(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 392 948**

(51) Int. CI.:

C07H 19/073 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **10196341 .1**
(96) Fecha de presentación: **04.10.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2361922**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2011**

(54) Título: **Intermedio para inhibidores nucleosídicos de VHC**

(30) Prioridad:

10.10.2006 US 850926 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

(73) Titular/es:

JANSSEN PRODUCTS, L.P. (50.0%)
800/850 Ridgeway Drive
Horsham PA 19044 , US y
MEDIVIR AB (50.0%)

(72) Inventor/es:

KALAYANOV, GENADIY y
WINQVIST, ANNA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Intermedio para inhibidores nucleosídicos de VHC

La presente invención proporciona compuestos nucleosídicos y ciertos derivados de los mismos que son inhibidores de la ARN polimerasa vírica dependiente de ARN. Estos compuestos son inhibidores de la replicación vírica de ARN dependiente de ARN, y son útiles para el tratamiento de la infección vírica de ARN dependiente de ARN. Son particularmente útiles como inhibidores de la NS5B polimerasa del virus de la hepatitis C (VHC), como inhibidores de la replicación del VHC, y para el tratamiento de la infección por hepatitis C.

La invención se refiere a inhibidores nucleosídicos de la replicación de ARN de replicones del VHC. En particular, la invención se refiere al uso de compuestos nucleosídicos de pirimidina como inhibidores de la replicación de ARN subgenómico del VHC, y a composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos.

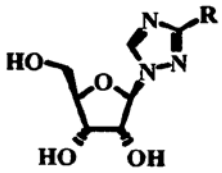
El virus de la hepatitis C es la causa principal de enfermedad hepática crónica en todo el mundo. (Boyer, N. y col. J. Hepatol. 2000 32:98-112). Los pacientes infectados con VHC tienen riesgo de desarrollar cirrosis hepática y el posterior carcinoma hepatocelular, y por lo tanto el VHC es la indicación principal para trasplante hepático.

El VHC se ha clasificado como un miembro de la familia de virus *Flaviviridae* que incluye los géneros flavivirus, pestivirus y hepacivirus, que incluyen los virus de la hepatitis C (Rice, C. M., Flaviviridae: The viruses and their replication, en: Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa., Capítulo 30, 931-959, 1996). El VHC es un virus con cubierta que contiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 9,4 kb. El genoma vírico consiste en una región en 5' no traducida (UTR), un marco de lectura abierto largo que codifica un precursor poliproteico de aproximadamente 3011 aminoácidos, y una UTR de 3' corta. La UTR de 5' es la parte más conservada del genoma del VHC, y es importante para la iniciación y control de la traducción de poliproteínas.

El análisis genético del VHC ha identificado seis genotipos principales que divergen en alrededor de 30% de la secuencia de ADN. Se han distinguido más de 30 subtipos. En los Estados Unidos, aproximadamente 70% de los individuos infectados tienen infección de Tipo 1a y 1b. El Tipo 1b es el subtipo más prevalente en Asia. (X. Forns y J. Bukh, Clinics in Liver Disease 1999 3:693-716; J. Bukh y col., Semin. Liv. Dis. 1995 15:41-63). Desafortunadamente, las infecciones de Tipo 1 son más resistentes a la terapia que los genotipos de tipo 2 o 3 (N. N. Zein, Clin. Microbiol. Rev., 2000 13:223-235).

Las proteínas estructurales víricas incluyen una proteína central de la nucleocápsida (C) y dos glucoproteínas de la cubierta, E1 y E2. El VHC también codifica dos proteasas, una metaloproteinasa dependiente de cinc, codificada por la región NS2-NS3, y una serina proteasa codificada en la región NS3. Estas proteasas son necesarias para la escisión de regiones específicas de la poliproteína precursora en péptidos maduros. La mitad carboxílica de la proteína 5 no estructural, NS5B, contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN. La función de las demás proteínas no estructurales, NS4A y NS4B, y la de NS5A (la mitad amino-terminal de la proteína 5 no estructural) sigue sin conocerse. Se cree que la mayoría de las proteínas no estructurales codificadas por el genoma de ARN del VHC están implicadas en la replicación del ARN.

