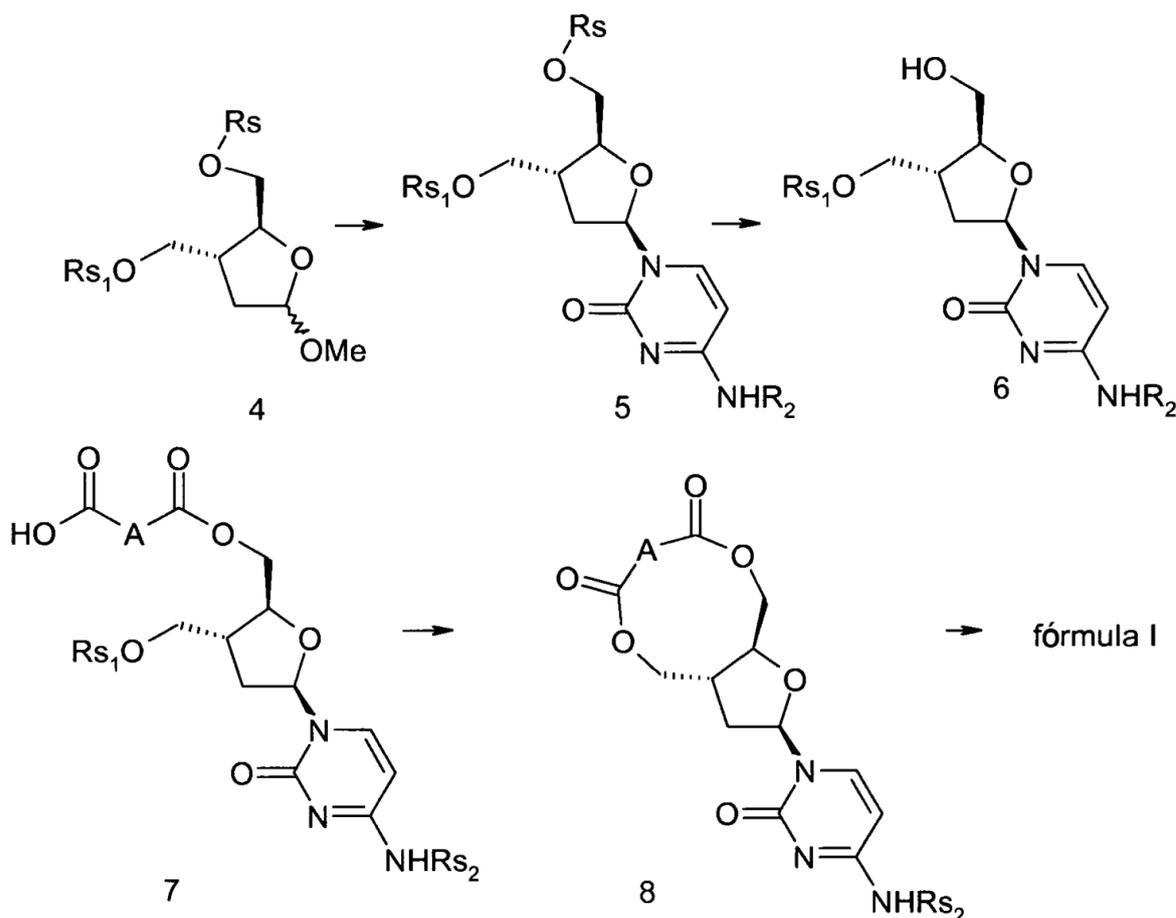


En el Esquema 1, el epoxi alcohol quiral 1 se prepara fácilmente usando oxidación de Sharpless, como se muestra en J Org Chem 1987, 52, 2596. Rs es un grupo protector de hidroxilo convencional, tal como aquellos analizados más adelante, por ejemplo parabromobencilo. El epoxi alcohol 1 está alquilado regioselectivamente en C-3, por ejemplo con bromuro de alilmagnesio en éter dimetílico a -50 grados C. La cromatografía, por ejemplo, con gel de sílice, separa el isómero deseado 2, opcionalmente después de una etapa de diferenciación en la que los hidroxilos vecinales no deseados del regioisómero se escinden con un agente oxidante, tal como peryodato sódico. El grupo hidroxilo primario en 2 está protegido con un grupo protector de hidroxilo adicional, por ejemplo benzoilación con cloruro de benzoilo en piridina a 0 grados C, produciendo un compuesto 3 protegido diferencialmente. La cis-hidroxilación del enlace olefínico usando una cantidad catalítica de tetróxido de osmio y N-óxido de N-metilmorfolina como reoxidante, como se describe en Tet. Lett 1976 17 1973, produce el di-alcohol correspondiente, que a su vez se escinde con un agente oxidante, tal como peryodato sódico, en un disolvente orgánico, tal como tetrahidrofurano acuoso. La furanosa inestable producida de esta manera se desbloquea con un alcohol/ácido, tal como metanol al 0,5% p/p en ácido clorhídrico, para dar el intermedio 4 bis-4,5-hidroximetiltetrahidrofurano protegido diferencialmente.

Puede ser deseable manipular los grupos protectores Rs y Rs1 (es decir, retirar y reprotger con un grupo protector de hidroxilo adicional, optimizando de esa manera la facilidad de retirada selectiva de uno seleccionado de los grupos protectores, y no el otro, en etapas posteriores. Los grupos protectores diferenciales en 4 se seleccionan, por lo tanto, de manera que permitan la retirada selectiva de uno de dichos grupos protectores y la acilación de la función hidroxilo expuesta de esta manera, como se muestra a continuación en los Esquemas 2 y 3. Se conocen muchos de estos pares de grupos protectores de hidroxilo seleccionables diferencialmente, por ejemplo, los grupos O-protectores desvelados en Greene, "Protective Groups In Organic Synthesis", (John Wiley & Sons, Nueva York (1981)).

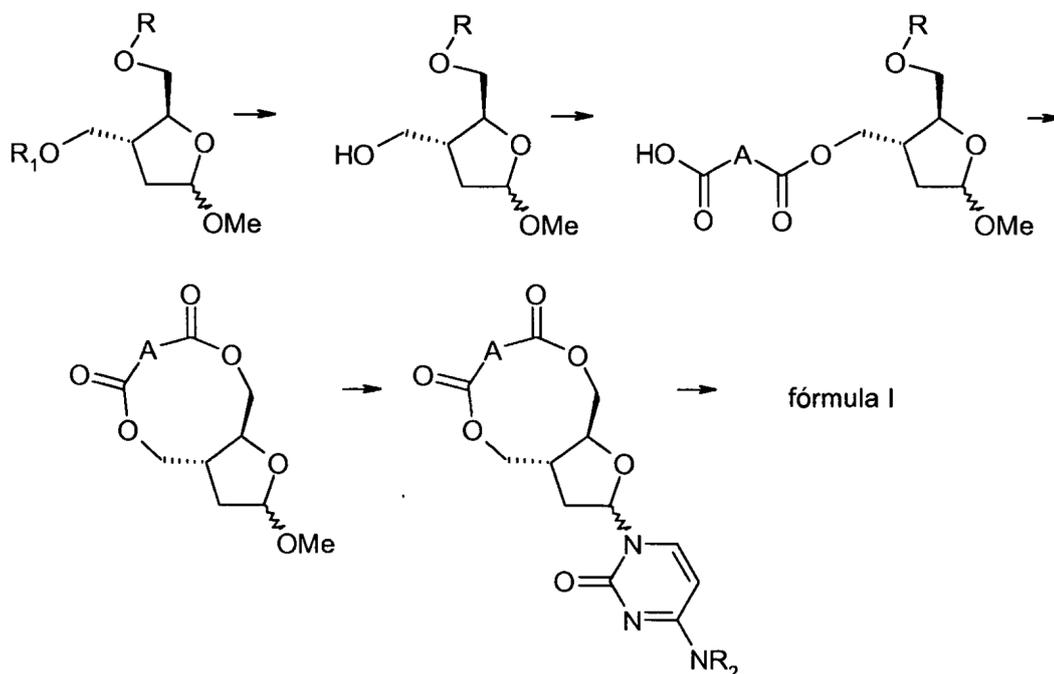
Los grupos hidroxilo protectores comprenden, por lo tanto, éteres tales como éter metílico o éteres metílicos sustituidos, por ejemplo, metoximetilo (MOM), benciloximetilo, t-butoximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, tetrahidropiraniilo (THP), 3-bromotetrahidropiraniilo, tetrahidrotiopiraniilo, 4-metoxitetrahidropiraniilo, 4-metoxitetrahidrotiopiraniilo S,S dióxido, tetrahidrofuranilo y tetrahidrotiofuranilo. Los ésteres etílicos incluyen 1-etoxietilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-(isopropoxi)etilo, 2,2,2-tricloroetilo y 2-(fenilselenil)etilo. Otros éteres t-butilo, alilo, cinnamilo, p-clorofenilo y éteres de bencilo, tales como bencilo no sustituido, p-metoxibencilo, o-nitrobencilo, p-nitrobencilo, p-halobencilo y p-cianobencilo. Otros éteres incluyen N-óxido de 3-metil-2-picolilo, difenilmetilo, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo, alfa naftildifenilmetilo, p-metoxifenildifenilmetilo, p(p'-bromofenaciloxi)fenildifenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo (tritolona) y benzisotiazolil S,S dióxido. Los éteres de sililo incluyen trimetilsililo (TMS), trietilsililo,

- isopropildimetilsililo, t-butildimetilsililo (TBDMS), (trifenilmetil)dimetilsililo, t-butildifenilsililo, metildiisopropilsililo, metildi-t-butilsililo, tribencilsililo, tri-p-xililsililo, triisopropilsililo y trifenilsililo. Los grupos protectores de hidroxilo alternativos incluyen ésteres, tales como formiato, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, p-clorofenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutilo) fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, p-(P)-fenilacetato, 3-fenilpropionato, 3-benzoilpropionato, isobutirato, monosuccinato, 4-oxopentanoato (levinulato), pivaloato, adamantoato, crotonato, 4-metoxicrotonato, (E)-2-metil-2-butenato (tigloato) y benzoatos, tales como los benzoatos no sustituido u o-(dibromometil)-, o-(metoxicarbonil)-, p-fenil-, 2,4,6-trimetil-(mesitato) o p-(P)-benzoatos, o alfa-naftoato. Los grupos protectores de hidroxilo de carbonato incluyen metilo, etilo, 2,2,2-tricloroetilo, isobutilo, vinilo, alilo, cinnamilo, p-nitrofenilo, bencilos tales los bencilos no sustituidos, p-metoxi-, 3,4-dimetoxi-, o-nitro- o p-nitrobencilos o S-bencil tiocarbonato. Los grupos protectores de hidroxilo varios incluyen N-fenilcarbamato, N-imidazolilcarbamato, borato, nitrato, N,N,N,N-tetrametilfosforodiamidato y 2,4-dinitrofenilsulfenato. Greene proporciona tablas de reactividad extensivos para facilitar la selección de pares complementarios de grupos protectores diferenciales.
- 15 Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen aquellos en los ejemplos, y éteres tales como t-butilo y otros éteres de alquilo inferior, tales como isopropilo, etilo y especialmente metilo, bencilo y trifenilmetilo; éteres de tetrahidropiraniolo; éteres de etilo sustituidos, por ejemplo, 2,2,2-tricloroetilo; éteres de sililo, por ejemplo, trimetilsililo, t-butildimetilsililo y t-butildifenilsililo; y ésteres preparados haciendo reaccionar el grupo hidroxilo con un ácido carboxílico, por ejemplo, acetato, propionato, benzoato y similares.
- 20 El bis-4,5-hidroximetiltetrahidrofurano 4 protegido diferencialmente se condensa después con una 4-amino-pirimidinona N-protegida opcionalmente sililada, como se muestra en el Esquema 2, seguido de acilación y ciclación. Como alternativa, el compuesto 4 se biciclica en primer lugar y después se condensa, como se muestra en el Esquema 3.