Actualmente hay un número limitado de terapias aprobadas disponibles para el tratamiento de la infección por VHC. Se han revisado enfoques terapéuticos nuevos y existentes para tratar VHC y la inhibición de la polimerasa NS5B de VHC: R. G. Gish, Sem. Liver. Dis., 1999 19:5; Di Besceglie, A. M. y Bacon, B. R., Scientific American, October: 1999 80-85; G. Lake-Bakaar, Current and Future Therapy for Chronic Hepatitis C Virus Liver Disease, Curr. Drug Targ. Infect Dis. 2003 3(3):247-253; P. Hoffmann y col., Recent patents on experimental therapy for hepatitis C virus infection (1999-2002), Exp. Opin. Ther. Patents 2003 13(11):1707-1723; M. P. Walker y col., Promising Candidates for the treatment of chronic hepatitis C, Exp. Opin. investing. Drugs 2003 12(8):1269-1280; S.-L. Tan y col., Hepatitis C Therapeutics: Current Status and Emerging Strategies, Nature Rev. Drug Discov. 2002 1:867-881.



1a: R = $C(=O)NH_2$
1b: R = $C(=NH^+)NH_2$

La ribavirina (1a; amida del ácido 1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxíiico; Virazol) es un análogo de nucleósido antiviral de amplio espectro, sintético, no inductor de interferón. La ribavirina tiene actividad *in vitro* contra varios virus de ADN y ARN, incluyendo *Flaviviridae* (Gary L. Davis, Gastroenterology 2000 118:S104-S114). En monoterapia, la ribavirina reduce los niveles de aminotransferasa en

suero a los normales en el 40% de los pacientes, pero no reduce los niveles en suero de ARN de VHC. La ribavirina también presenta una toxicidad significativa, y se sabe que induce anemia. La viramidina 1b es un profármaco que se convierte en 1a en hepatocitos.

Los interferones (IFN) han estado disponibles para el tratamiento de hepatitis crónica desde hace casi una década. Los IFN son glicoproteínas producidas por células inmunes en respuesta a una infección viral. Se reconocen dos tipos distintos de interferones: el Tipo 1 incluye varios interferones α y un interferón β, el tipo 2 incluye interferón γ. Los interferones del Tipo 1 se producen principalmente por células infectadas, y protegen a las células vecinas de la infección *de novo*. Los IFN inhiben la replicación viral de muchos virus, incluyendo VHC, y cuando se usa como único tratamiento para la infección por hepatitis C, el IFN suprime el ARN de VHC en suero hasta niveles indetectables. Además, el IFN normaliza los niveles en suero de aminotransferasa. Desafortunadamente, los efectos del IFN son temporales. El cese de la terapia da como resultado una tasa de recaída del 70%, y únicamente un 10-15% presenta una respuesta virológica sostenida con niveles normales en suero de alanina transferasa (L.-B. Davis, *más arriba*).

Una limitación de la terapia temprana con IFN era la rápida eliminación de la proteína de la sangre. La derivatización química del IFN con polietilenglicol (PEG) ha dado como resultado proteínas con propiedades farmacocinéticas sustancialmente mejoradas. PEGASYS® es un conjugado de interferón α-2a y un mono-metoxi PEG ramificado de 40 kD, y PEG-INTRON® es un conjugado de interferón α-2b y un mono-metoxi PEG de 12 kD. (B. A. Luxon y col., Clin. Therap. 2002 24(9):13631383; A. Kozlowski y J. M. Harris, J. Control. Release, 2001 72:217-224).

La terapia de combinación de VHC con ribavirina e interferón-α actualmente representa la terapia óptima. La combinación de ribavirina y PEG-IFN (infra) da como resultado una respuesta viral sostenida en el 54-56% de los pacientes. La TSP (tasa de supervivencia) se aproxima al 80% para el VHC de tipo 2 y 3. (Walker, *más arriba*) Desafortunadamente, la combinación también produce efectos secundarios que representan desafíos clínicos. La depresión, los síntomas de tipo gripe y las reacciones cutáneas están asociados con IFN-α subcutáneo, y la anemia hemolítica está asociada con el tratamiento sostenido con ribavirina.

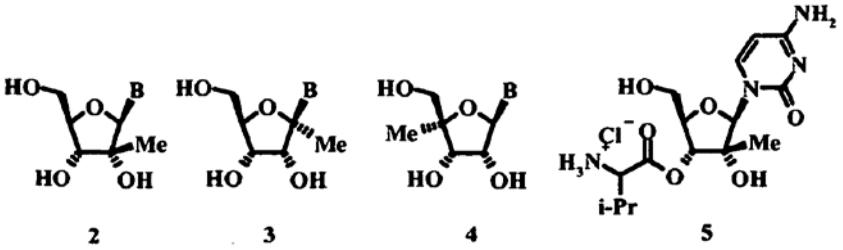
Ahora se han identificado varias dianas moleculares potenciales para el desarrollo de fármacos como productos terapéuticos anti-VHC, incluyendo, pero sin limitación, la autoproteasa NS2-NS3, la proteasa N3, la helicasa N3 y la polimerasa NS5B. La ARN polimerasa dependiente de ARN es absolutamente esencial para la replicación del genoma de ARN, de sentido positivo, monocatenario. Esta enzima ha suscitado un interés significativo entre los químicos farmacéuticos.

Se conocen tanto inhibidores nucleosídicos como no nucleosídicos de NS5B.

Los inhibidores nucleosídicos pueden actuar como un terminador de la cadena o como un inhibidor competitivo que interfiere con la unión de nucleótidos a la polimerasa. Para funcionar como un terminador de la cadena, el análogo de nucleósido debe ser captado por la célula y convertirse *in vivo* en un trifosfato para competir por el sitio de unión del nucleótido de la polimerasa. Esta conversión en el trifosfato está mediada normalmente por cinasas celulares que imparten requisitos estructurales adicionales a un posible inhibidor nucleosídico de polimerasa. Además, esto limita la evaluación directa de nucleósidos como inhibidores de la replicación de VHC en ensayos basados en células con capacidad de fosforilación *in situ*.

En el documento WO 01 90121, publicado el 29 de noviembre de 2001, J.-P. Sommadossi y P. Lacolla describen y ejemplifican la actividad anti-polimerasa de VHC de 1'-alquil- y 2'-alquil nucleósidos de fórmulas **2** y **3**. En el documento WO 01/92282, publicado el 6 de diciembre de 2001, J.-P. Sommadossi y P. Lacolla describen y ejemplifican el tratamiento de Flavivirus y Pestivirus con 1'-alquil- y 2'-alquil nucleósidos de fórmulas **2** y **3**. En los documentos WO 03/026675 y WO 03/026589, ambos publicados el 3 de abril de 2003, G. Gosselin y col. describen 4'-alquil nucleósidos **4** y métodos para usar 4'-alquil nucleósidos para tratar Flavivirus y Pestivirus. En los documentos WO 2004003000 y WO 2004002999, ambos publicados el 8 de enero de 2004, J-P. Sommadossi y col. describen profármacos de β-D y β-L nucleósidos 1'-, 2'-, 3'- y 4'-sustituidos. En el documento WO 04/002422, publicado el 8 de enero de 2004, J-P. Sommadossi y col. describen el éster de 3'-O-L-valina de 2'-C-metil-ribofuranosil citidina y su uso en el tratamiento del VHC.

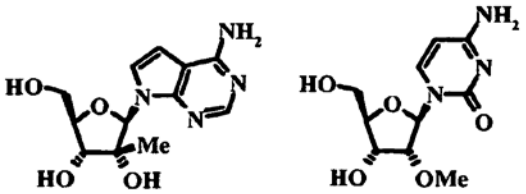
Idenix ha presentado ensayos clínicos para un compuesto relacionado, NM283, que es el éster de valina 5 del análogo de citidina 2 (B = citosina). Además, Idenix Pharmaceuticals, Ltd. también describe en el documento WO 04/046331 mutaciones de Flaviviridae causadas por β-D o β-L nucleósidos 2'-ramificados biológicamente activos, o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco de los mismos.