- 25 El esquema 2 muestra una condensación de Vorbrüggen (Chem Ber. 1981, 114, 1234) del intermedio 4 protegido diferencialmente con 4-amino-pirimidin-2-ona sililada, en el que la función 4-amino está protegida opcionalmente con un grupo protector de amino convencional como se muestra en Greene, "Protective Groups In Organic Synthesis", (John Wiley & Sons, Nueva York (1981)). Los ejemplos de dichos grupos incluyen: 1) grupos acilo tales como

- formilo, trifluoroacetilo, ftalilo y p-toluenosulfonilo; 2) grupos carbamato aromáticos, tales como benciloxycarbonilo (Cbz o Z) y benciloxycarbonilos sustituidos y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc); 3) grupos carbamato alifáticos, tales como *tert*-butiloxycarbonilo (Boc), etoxycarbonilo, diisopropilmetoxycarbonilo y aliloxycarbonilo; 4) grupos alquil carbamato cíclicos, tales como ciclopentiloxycarbonilo y adamantiloxycarbonilo; 5) grupos alquilo, tales como trifenilmetilo y bencilo; 6) trialquilsililo, tal como trimetilsililo; y 7) grupos que contienen tiol, tales como feniltiocarbonilo y ditiassuccinoilo. El grupo protector de amino, por supuesto, se selecciona de manera que sus condiciones de desprotección armonizan con la secuencia de retirada de los grupos protectores de hidroxilo diferenciales. Se desvela también que  $Rs^2$  es un síntón para amidas e iminas. No se requiere grupo protector en absoluto para la función 4-amino y, por tanto,  $Rs^2$  es H.
- 10 Como es habitual en la condensación de Vorbrüggen, la mezcla de reacción contiene TBDMSOTf y  $CH_2Cl_2$ , y el isómero 5 deseado se separa con cromatografía, por ejemplo HPLC. Uno de los grupos protectores de hidroxilo en 5 se retira después selectivamente para dejar al descubierto la función hidroxilo. En el esquema 2, compuesto 6, es  $Rs$  el que se retira en primer lugar, y el par diferencial de los grupos protectores de hidroxilo, por lo tanto, puede ser por ejemplo TBDP (*tert*-butil-silanilo), retirado selectivamente con TBAF en tetrahidrofurano para  $Rs$  y MMTR (4-metoxifenil-difenilmetilo) retirado posteriormente con ácido acético para  $Rs^1$ . Sin embargo, es fácilmente evidente que otras permutaciones de grupos protectores conseguirán el mismo objetivo. Greene proporciona tablas de reactividad extensivas sobre diversos grupos protectores para facilitar dicha selección. Adicionalmente, cambiando las posiciones de  $Rs$  y  $Rs^1$  mediante la manipulación apropiada de 4 producirá un intermedio en el que la función 4-hidroximetilo es enmascarada y acilada en primer lugar.
- 15
- 20 La función hidroxilo desenmascarada en 6 se acila con un ácido  $\omega\omega$ -dicarboxílico activado,  $HOOC-A-COOH$ , donde A corresponde a  $-(CR^1R^2)_n-$ , como se ha definido anteriormente, para producir 7. En el caso de que  $R^1$  o  $R^2$  contengan un grupo potencialmente reactivo, tal como OH,  $NH_2$  o COOH, éstos se protegen convencionalmente como se describe en Greene *ibid*.
- 25 El ácido activado usado en la acilación puede comprender, por ejemplo, el haluro de ácido, anhídrido de ácido, éster de ácido activado o el ácido en presencia de reactivo de acoplamiento, por ejemplo dicitclohexilcarbodiimida. Los derivados de ácido activado representativos incluyen el cloruro de ácido, anhídridos derivados de haluros de alcoxycarbonilo, tales como cloruro de isobutiloxycarbonilo y similares, ésteres derivados de N-hidroxisuccinamida, ésteres derivados de N-hidroxiftalimida, ésteres derivados de N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxamida, ésteres derivados de 2,4,5-triclorofenol y similares. Los ácidos activados adicionalmente incluyen aquellos de fórmula  $HCOOHACOOX$ , donde X es, por ejemplo,  $COCH_3$ ,  $COCH_2CH_3$  o  $COCF_3$  o benzotriazol.
- 30 El grupo protector  $Rs^1$  en el Compuesto 7 se retira después para liberar el grupo 4-hidroximetilo de 8 en la preparación para la ciclación del segundo anillo del sistema de anillo de tetrahidrofurano bicíclico. Esto transcurre por acilación, como se ha descrito en el principio anterior.
- 35 El grupo  $Rs^2$  del Compuesto 8 se manipula después para producir los compuestos de fórmula 1, según sea necesario. Por ejemplo, un grupo protector amino como  $Rs^2$  puede retirarse para producir la amina libre en  $R^5$  y  $R^6$ .
- En la Figura 3 se muestra un esquema de síntesis alternativo para los compuestos de fórmula 1:

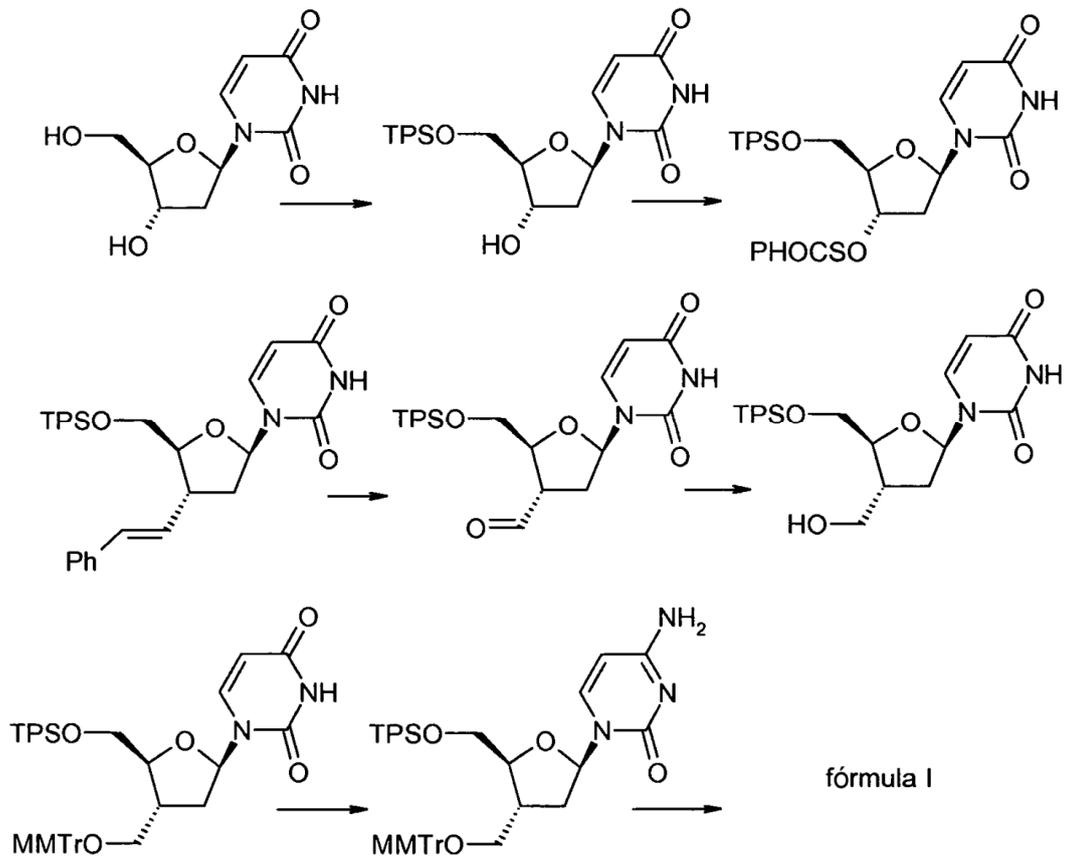


En el esquema 3, el tetrahidrofurano 4 protegido diferencialmente, descrito anteriormente, se bicicla en primer lugar y después se somete a condensación de Vorbrüggen. La biciclación transcurre mediante desprotección de un primer elemento del par  $R_s/R_s^1$  de grupos protectores complementarios. En este caso, es la función 4-hidroximetilo del tetrahidrofurano la que se libera en primer lugar, lista para la acilación, aunque esta metodología general, con la elección de los grupos protectores  $R_s/R_s^1$  apropiados, puede transcurrir también por retirada y acilación de la función 5-hidroximetilo como la primera etapa para la ciclación.

La elección de 4- o 5-desprotección en primer lugar es significativa en aquellos casos en los que A en el ácido  $\omega\omega$ -dicarboxílico,  $\text{HOOC-A-COOH}$ , es asimétrico, es decir, en compuestos de fórmula I en la que m es 2 ó 3 y en la que  $R^1/R^2$  en los diversos meros de metileno no son idénticos. Por ejemplo, cuando A es  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$  (es decir, en la fórmula 1, n es 2,  $R^1$  en el primer grupo metileno es OH mientras que  $R^2$  es H, ambos  $R^1$  y  $R^2$  en el segundo grupo metileno son H), entonces la localización del grupo hidroxilo  $R^1$  adyacente al enlace éster de la función 4-hidroximetilo del intermedio de tetrahidrofurano puede asegurarse desprotegiendo  $R_s$  en primer lugar y usando el ácido activado  $\text{PG-OC-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-COOH}$ , donde PG es un grupo protector de carboxi convencional, que por supuesto se seleccionada de manera que sus condiciones de retirada armonicen con la retirada pretendida de  $R_s^1$ . Greene proporciona tablas de reactividad extensivas par facilitar dicha selección.

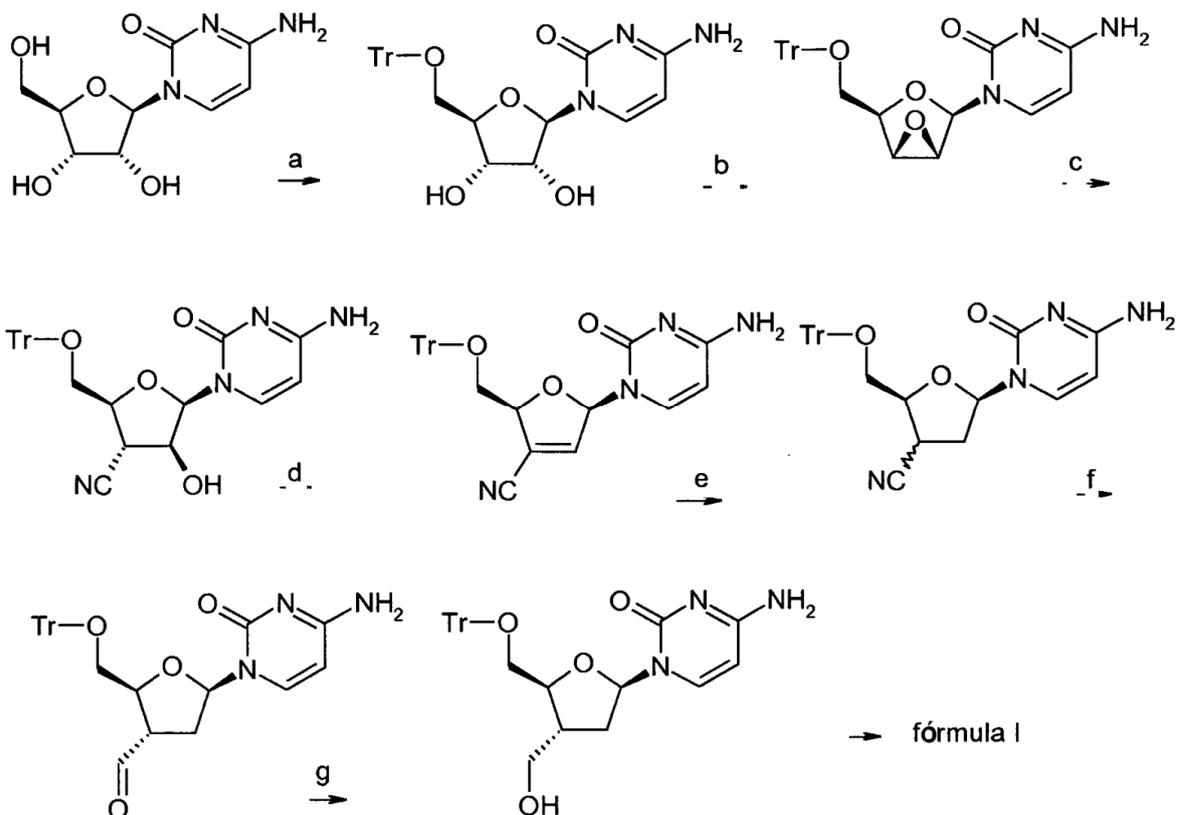
Los grupos protectores de carboxi se revisan extensivamente en Greene *ibid* y, típicamente, comprenden ésteres tales como ésteres metílicos o ésteres metílicos sustituidos, por ejemplo metoximetilo, metiltiometo, tetrahidropirano, tetrahidrofurano, metoxietoxietilo, benciloximetilo, fenacilo, incluyendo p-bromo, alfa metilo o p-metoxifenacilo, diacilmeto, o N-ftalimidometilo. Los ésteres etílicos incluyen etilo no sustituido y 2,2,2-tricloroetilo, 2-haloetilo,  $\omega$ -cloralquilo, 2-(tri-metilsilil)etilo, 2-metiltietilo, 2-(p-nitrofenilsulfenil)etilo, 2-(p-toluenosulfonil)etilo y 1-metil-1-fenilo. Otros ésteres incluyen t-butilo, ciclopentilo, ciclohexilo, alilo, cinnamilo y fenilo, incluyendo m-metiltiofenilo. Los ésteres bencílicos incluyen bencilo no sustituido, trifenilmetilo, difenilmetil incluyendo bis(o-nitrofenil)metilo, 9-antrilmetilo, 2-(9,10-dioxo)antrilmetilo, dibenzosuberilo, 2,4,6-trimetilbencilo, p-bromobencilo, o-nitrobencilo, p-nitrobencilo, p-metoxibencilo, piperonilo, 4-picolilo y p-(P)-bencilo. Los ésteres de sililo incluyen trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, i-propildimetilsililo y fenildimetilsililo. Los ésteres activados incluyen S-t-butilo, S-fenilo, S-2-piridilo, N-hidroxipiperidinilo, N-hidroxisuccinimidoilo, N-hidroxiftalimidoilo, y N-hidroxibenzotriazolilo. Los grupos protectores de carboxi de ésteres varios incluyen O-acil oximas, 2,4-dinitrofenilsulfenilo, 2-alquil-1,3-oxazolidinas, 4-alquil-5-oxo-1,3-oxazolidinas y 5-alquil-4-oxo-1,3-dioxolanos. Los ésteres estannilo incluyen dietilestannilo y tri-n-butilstannilo. Los grupos protectores de carboxi distintos de éster incluyen amidas, tales como N,N-dimetilo, pirrolidinilo, piperidinilo, o-nitrofenilo, 7-nitroindolilo, 8-nitrotetrahydroquinolilo y p-(P)bencenosulfonamida. Los grupos protectores de carboxi distintos de éster también incluyen hidrazidas, tales como N-fenilhidrazida o N,N'-diisopropilhidrazida.