2 3 4 5

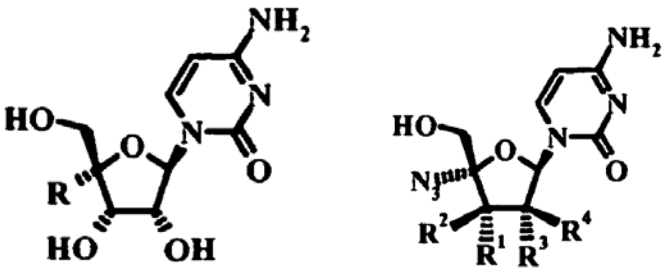
B= adenina, timidina, uracilo, citidina, guanina e hipoxantina

En el documento WO 02/057425, publicado el 25 de julio de 2002, S. S. Carroll y col. describen inhibidores nucleosídicos de ARN polimerasa dependiente de ARN en los que la subunidad de carbohidrato está modificada químicamente. En el documento WO 02/05787, publicado el 25 de julio de 2002, S. S. Carroll y col. describen derivados de 2α-metil y 2β-metilribosa relacionados en los que la base es un radical de 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina opcionalmente sustituido 6. La misma solicitud desvela un ejemplo de un 3β-metil nucleósido. S. S. Carroll y col. (J. Biol. Chem. 2003 278(14):11979-11984) describen la inhibición de la polimerasa de VHC por 2'-O-metilcitidina (6a). En la publicación U.S. nº 2004/0259934, publicada el 23 de diciembre de 2004, D. B. Olsen y col. describen procedimientos para inhibir la replicación viral de *Coronaviridae* y para tratar la infección viral por *Coronaviridae* con compuestos nucleosídicos.



6 6a

En el documento WO 02/100415, publicado el 19 de diciembre de 2002 (documento US 2003/0236216 A1), R. R. Devos y col. describen compuestos nucleosídicos 4'-sustituidos que presentan actividad contra el VHC. Los cuatro compuestos identificados explícitamente incluyen el compuesto 4'-azido **7a**, el compuesto 4'-etinilo **7b**, el compuesto 4'-etoxi **7c**, y el compuesto 4'-acetilo **7d**. Las modificaciones en el resto de ribosa ejemplificadas incluyen el derivado de 2'-desoxi **8a**, el derivado de 3'-desoxi 8b, el derivado de 3'-metoxi **8e**, el derivado de 3'-fluoro **8c** y el derivado de 2',2'-difluoro **8d**. En el documento WO 2004/046159, publicado el 3 de junio de 2004 (documento US 2004121980), J. A. Martin y col. describen profármacos de **7a** útiles para tratar enfermedades mediadas por VHC. Ambas solicitudes US se incorporan aquí como referencia en su totalidad.



7a: R = N_3

7b: R = etinilo

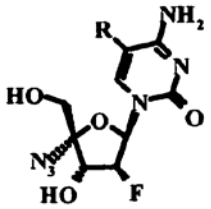
7c: R = OEt

7d: R = C(=O)Me

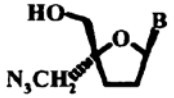
8a: $R^1 = OH, R^2 = R^3 = R^4 = H$
8b: $R^3 = OH, R^1 = R^2 = R^4 = H$
8c: $R^3 = OH, R^2 = F, R^1 = R^4 = H$
8d: $R^1 = R^2 = H, R^3 = R^4 = F$
8e: $R^1 = OMe, R^3 = OH, R^2 = R^4 = H$

La Solicitud de Estados Unidos con nº de Serie 10/167.106, presentada el 11 de junio de 2002 titulada "4'-Substituted Nucleoside Derivatives as Inhibitors of HCV RNA Replication ("Derivados Nudeosídicos 4'-Sustituidos como Inhibidores de la Replicación de ARN de VHC") y la Solicitud U.S. nº 10/717.260, presentada el 19 de noviembre de 2003, describen compuestos relacionados con la presente invención. Ambas solicitudes se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

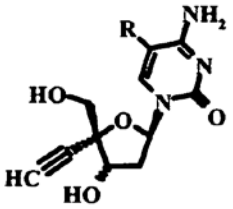
Y.-H. Yun y col. (Arch. Pharm. Res. 1985 18(5):364-35) describen la síntesis y actividad antiviral de 4'-azido-2'-desoxi-2'-fluoro-arabinofuranosil nucleósidos (**9**: R = H, Me y Cl).



9



10



11

B = adenina, uracilo, timina

G. S. Jeon y V. Nair (Tetrahedron 1996 52(39):12643-50) describen la síntesis de 4'-azidometil-2',3'-desoxirribonucleósidos **10** (B = adenina, timina y uracilo) como inhibidores de la transcriptasa inversa de VIH.

Se han presentado varios estudios computacionales de 4'-azidonucleósidos: D, Galisteo y col., J. Mol. Struct. 1996 384(1):25-33; J. Pepe y col., Eur. J. Med. Chem. 1996 32(10):775-786; E. Estrada y col., In silico studies toward the discovery of New Anti HIV Nucleoside, J. Chem. Info. Comp. Sci. 2002 42(5):1194-1203.

I. Sugimoto y col. describió la síntesis y el bioensayo en VIH y H. simplex de 4'-etinil-2'-desoxicitidina (**11**) y otros sustituyentes de dos carbonos en la posición 4' (Nucleosides and Nucleotides. 183. Synthesis of 4' (β-Branched Thymidines as a New Type of Antiviral Agent, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999 9:385-88). T. Wada y col. (Nucleosides & Nucleotides 1996 15(1-3):287-304) describen la síntesis y actividad anti-VIH de 4'-C-metil nucleósidos.

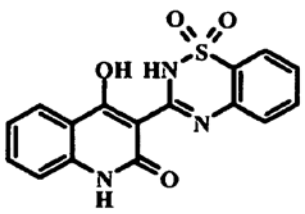
En el documento WO 01/32153, publicado el 10 de mayo de 2001, R. Storer describe métodos para tratar o prevenir la infección por virus *Flaviviridae* mediante la administración de análogos de nucleósidos de dioxolano.

En el documento WO 02/18404, publicado el 7 de marzo de 2002, R. Devos y col. describen derivados de nucleósidos de purina y pirimidina nuevos y conocidos, y su uso como inhibidores de la replicación de VHC subgenómico, y composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados de nucleósidos. Los compuestos descritos consisten en nucleósidos con bases de purina y pirimidina sustituidas.

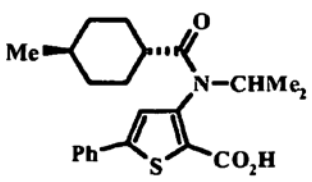
La Publicación EPA nº 0 352 248 describe un amplio género de nucleósidos de L-ribofuranosil purina para el tratamiento de VIH, herpes y hepatitis. Se encuentra una memoria descriptiva similar en el documento WO 88/09001, presentado por Aktiebolaget Astra.

K. Kitano y col. (Tetrahedron 1997 53(39):13315-13322) describen la síntesis de 4'-fluorometil 2-desoxi-D-*eritro*-, *ribo*- y *arabino*-pentofuranosil citosinas y la actividad antineoplásica.