En el Esquema 4 se muestra un esquema alternativo para los derivados de tetrahidrofurano protegidos diferencialmente:



5 El esquema 4 se muestra extensivamente en la bibliografía académica. La preparación de los precursores de análogo de uridina se muestra en Sanghvi y col. *Synthesis* 1994, 1163, Sanghvi y col. *Tett Lett* vol 35 pág. 4697 (1994) y Haly & Sanghvi *Nucleosides & Nucleotides* Vol 15 1383 (1996). La conversión de los análogos de uridina a citosina se muestra en Kozlov, *Nucleosides & Nucleotides* vol 17 2249 (1998).

En el Esquema 5 se muestra una ruta alternativa a los tetrahidrofuranos protegidos diferencialmente que no requiere conversión de la base i:



a: TrCl, piridina, b: i) MsCl, Pir ii) 1 NaOH N, THF, c) i) EtAlCl<sub>2</sub>, 65°C, ii) tolueno/THF, d) i) MsCl, Et<sub>3</sub>N, ii) EtOAc, f) i) NaBH<sub>4</sub> ii) EtOH,  $\alpha/\beta$  1:3-4, g) i) DIBAL, ii) gel de sílice EtOAc, epimerizar  $\alpha/\beta$  93:7, g) i) NaBH<sub>4</sub>, ii) EtOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

5 Aunque el esquema 5 se ha ilustrado con el grupo protector TrO y R<sup>5</sup>R<sup>6</sup> = H, será evidente que otras variantes para los grupos protectores de amina e hidroxilo serán posibles para este ruta.

#### Descripción detallada de las realizaciones

Las diversas realizaciones de los compuestos de la invención se describirán ahora a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los siguientes ejemplos y Figuras; en los que

10 La Fig. 1 es un gráfico de las concentraciones en plasma con el tiempo de metabolito *in vivo* después de administración oral de un compuesto de la invención a ratas;

La Fig. 2 representa la inhibición de cepas TAM típicas que tienen un fenotipo de rescate de cebador mediante el precursor de los compuestos de la invención respecto a la inhibición de NRTI convencionales, como se analiza adicionalmente en el Ejemplo Biológico 2a;

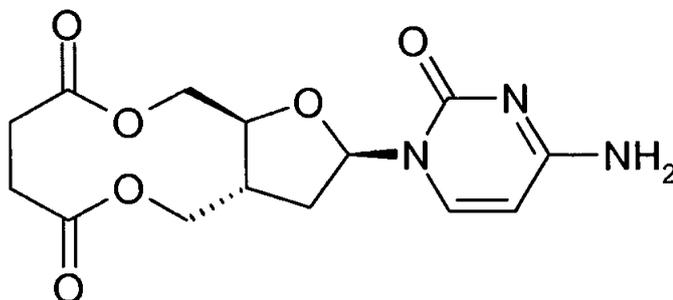
15 La Fig. 3 representa la inhibición de M184V + TAM que tienen un fenotipo de rescate de cebador mediante el precursor de los compuestos de la invención, respecto a la inhibición de NRTI convencionales, como se analiza adicionalmente en el Ejemplo Biológico 2b;

La Fig. 4 representa la inhibición de T69S + TAM mediante el precursor de los compuestos de la invención, respecto a la inhibición de NRTI convencionales, como se analiza adicionalmente en el Ejemplo Biológico 2c;

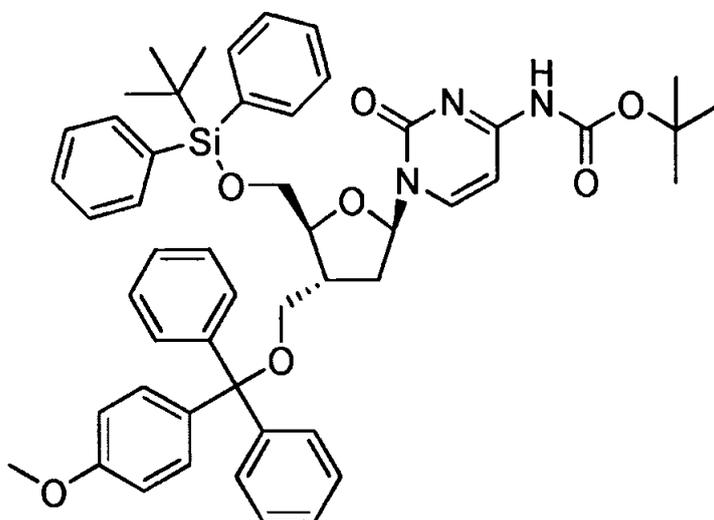
20 La Fig. 5 representa la inhibición de cepas TAM mediante el precursor de los compuestos de la invención, respecto a la inhibición por zidovudina y lamivudina, como se analiza adicionalmente en el Ejemplo Biológico 3.

## Ejemplo 1

2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,10-trioxaciclopentaciclodecen-6,9-diona



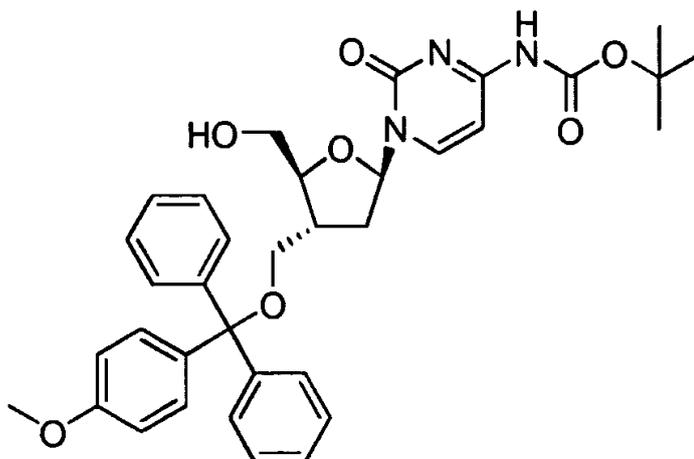
5 a) éster *terc*-butílico del ácido N-(1-{5-(*terc*-butil-difenil-silaniloximetil)-4-[(4-metoxi-fenil)-difenil-metoximetil]-tetrahidrofuran-2-il}-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il)-carbámico



10 A una solución de 0,75 g (1 mmol) de 4-amino-1-{5-(*terc*-butil-silaniloximetil)-4-[(4-metoxifenil)-difenilmetoximetil]-tetrahidrofuran-2-il}-1H-pirimidin-2-ona, preparada como en el Esquema 4 anterior, en dioxano (25 ml) en nitrógeno se le añadió una solución de bicarbonato de di-*terc*-butilo (0,44 g, 2 mmol) en dioxano (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. La mezcla de reacción se evaporó sobre gel de sílice y el residuo se purificó en una columna de gel de sílice usando acetato de etilo/hexanos 2:1 como eluyente, dando 0,42 g (49%) del producto representado anteriormente.

15 RMN de protones (CDCl<sub>3</sub>): 8,33 (d, 1H), 7,64-7,59 (m, 4H), 7,45-7,18 (m, 18H), 6,91 (d, 1H), 6,79-6,77 (m, 2H), 6,10-6,08 (m, 1H), 4,08-4,06 (m, 1H), 3,98-3,96 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,59 (dd, 1H), 3,19-3,16 (m, 1H), 3,02-2,98 (m, 1H), 2,57-2,53 (m, 2H), 2,72-2,25 (m, 1H), 1,50 (s, 9H), 1,08 (s, 9H).

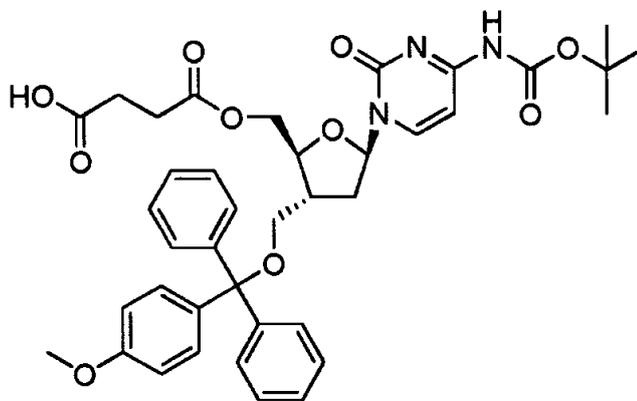
b) éster *terc*-butílico del ácido (1-{5-hidroximetil-4-[(4-metoxifenil)-difenil-metoximetil]-tetrahidrofuran-2-il}-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il)-carbámico



5 A una solución del compuesto anterior (0,33 g, 0,4 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) se le añadió una solución de TBAF (0,19 g, 0,6 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se evaporó sobre gel de sílice y el residuo se purificó en una columna de gel de sílice usando acetato de etilo/hexanos 2:1 como eluyente. La evaporación de las fracciones apropiadas dio 0,20 g (80%) de éster *tert*-butílico del ácido (1-{5-hidroxiometil-4-[(4-metoxifenil-difenil-metoximetil]-tetrahidrofuran-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-carbámico.

RMN de protones (CDCl<sub>3</sub>): 8,22 (d, 1H), 7,40-7,38 (m, 4H), 7,38-7,23 (m, 10H), 6,85-6,82 (m, 1H), 6,03-6,00 (m, 1H), 4,04-3,94 (m, 2H), 3,85-3,81 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,29 (dd, 1H), 3,11 (dd, 1H), 2,35-2,22 (m, 3H), 1,52 (s, 9H).

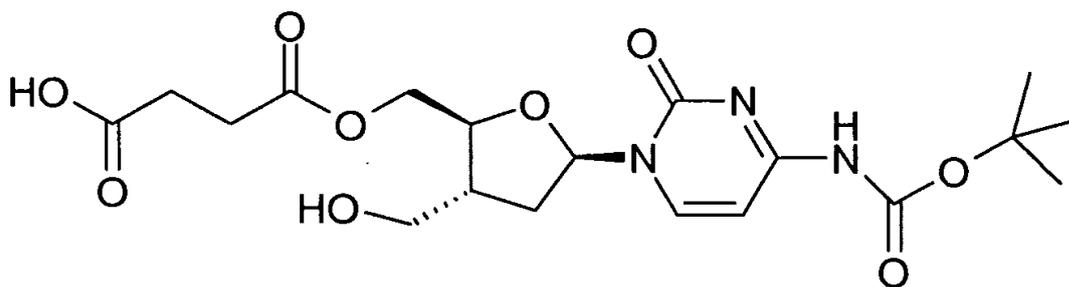
10 c) mono-{5-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-3-[(4-metoxi-fenil)-difenil-metoximetil]-tetrahidrofuran-2-il-metil} éster del ácido succínico



15 A una solución del compuesto anterior (200 mg, 0,33 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (98 mg, 0,8 mmol) en diclorometano (20 ml) se le añadió anhídrido succínico (80 mg, 0,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, después de la cual la mezcla de reacción se añadió a una mezcla de diclorometano y cloruro amónico saturado. La fase orgánica se lavó con agua y se secó. La evaporación del disolvente dio 222 g (94%) del compuesto representado anteriormente.

20 RMN de protones (CDCl<sub>3</sub>): 8,02 (d, 1H), 7,38-7,36 (m, 4H), 7,30-7,15 (m, 9H), 6,84-6,81 (m, 2H), 5,89-5,87 (m, 1H), 4,58 (dd, 1H), 4,26 (dd, 1H), 4,13-4,08 (m, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,24 (dd, 1H), 3,05 (t, 1H), 3,80-3,60 (m, 4H), 3,31-3,26 (m, 1H), 3,17-3,12 (m, 2H), 1,51 (s, 9H).

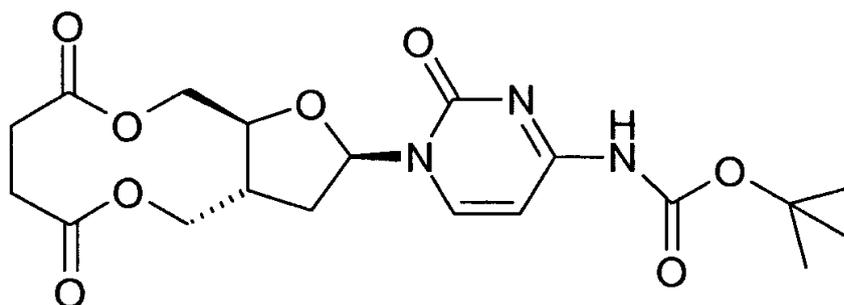
d) mono-[5-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-3-hidroxiometil-tetrahidro-furan-2-il-metil] éster del ácido succínico



Una solución del compuesto anterior (222 mg, 0,31 mmol) en ácido acético (10 ml) y agua (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. CL/EM indicó la conversión completa del material de partida al compuesto desprotegido deseado con un ión M+1 de 442. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se purificó en una columna de fase inversa C-8, eluida con acetonitrilo/agua 1:1,5 como eluyente, dando 100 mg (73%) del compuesto deseado representado anteriormente.

RMN de protones (CDCl<sub>3</sub>): 8,18 (d, 1H), 7,23 (d, 1H), 5,93 (s a, 1H), 4,66-4,63 (m; 1H), 4,33 (d, 1H), 4,15 (s a, 1H), 3,66 (s a, 2H), 2,80-2,59 (m, 4H), 2,37 (s a, 2H), 2,28-2,44 (m, 1H), 1,51 (s, 9H).

e) éster *tert*-butílico del ácido [1-(6,9-dioxo-decahidro-1,5,10-trioxa-ciclopentadecan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il]-carbámico



A una solución del compuesto anterior (74 mg, 0,168 mmol), HOBt (27 mg, 0,2 mmol) y trietilamina (0,14 ml, 1 mmol) en diclorometano (65 ml) y DMF (2 ml) se le añadió EDAC (39 mg, 0,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h, después de las cuales la mezcla de reacción se vertió en diclorometano (100 ml) y ácido cítrico acuoso (100 ml). La fase orgánica se lavó con solución de hidrogenocarbonato sódico y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se evaporó hasta un residuo, que se purificó sobre una columna de gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente, dando 22 mg (31%) del compuesto mostrado anteriormente.

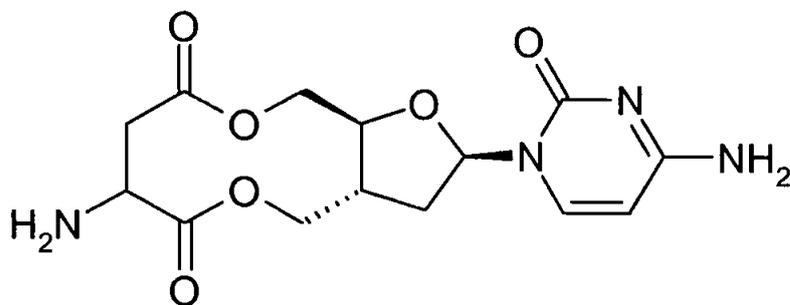
RMN de protones (CDCl<sub>3</sub>): 7,75 (d, 1H), 7,36 (s a, 1H), 7,25 (d, 1H), 6,02-5,99 (m, 1H), 4,58 (dd, 1H), 4,36-4,28 (m, 2H), 4,14 (t, 2H), 2,64 (s, 4H), 2,58-2,55 (m, 1H), 2,29-2,25 (m, 2H), 1,52 (s, 9H).

f) 2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,10-trioxaciclopentadecan-6,9-diona

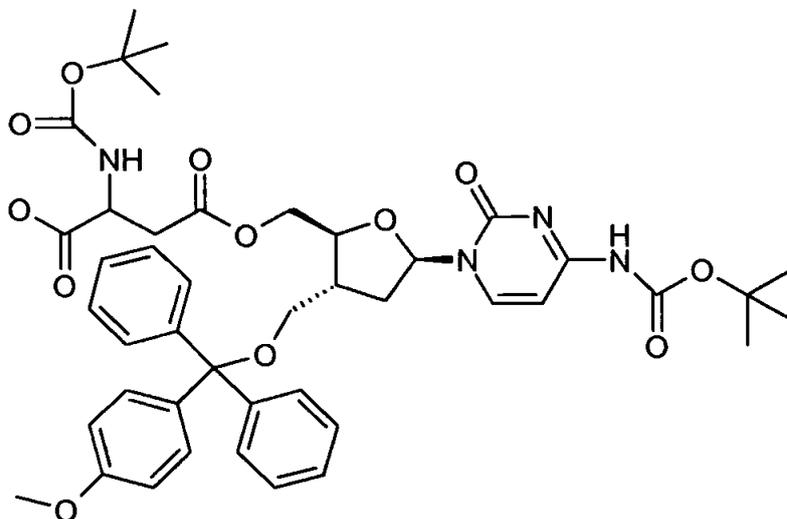
A una solución del compuesto anterior (22 mg, 0,052 mmol) en diclorometano (2 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se evaporó a sequedad. La co-evaporación dos veces con tolueno dio, después del secado cuidadoso, 12,7 mg del compuesto mencionado como la sal bis-trifluoroacetato. CL/EM confirmó la estructura con iones característicos de 324 (M+1) y 647 (2M+1) y la pureza por HPLC estaba por encima del 90% a 254 nm.

## Ejemplo 2

7-amino-2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,10-trioxaciclopentaciclodecen-6,9-diona



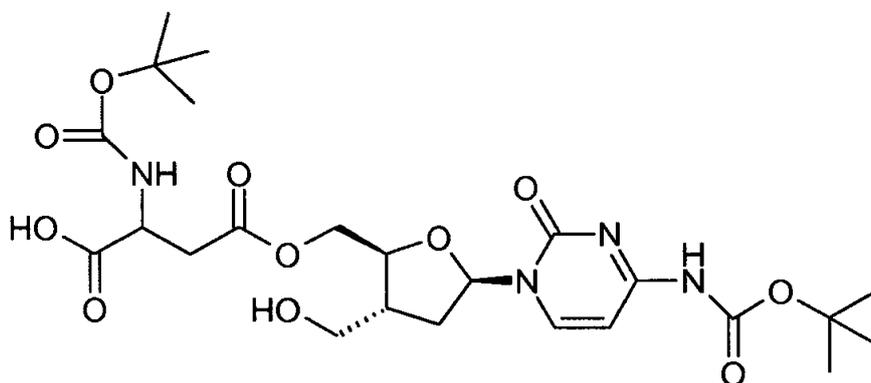
- 5 a) 4-{5-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-3-[(4-metoxifenil)-difenilmetoximetil]-tetrahidro-furan-2-il-metil} éster del ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-succínico



- 10 A una solución de éster *tert*-butilico del ácido (1-{5-hidroxi-metil-4-[(4-metoxifenil)-difenilmetoximetil]-tetrahidrofuran-2-il}-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il)-carbámico [98 mg, 0,4 mmol, descrito en el Ejemplo 1] y 4-metilaminopiridina (98 mg, 0,8 mmol) en diclorometano (20 ml) se le añadió anhídrido de N-Boc-(S)asp [172 mg, 0,8 mmol (preparado como se describe en J. Med. Chem. 1971, pág. 24-30)]. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, después de la cual la mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (150 ml) y cloruro de amonio de saturado (100 ml). La fase orgánica se lavó con agua, se secó con sulfato sódico y se evaporó dando 371 mg de un producto bruto representado anteriormente, que se usó sin ninguna purificación en la siguiente etapa.

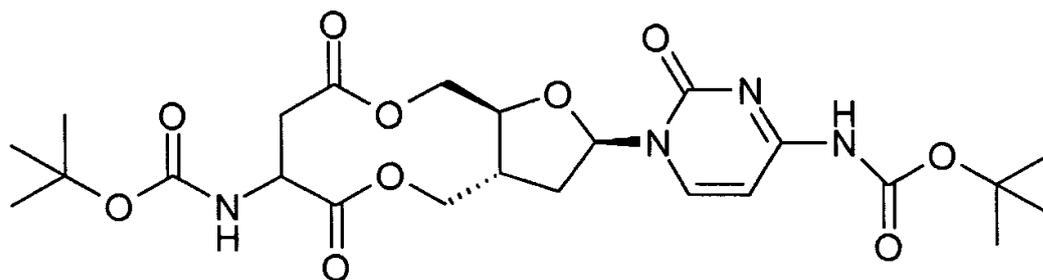
- 15 RMN de protones (CDCl<sub>3</sub>): 7,76 (d, 1H), 7,38-7,20 (m, 12 H), 7,08 (d, 1H), 6,83 (d, 2H), 6,13 (d, 1H), 5,80 (d, 1H), 4,83 (t, 1H), 4,61-4,58 (m, 1H), 4,14-4,06 (m, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,25-3,23 (m, 1H), 3,17-3,12 (m, 1H), 3,00 (t, 1H), 2,80-2,76 (m, 1H), 2,26-2,15 (m, 3H), 1,56 (s, 9H), 1,4 (s, 9H).

- b) 4-[5-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-3-hidroxi-metil-tetrahidrofuran-2-il-metil] éster del ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-succínico



5 Una solución del compuesto anterior (330 mg, 0,40 mmol) en ácido acético (10 ml) y agua (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se purificó en una columna de fase inversa C-8 eluida con acetonitrilo/agua 1:1,5 como eluyente, dando 72 mg (32%) del compuesto deseado. CL/EM confirmó la estructura correcta con un ión molecular de 557 (M+1).

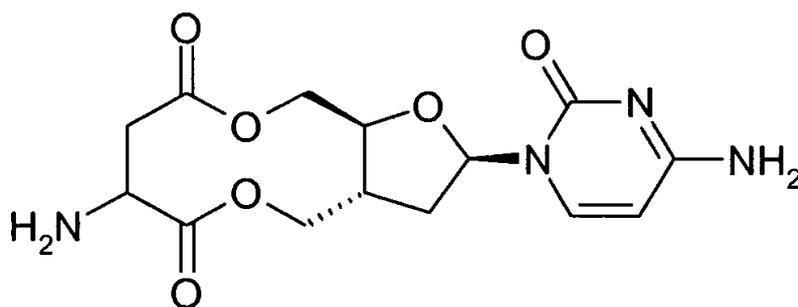
c) éster *tert*-butilico del ácido [1-(7-*tert*-butoxicarbonilamino-6,9-dioxo-decahidro-1,5,10-trioxaciclopentacyclodecen-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il]-carbámico



10 A una solución del compuesto anterior (72 mg, 0,13 mmol), HOBT (20 mg, 0,16 mmol) y trietilamina (0,07 ml, 0,5 mmol) en diclorometano (50 ml) y DMF (1 ml) se le añadió EDAC (31 mg, 0,16 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, después de las cuales la mezcla de reacción se vertió en diclorometano (100 ml), y la fase orgánica se lavó con solución de ácido cítrico, solución de hidrogenocarbonato sódico y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se evaporó hasta un residuo que se purificó en una columna de gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente, dando 26 mg (37%) del compuesto mostrado anteriormente. CL/EM dio el ión molecular M+1 de 539 y el ión M-1 de 537.

15 RMN de protones (CDCl<sub>3</sub>): 7,73 (d, 1H), 7,40 (s a, 1H), 7,24 (d, 1H), 6,02-6,00 (m, 1H), 5,26-5,24 (m, 1H), 4,87-4,85 (m, 1H), 4,64-4,55 (m, 2H), 4,20-4,18 (m, 1H), 4,06 (t, 1H), 3,84 (t, 1H), 3,00-2,90 (m, 1H), 2,76-2,66 (m, 1H), 2,57-2,52 (m, 1H), 2,31-2,17 (m, 2H), 1,52 (s, 9H), 1,45 (s, 9H).

d) 7-amino-2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,10-trioxaciclopentacyclodecen-6,9-diona

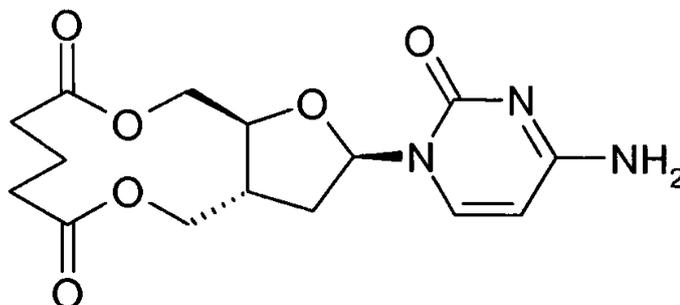


20 A una solución del compuesto anterior (26 mg, 0,05 mmol) en diclorometano (2 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se evaporó a sequedad. La co-

evaporación dos veces con tolueno dio, después del secado cuidadoso, 24 mg del compuesto del título como la sal bis trifluoroacetato. CL/EM confirmó la estructura con iones característicos de 339 (M+1) y 667 (2M+1) y 337 (M-1).

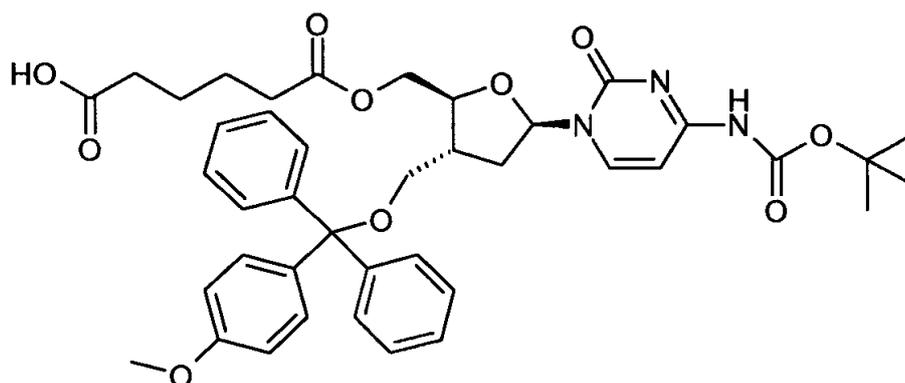
### Ejemplo 3.

#### 2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,11-trioxaciclopentacicloundecen-6,10-diona



5

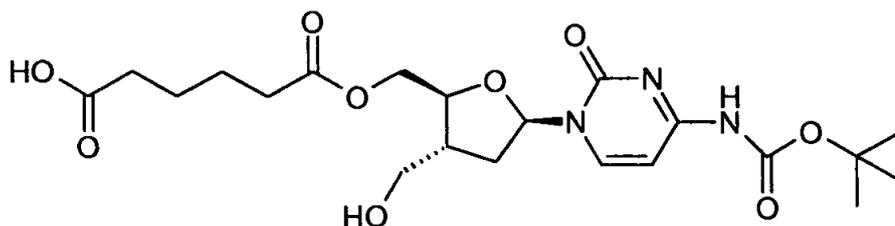
a) mono-[5-[4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il]-3-[(4-metoxi-fenil)-difenilmetoximetil]-tetrahidrofuran-2-il-metil] éster de ácido hexanodioico



10 A una solución de éster *tert*-butílico del ácido (1-[5-hidroxi-metil-4-[(4-metoxifenil)-difenilmetoximetil]-tetrahidrofuran-2-il]-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-il)-carbámico [730 mg, 1,19 mmol, descrito en el Ejemplo 1] y 4-metilaminopiridina (350 mg, 2,86 mmol) en diclorometano (80 ml) se le añadió anhídrido glutámico (327 mg, 2,86 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, después de la cual la mezcla de reacción se vertió en diclorometano. La fase orgánica se lavó con solución de cloruro amónico diluido, solución de ácido cítrico diluido, agua y salmuera, y se secó con sulfato sódico y se evaporó dando 819 mg (95%) de un producto bruto representado anteriormente, que se usó sin purificación en la siguiente etapa.

15

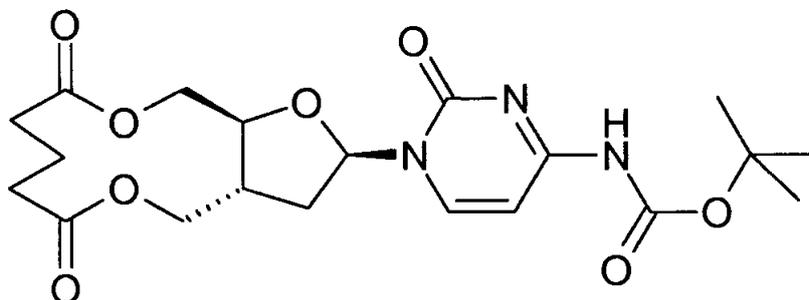
b) mono-[5-[4-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il]-3-hidoximetil-tetrahidro-furan-2-il-metil] éster del ácido hexanodioico



20

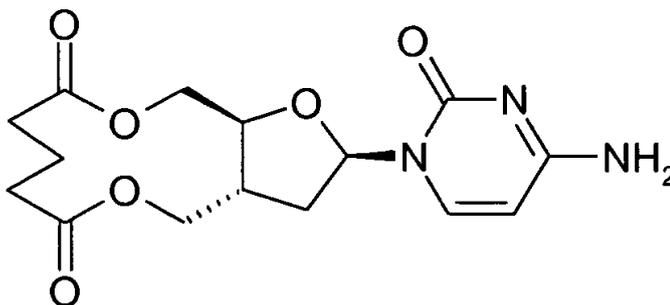
Una solución del compuesto anterior (1,09 g, 1,5 mmol) en ácido acético (50 ml) y agua (25 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se purificó en una columna de gel de sílice eluida con EtOAc/MeOH 9:1 como eluyente, dando 435 mg (64%) del compuesto deseado.

c) éster *terc*-butilico del ácido [1-(6,10-dioxo-decahidro-1,5,11-trioxo-ciclopentacicloundecen-2-il)-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il]-carbámico



5 A una solución del compuesto anterior (395 mg, 0,87 mmol), HOBT (235 mg, 1,74 mmol) y DMAP (213 mg, 1,74 ml) en DMF (120 ml) se le añadió EDAC (334 mg, 1,74 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h después de lo cual el disolvente se evaporó. Se añadió diclorometano al residuo de reacción y se diluyó con solución de cloruro amónico, solución de ácido cítrico diluido, agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se evaporó dando 350 mg de un producto en bruto. CL/EM mostró que el producto deseado con iones a 438 (M+1), 496 (M+acetato), 875 (2M+1) y 435 (M-1). Dos purificaciones en una columna de fase inversa C-8 se eluyeron con acetonitrilo/agua 1:1 y acetonitrilo/agua 1:1,25 dando, después de la evaporación y liofilización, 31 mg del compuesto de título con una pureza de aproximadamente el 50%, como se determina por HPLC a 220 nM.

d) 2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,11-trioxociclopentacicloundecen-6,10-diona



15 A una solución a  $\pm 0^\circ\text{C}$  del compuesto anterior (31 mg) en diclorometano (2 ml) se añadió ácido trifluoroacético (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a  $\pm 0^\circ\text{C}$  durante 2 h y, después, a temperatura ambiente durante 2 h más. Posteriormente, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y finalmente la co-evaporación con tolueno dio un producto bruto que se purificó en una columna de fase inversa C-8 con acetonitrilo/agua 1:2. Las fracciones apropiadas se evaporaron después de la adición de TFA y se obtuvieron 31 mg del compuesto del título como la sal trifluoroacetato. CL/EM confirmó la estructura con iones característicos de 338 (M+1), 396 (M+acetato) y 675 (2M+1), y la pureza a 220 nM era de aproximadamente el 70%.

Ejemplo biológico 1 A:

Farmacocinética de rata

25 El compuesto del Ejemplo 1 se disolvió en agua de uso MQ, 3 mg/ml y se administró por vía oral a ratas por duplicado. La dosis fue de 15 mg/kg y se tomaron muestras de plasma a  $t_0$ , 15 y 30 minutos, 1, 2, 4 y 6 horas. La recuperación (como el metabolito 2',3'-dideoxi-3'-C-hidroximetil- $\beta$ -D-*eritropentofuranosilcitosina*) en el plasma se midió con espectrometría de masas, detectada como el aducto sódico  $m/z$  264 (M+Na)+.

30 Como puede verse en la Figura 1, el compuesto de la invención proporcionó una concentración en plasma sustancial del metabolito 2',3'-dideoxi-3'-C-hidroximetil- $\beta$ -D-*eritropentofuranosilcitosina* con una concentración pico a esta dosis de aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ . Como las ratas no pueden infectarse con VIH, la actividad antirretroviral de esta formulación no puede medirse directamente en este ejemplo, pero se observa que la  $DE_{50}$  para el metabolito 2',3'-dideoxi-3'-C-hidroximetil- $\beta$ -D-*eritropentofuranosilcitosina* es típicamente de aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$  en células H9 humanas. Esto a su vez significa que la concentración en plasma pico es varios cientos de veces mayor que la  $DE_{50}$ . Otros parámetros farmacéuticos tales como AUC y eliminación son coherentes con conseguir un nivel valle de 24 horas bastante por encima de la  $DE_{50}$  con dosificación QD o BID.

Ejemplo biológico 1BPermeabilidad

Este ejemplo mide el transporte de inhibidores a través de las células del canal gastroentérico humano. El ensayo usa las células bien conocidas Caco-2 con un número de pases entre 40 y 60.

## 5 Transporte apical a basolateral

10 Generalmente cada compuesto se ensayará en 2-4 pocillos. Los pocillos basolaterales y los apicales contendrán 1,5 ml y 0,4 ml de tampón de transporte (TB), respectivamente, y la concentración convencional de las sustancias ensayadas es 10  $\mu$ M. Además, todas las soluciones de ensayo y tampones contendrán DMSO 1 %. Antes del experimento las placas de transporte se revisten previamente con medio de cultivo que contiene suero 10 % durante 30 minutos para evitar unión no específica al material plástico. Después de 21 a 28 días en cultivo en soportes de filtro las células están listas para experimentos de permeabilidad.

La placa de transporte nº 1 comprende 3 filas de 4 pocillos cada una. La fila 1 se indica como lavado, fila 2 "30 minutos" y fila 3 "60 minutos". La placa de transporte nº 2 comprende 3 filas de 4 pocillos, una denominada fila 4 "90 minutos", fila 5 "120 minutos" y la fila restante no asignada.

15 El medio de cultivo de los pocillos apicales se retira y los insertos se transfieren a una fila de lavado (Nº 1) en una placa de transporte (placa nº 1) de dos placas sin insertos, que ya se han preparado con 1,5 ml de tampón de transporte (HBSS, HEPES 25 mM, pH 7,4) en las filas 1 a 5. En la exploración A→B el TB en pocillo basolateral también contiene Albúmina de Suero Bovino 1 %. Se añaden 0,5 ml de tampón de transporte (HBSS, MES 25 mM, pH 6,5) a los insertos y las monocapas celulares se equilibran en el sistema de tampón de transporte durante 30 minutos a 36 °C en un agitador polymix. Después de equilibrarse con el sistema de tampón el valor de resistencia eléctrica Transepitelial (TEER) se mide en cada pocillo por un instrumento de palillos EVOM. Los valores TEER están habitualmente entre 400 y 1.000  $\Omega$  por pocillo (depende del número de pases usado).

25 El tampón de transporte (TB, pH 6,5) se retira del extremo apical y el inserto se transfiere a la fila de 30 minutos (Nº 2) y se añaden 425  $\mu$ l de TB fresco (pH 6,5), que incluye la sustancia de ensayo al pocillo apical (donador). Las placas se incuban en un agitador polymix a 37 °C con una velocidad de agitación lenta de aproximadamente 150 a 300 rpm.

Después de 30 minutos de incubación en la fila 2 los insertos se moverán a nuevos pocillos basolaterales precalentados (receptores) cada 30 minutos; fila 3 (60 minutos), 4 (90 minutos) y 5 (120 minutos).

30 Se tomarán muestras de 25  $\mu$ l de la solución apical después de aproximadamente 2 minutos y al final del experimento. Estas muestras representan muestras donadoras del comienzo y el final del experimento.

Se tomarán 300  $\mu$ l de los pocillos basolaterales (receptores) en cada punto temporal programado y se mide el valor posterior de TEER al final del experimento. Para todas las muestras recogidas se añadirá acetonitrilo a una concentración final de 50 % en las muestras. Las muestras recogidas se almacenarán a -20 °C hasta su análisis por HPLC o EM-CL.

## 35 Transporte basolateral apical

40 Generalmente cada compuesto se ensayará en 2-4 pocillos. Los pocillos basolaterales y los apicales contendrán 1,5 ml y 0,4 ml de TB, respectivamente, y la concentración convencional de las sustancias ensayadas es 10  $\mu$ M. Además todas las soluciones de ensayo y tampones contendrán DMSO 1 %. Antes del experimento las placas de transporte se revisten previamente con medio de cultivo que contiene suero 10 % durante 30 minutos para evitar unión no específica al material plástico.

Después de 21 a 28 días en cultivo en soportes de filtro las células están listas para experimentos de permeabilidad. El medio de cultivo de los pocillos apicales se retira y los insertos se transfieren a una fila de lavado (Nº 1) en una nueva placa sin insertos (placa de transporte).

45 La placa de transporte comprende 3 filas de 4 pocillos cada una. La fila 1 se indica "lavado", y la fila 3 es la "fila experimental". La placa de transporte se ha preparado previamente con 1,5 ml de TB (pH 7,4) en la fila de lavado Nº 1 y con 1,55 ml de TB (pH 7,4), que incluye la sustancia de ensayo, en la fila experimental Nº 3 (lado donador).

50 Se añaden 0,5 ml de tampón de transporte (HBSS, MES 25 mM, pH 6,5) a los insertos en la fila Nº 1 y las monocapas celulares se equilibran en el sistema de tampón de transporte durante 30 minutos a 37 °C en un agitador polymix. Después de equilibrarse con el sistema de tampón se mide el valor de TEER en cada pocillo por un instrumento de palillos EVOM.

El tampón de transporte (TB, pH 6,5) se retira del lado apical y el inserto se transfiere a la fila 3 y se añaden 400  $\mu$ l de TB fresco, pH 6,5, a los insertos. Después de 30 minutos se retiran 250  $\mu$ l del pocillo apical (receptor) y se

5 reemplazan con tampón de transporte fresco. A continuación se retirarán 250 µl de muestras y se reemplazarán por tampón de transporte fresco cada 30 minutos hasta el final del experimento a 120 minutos y finalmente se mide un valor posterior de TEER al final del experimento. Se tomarán muestras de 25 µl del compartimento basolateral (donador) después de aproximadamente 2 minutos y al final del experimento. Estas muestras representan muestras donadoras del comienzo y el final del experimento.

Para todas las muestras recogidas se añadirá acetonitrilo a una concentración final de 50 % en las muestras. Las muestras recogidas se almacenarán a -20 °C hasta su análisis por HPLC o EM-CL.

Cálculo

Determinación de la fracción acumulativa absorbida, FA<sub>cum</sub>, frente al tiempo. FA<sub>cum</sub> se calcula de:

10 
$$FA_{cum} = \sum \frac{C_{RI}}{C_{DI}}$$

En la que C<sub>Ri</sub> es la concentración del receptor al final del intervalo i y C<sub>Di</sub> es la concentración del donador al comienzo del intervalo i. Debería obtenerse una relación lineal.

La determinación de los coeficientes de permeabilidad (P<sub>ap</sub>, cm/s) se calcula de:

$$P_{app} = \frac{(k \cdot V_R)}{(A \cdot 60)}$$

15 en la que k es la velocidad de transporte (min<sup>-1</sup>) definida como la pendiente obtenida por regresión lineal de fracción acumulativa absorbida (FA<sub>cum</sub>) en función del tiempo (min), V<sub>R</sub> es el volumen en la cámara receptora (ml) y A es el área del filtro (cm<sup>2</sup>).

Compuestos de referencia

Categoría de absorción en el hombre	Marcadores	% de absorción en el hombre
TRANSPORTE PASIVO		
Bajo (0-20 %)	Manitol	16
	Metotrexato	20
Moderado (21-75 %)	Aciclovir	30
Alto (76-100 %)	Propranolol	90
	Cafeína	100
TRANSPORTE ACTIVO		
Transportador de aminoácidos	L-Fenilalanina	100
SALIDA ACTIVA		
PGP-MDR1 I	Digoxina	30

20 Ejemplo Biológico 2

Actividad contra VIH resistente relacionado con rescate de cebador de TAM en el ensayo de VIH PhenoSense

25 La susceptibilidad de los compuestos de la invención, medida como el metabolito 2',3'-dideoxi, 3'-C-hidroximetil-β-D-eritropentofuranosilcitosina de plasma en aislados de VIH-1 de muestras de pacientes que portan genotipos resistentes de mutantes de rescate de cebador de TAM típicos se determina por el ensayo de VIH PhenoSense HIV disponible en el mercado (descrito en Petropoulos, CJ y col., (2000) Antimicrob. Agents Chemother. 44: 920-928 y realizado por ViroLogics, Inc). El ensayo se realiza amplificando el segmento de proteasa (PR)-RT del gen pol de VIH de plasma del paciente e insertando los productos de amplificación en un vector de VIH-1 modificado derivado de un clon molecular de NL4-3.

Se preparan reservas virales co-transfectando cultivos de células 293 con vector de ADN viral recombinante y un vector de expresión que produce las proteínas de la envoltura del virus de leucemia murina antrópica. Se recogen partículas de virus seudotipadas de los cultivos celulares transfectados y se usan para infectar cultivos de células 293 frescos. El ADN viral recombinante contiene un casete de gen de luciferasa dentro de la región del gen *env* de VIH y la producción de luciferasa en las células diana depende de la compleción de un ciclo de replicación viral. La susceptibilidad farmacológica se mide añadiendo concentraciones seriadas del compuesto de la invención y los compuestos de referencia a las células. Los fármacos que inhiben la replicación viral reducen la señal de luciferasa de una manera dependiente de dosis, que proporciona una medida cuantitativa de la susceptibilidad farmacológica.

Ejemplo 2a.

La Tabla 1 resume un grupo principal de mutantes TAM relacionados con rescate de cebador usados en el experimento son resistentes a VIH y portan el genotipo de TAM característico que surge típicamente durante terapia antirretroviral que implica AZT.

Tabla 1. Genotipo característico en aislados de pacientes de TAM relacionadas con rescate de cebador 20 y 21

Número de aislado	Mutaciones TAM relacionadas con rescate de cebador características
20	M41L, D67N, K70R, V118I, L210W, R211K, T215F, K219Q y L228H
21	M41L, D67N, K70S, V118I, L210W, R211K, T215Y, K219N y L228H

Los resultados se representan en la Figura 2. Se usa virus VIH de tipo silvestre como la referencia. Aquí, la inhibición de las cepas 20 y 21 de aislado de pacientes se expresa como el cambio en veces de la reducción de susceptibilidad al fármaco del tratamiento en comparación con ciclos paralelos de la referencia. Se ensayaron los siguientes fármacos antivirales: AZT, 3TC, TNF, ABC, d4T, FTC y el compuesto de la invención, como el metabolito de plasma 2',3'-dideoxi, 3'-C-hidroximetil-β-D-eritropentofuranosilcitosina. Resulta claramente evidente que el compuesto de la invención conservó actividad contra las cepas que portan TAM. Los resultados muestran una reducción solamente de 1,0 veces de la susceptibilidad para la cepa de aislado 20 y menos de una reducción 1,0 veces de la susceptibilidad para la cepa de aislado 21. Esto significa que los compuestos de la invención conservaron actividad contra la RT de VIH mutante relacionada con rescate de cebador del paciente a un nivel de potencia similar a su potencia contra RT de VIH de tipo silvestre. Por el contrario, otros fármacos, notablemente AZT (reducción de 451 veces de susceptibilidad), pero también 3TC, TNF, ABC, d4T y FTC, perdieron potencia contra los virus de estos pacientes en comparación con el tipo silvestre. En otras palabras, el virus de estos pacientes mostró resistencia, que es grandes reducciones de la susceptibilidad, a estos fármacos como se muestra en la Figura 2.

Es importante observar que los dos aislados de paciente albergan diferentes transiciones de aminoácidos en el codón 215; T a F en el aislado 20 y T a Y en el aislado 21. Esto es una característica representativa de mutantes de resistencia TAM relacionados con rescate de cebador.

Ejemplo 2b

La Tabla 2 describe un VIH mutante relacionado con rescate de cebador con el fondo genético M184V (un mutante diferenciador), que se selecciona típicamente por la terapia retroviral muy habitualmente empleada AZT+3TC (Combivir).

Tabla 2. Cambios genotípicos en aislado de paciente relacionado con rescate de cebador de TAM 19

Número de aislado	Mutaciones TAM relacionadas con rescate de cebador características
19	M41L, D67N, K70R, V118I, M184V, L210W, T215F, K219E y L228H

Como se muestra en la Figura 3, los compuestos de la invención, según se mide por el metabolito de plasma 2',3'-dideoxi, 3'-C-hidroximetil-β-D-eritropentofuranosilcitosina una vez más conservaron actividad frente a virus resistente, mostrando solamente una diferencia de 1,78 veces en la susceptibilidad en comparación con VIH de tipo silvestre. Tanto 3TC como AZT perdieron actividad y mostraron potencia reducida (es decir una reducción pronunciada de susceptibilidad viral) al virus de resistencia (Figura 3).

Ejemplo 2c

La presentación continua a pacientes de agentes antirretrovirales da como resultado la aparición de MDR. Una mutación T69S con una inserción de 6 pb entre los aminoácidos 68 y 70 en la región de dedo de RT se ve con frecuencia en combinación con diversas formas de TAM y contribuye a una actividad de rescate de cebador potenciada. Se selecciona un grupo de MDR (con diferentes formas de inserciones de aminoácidos) en combinación

con TAM, como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Cambios fenotípicos en aislados de paciente 31, 32 y 35 relacionados con rescate de cebador

Numero de aislado	Mutaciones TAM relacionadas con rescate de cebador características
31	T69S + inserción de doble aminoácido SG en el fondo genético de TAM A62V, D67E y R211K
32	T69S + inserción de doble aminoácido VG en el fondo genético de TAM A62V, D67G, V75I y T215I
35	T69S + inserción de doble aminoácido VA en el fondo genético de TAM A62V,R211 K, T215Y y L228H

5 Como se muestra en la Figura 4, el compuesto de la invención inhibió estos aislados de pacientes, proporcionando el menor cambio en susceptibilidad farmacológica en comparación con seis antivirales de referencia usado actualmente en terapia antirretroviral convencional.

10 Nótese que se observó una reducción pronunciada (500 a 1.000 veces) en la susceptibilidad a AZT para aislados de pacientes 32 y 35 mientras que el compuesto de la invención mostró cambios de 2,79 y 4,29 veces respectivamente. Esto es coherente con que el compuesto de la invención presente un mecanismo diferente de inhibición en comparación con los terminadores de cadena de ADN obligatorios representados por NRTI convencionales.

Ejemplo 2d

15 El aislado 4 representa un mutante diferenciador adicional que porta el genotipo K65R + M184V en un fondo de TAM no esencial que consiste en mutaciones en R211S y K219E. Este aislado provoca una resistencia cruzada típica a abacavir, 3TC y el nucleósido recién aprobado FTC, pero conserva su susceptibilidad a análogos de timidina tales como AZT y d4T. Este aislado no porta mutaciones de rescate de cebador típicas, pero el compuesto de la invención aún inhibe este fenotipo viral como se indica por un valor de FC de 3,88. Este valor es comparable a los análogos de timidina, AZT (FC = 1,11) y d4T (FC = 0,71), mientras que se halló resistencia significativa para 3TC (FC>200), FTC (FC>40) y en cierto grado a ABC (FT>9,0). Este dato experimental demuestra que el compuesto de la invención no solamente porta propiedades únicas contra mutantes de “rescates de cebador” sino que también es capaz de inhibir mutantes de VIH de la familia diferenciadora. Esto, por lo tanto, contrasta con el mecanismo inhibitor empleado por 3TC y FTC así como el mecanismo probable de compuestos de 4'-C-etinilo en los que M184V junto con un cambio de aminoácido adicional en el codón T165R en la región catalítica contribuye a resistencia cruzada a nucleósido 4-C-etinilo (Kodama 2002).

Ejemplo biológico 3

25 Actividad de 2',3'-dideoxi-3-C-hidroximetil-citosina frente a VIH resistente relacionado con rescate de cebador en PBMC.

30 El rendimiento antiviral del compuesto de la invención contra aislados de VIH resistentes relacionados con rescate de cebador de TAM adicionales se ensayó en un cultivo de PBMC. Se generaron aislados de VIH-1 y se expandieron a alta titulación por cultivación conjunta de PBMC de paciente infectado con PBMC de donante estimuladas con PHA (Virology Manual for ACTG HIV Laboratories). Los sobrenadantes sin células se recogieron, secuenciaron y almacenaron en alícuotas a -70 °C para ensayos de susceptibilidad farmacológica.

35 Se realizaron ensayos de susceptibilidad farmacológica *in vitro* usando un procedimiento de consenso ACTG/DOD modificado (Virology Manual for ACTG HIV Laboratories). Las PBMC se pre-infectaron con reservas virales durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada a CO<sub>2</sub> 5 % después de 4 horas de incubación. Las células infectadas se lavaron dos veces en medio y se pipetearon en una placa de microtitulación con ocho diluciones farmacológicas seriadas. Cada pocillo contenía 100.000 PBMC pre-infectadas y todas las diluciones farmacológicas se prepararon con medio de cultivo celular. Las diluciones farmacológicas se seleccionaron para abarcar la concentración inhibitora al 50 % (CI<sub>50</sub>) para cada fármaco sencillo. Los pocillos de control que contenían células y virus se co-incubaron en cada placa. Después de una incubación de 7 días a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> 5 %, se determinó el crecimiento viral usando un ensayo de antígeno p24 en sobrenadantes (Abbott Laboratories, Chicago, Estados Unidos). El porcentaje de inhibición del crecimiento viral en comparación con el pocillo de control, que no contenía fármaco, se calculó y expreso como cambios en veces (reducciones de susceptibilidad de compuesto) en comparación con el pocillo de control. El compuesto de referencia AZT se ejecutó en paralelo con el compuesto de la invención.

45 Se seleccionó un grupo de virus mutante relacionado con rescate de cebador representativo que alberga la característica esencial de mutaciones de RT resistentes TAM relacionadas con rescate de cebador. Se usaron cepas con mutaciones en la posición M41 L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E en diversas combinaciones con o sin mutante diferenciador M184V como se indica en la Tabla 4.

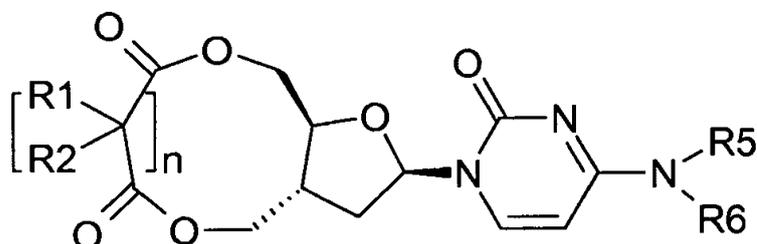
Tabla 4. Genotipo relacionado con rescate de cebador TAM en 9 aislados de paciente

Número de aislado	Mutaciones TAM relacionadas con rescate de cebador características
1295	M41L, D67N, K70R, V75M, V118I, M184V, L210W, R211K, T215Y y K219E
7086	D67N, T69N, K70R, V118I, L210W, T215V y K219Q
J12840	M41L, D67N, V118I, M184V, L210W, R211N, T215Y
J10308	M41L, D67N, M184V, L210W, R211S, T215Y
7141	M41L, D67N, M184V, H208Y, R211K, T215Y, K219N
J14007	D67N, T69N, K70R, M184V, H208Y, R211K, T215F, K219Q, L228H
VA206	D67N, M184V, L210W, R211K, T215Y
VA286	M41L, E44D, D67N, L74V, V118I, M184I, E203K, H208Y, L210W, R211K, T215Y

5 La mayoría de estos mutantes de rescate de cebador seleccionados conferirían una resistencia pronunciada a susceptibilidad a AZT, disminuyendo un par de cientos de veces en valor FC. La excepción fue el aislado 7086 (FC = 3,0), que porta la mutación de aminoácido T215V. Se presenta un informe completo de los valores de FC en la Figura 5. Aquí, 2',3'-dideoxi-3'-C-hidroximetilcitosina inhibió los ocho aislados, siendo el valor FC más alto solamente 2,7.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I



en la que:

- 5  $R^1$  es, independientemente, H,  $-OR^3$ ,  $-NHR^4$ ; alquilo  $C_1-C_4$ ;  
o, cuando n es 2, los  $R^1$  adyacentes definen juntos un enlace olefínico;  
 $R^2$  es H;  
o cuando el  $R^1$  geminal es alquilo  $C_1-C_4$ , que  $R^2$  puede ser también alquilo  $C_1-C_4$ ;  
o cuando el  $R^1$  geminal es  $-OR^3$ , que  $R^2$  puede ser también  $-C(=O)OH$  o un éster farmacéuticamente aceptable  
10 del mismo;  
 $R^3$  es independientemente H o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 $R^4$  es independientemente H o una amida farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 $R^5$  es H;  
 $R^6$  es H;  
15 n es 1, 2 ó 3;  
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

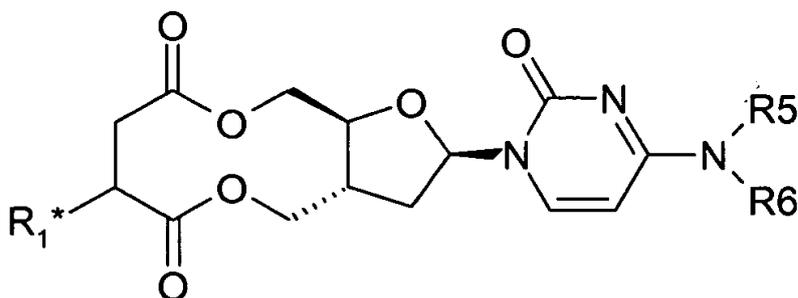
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 1.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que  $R^1$  es H, OH o un éster farmacéuticamente del mismo.

20 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 2.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que un primer  $R^1$  es H; y el segundo  $R^1$  es  $-OH$  o  $NH_2$  o un éster o amida farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, con la fórmula:



25 en la que  $R^5$  y  $R^6$  son como se han definido en la reivindicación 1, y  $R_1^*$  es dicho segundo  $R^1$ .

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, denotado 2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,10-trioxaciclo-pentaciclodecen-6,9-diona; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 3.

30 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, denotado 2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-octahidro-1,5,11-trioxa-ciclo-pentacicloundecen-6,10-diona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 junto con vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como un medicamento.
12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 11, para uso en el tratamiento o profilaxis de VIH.
13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el VIH es VIH multirresistente.
- 5 14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la transcriptasa inversa del VIH multirresistente lleva al menos una mutación que permite que un nucleósido- o nucleótido-fosfato de terminación de cadena obligada se escinda de la hebra de ADN naciente por escisión mediada por ATP o pirofosfato.
15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la transcriptasa inversa lleva al menos uno de los siguientes patrones genotípicos:
- 10 (a) M41,  $\pm$ D67, L210 y T215;  
(b) D67, K70 y K219;  
(c) T69S-XX; o  
(d)  $\blacktriangle$ 67 (delección en 67).
16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 en el que la transcriptasa inversa lleva, al menos, 3 mutaciones.
- 15 17. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección por VIH.
18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el VIH es VIH multirresistente.
19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento o prevención de infección por VIH.
- 20 20. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el VIH es VIH multirresistente

Figura 1

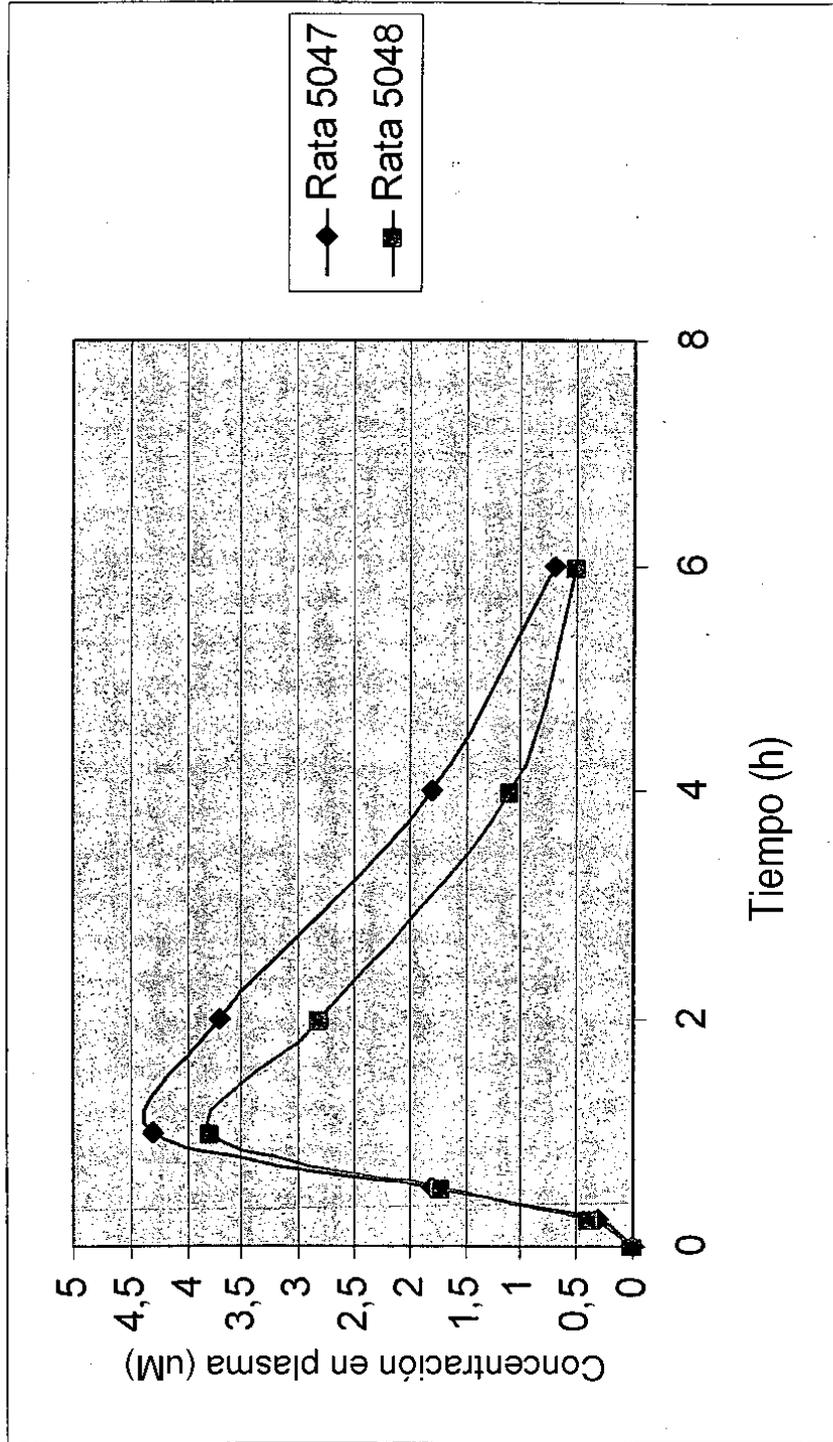


Figura 2

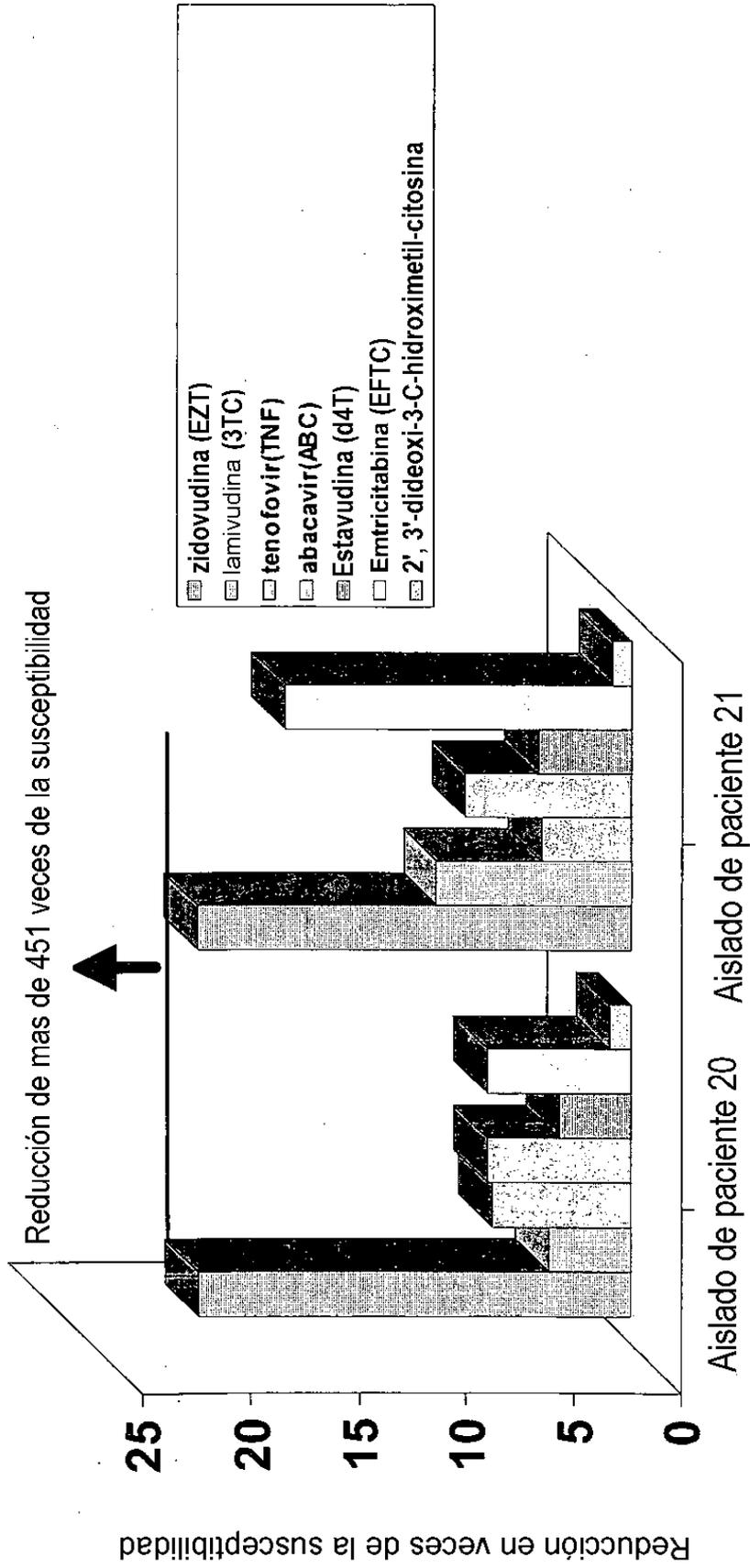


Figura 3

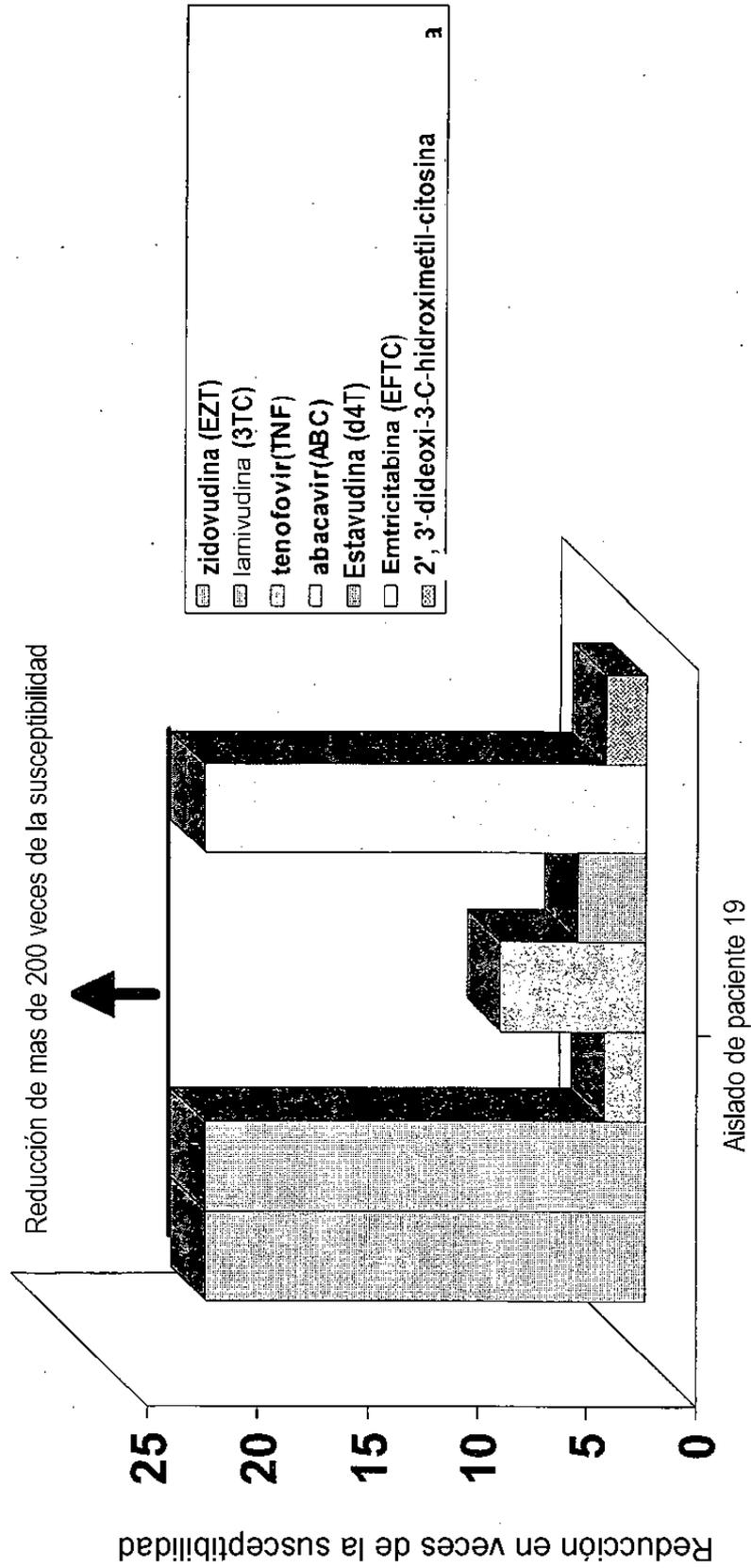


Figura 4

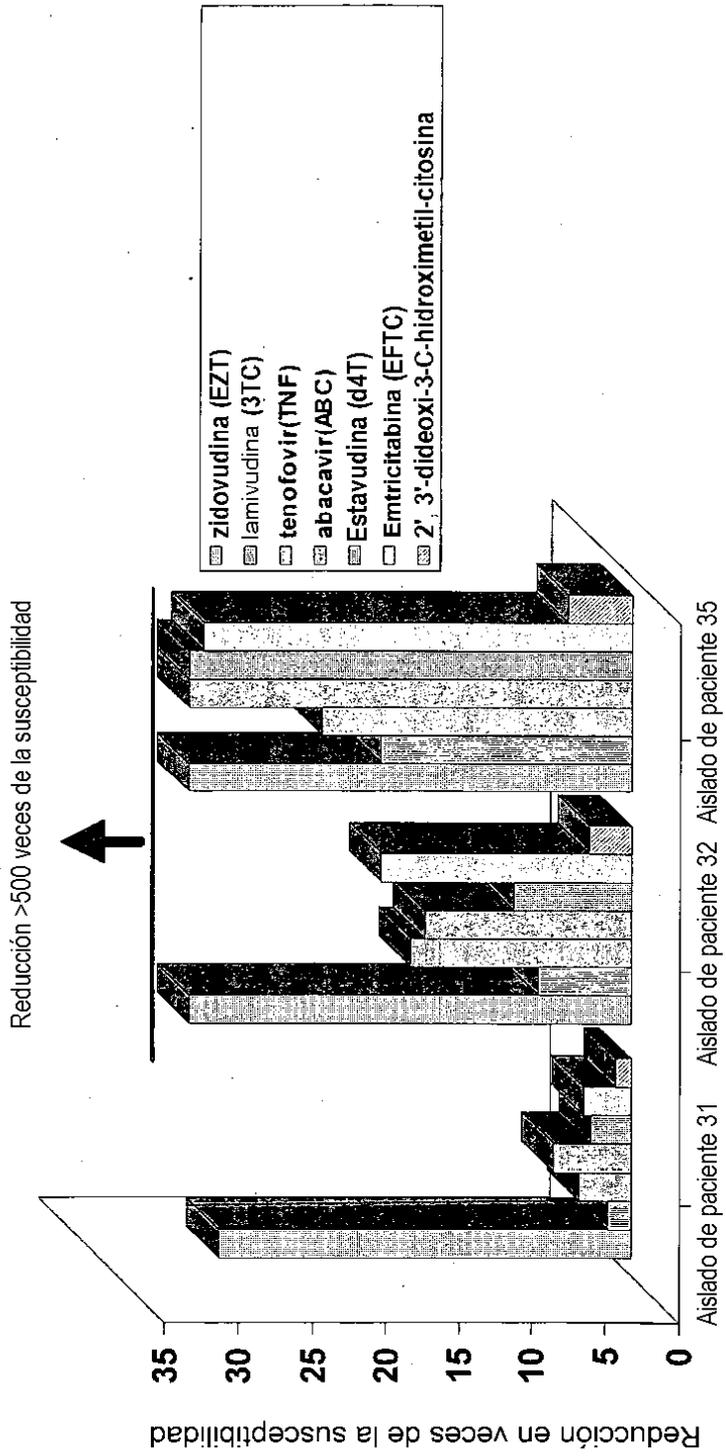


Figura 5