Los inhibidores alostéricos no nudeosídicos de la transcriptasa inversa de VIH han resultado ser productos terapéuticos eficaces solos y en combinación con inhibidores nudeosídicos y con inhibidores de proteasa. Se han descrito varias clases de inhibidores de NS5B de VHC no nudeosídicos, y actualmente están en diversas fases de desarrollo, incluyendo: bencimidazoles (H. Hashimoto y col., documento WO 01/47833, H. Hashimoto y col., documento WO 03/000254, P. L. Beaulieu y col., documento WO 03/020240 A2; P. L. Beaulieu y col., documento US 6.448.281 B1; P. L. Beaulieu y col., documento WO 03/007945 A1); Índoles, (P. L. Beaulieu y col., documento WO 03/0010141 A2); benzotiadiazinas, por ejemplo, **1**, (D. Dhanak y col. documento WO 01/85172 A1, presentado con fecha 10/5/2001; D. Chai y col., documento WO 2002098424, presentado con fecha 7/6/2002, D. Dhanak y col., documento WO 03/037262 A2, presentado con fecha 28/10/2002; K. J. Duffy y col., documento WO 03/099801 A1, presentado con fecha 23/5/2003, M. G. Darcy y col., documento WO 2003059356, presentado con fecha 28/10/2002; D. Chai y col., documento WO 2004052312, presentado con fecha 24/6/2004, D. Chai y col., documento WO 2004052313, presentado 13/12/2003; D. M. Fitch y col., documento WO 2004058150, presentado con fecha 11/12/2003; D. K. Hutchinson y col., documento WO 2005019191, presentado con fecha 19/8/2004; J. K. Pratt y col., documento WO 2004/041818 A1, presentado con fecha 31/10/2003);



1



2

tiofenos, por ejemplo, **2**, (C. K. Chan y col., documento WO 02/100851 A2); benzotiofenos (D. C. Young y T. R. Bailey, documento WO 00/18231); β-cetopiruvatos (S. Attamura y col., documento US 6.492.423 B1, A. Attamura y col., documento WO 00/06529); pirimidinas (C. Gardelli y col., documento WO 02/06246 A1); pirimidinadionas (T. R. Bailey y D. C. Young, documento WO 00/13708); triazinas (K.-H. Chung y col., documento WO 02/079187 A1); derivados de rodamina (T. R. Bailey y D. C. Young, documento WO 00/10573, J. C. Jean y col., documento WO 01/77091 A2); 2,4-dioxopiranos (R. A. Love y col., documento EP 256628 A2); derivados de fenilalanina (M. Wang y col., J. Biol. Chem. 2003 278:2489-2495). Se han descrito tiazinas que inhiben la NS5B de VHC por J. F. Blake y col. en la Publicación U.S. nº 20060040927, presentada el 22 de agosto de 2005.

También se han descrito inhibidores de la proteasa de VHC necesaria para la replicación viral (F. McPhee y col., Drugs of the Future 2003 28(5):465-488; Y. S. Tsantrizos y col., Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 2003 42(12):1356-1360). Un compuesto nucleosídico de la presente invención puede usarse en combinación con estos y otros inhibidores de polimerasa y proteasa.

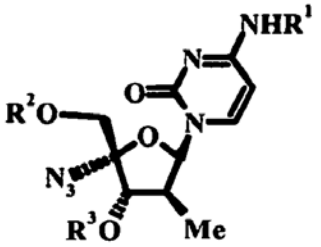
Se ha revisado el resultado de estos esfuerzos (J. Z. Chen y Z. Hong, Targeting NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase for Anti-HCV Chemotherapy, Curr. Drug Targ. Inf. Dis. 2003 3(3):207-219). Los inhibidores no nucleosídicos no están relacionados con la presente invención.

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos nucleosídicos, métodos y composiciones para el tratamiento de un hospedante infectado por el virus de la hepatitis C.

Actualmente no hay ningún tratamiento preventivo del virus de la hepatitis C (VHC), y las terapias aprobadas actualmente, que existen sólo contra VHC, son limitadas. Es esencial el diseño y desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos.

Sorprendentemente, la 2'-desoxi-2'-β-metil-4'-azido-citidina o ésteres de la misma son útiles para tratar VHC, y presentan menor toxicidad después de la administración a un hospedante. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas del compuesto y al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La terapia de combinación ha resultado útil para el tratamiento de enfermedades virales y nuevos compuestos sinérgicos con otros productos terapéuticos para VHC aprobados y de investigación, y la presente invención proporciona el tratamiento de VHC con nucleósidos de la fórmula general desvelada anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable, en combinación o alternativamente con uno o más agentes antivirales eficaces o inmunomoduladores, incluyendo opcionalmente al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.



(I)

Se describe aquí un nucleósido de acuerdo según la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el uso de tales compuestos para el tratamiento de un hospedante infectado con VHC, en la que:

R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, COR^4, $C(=O)OR^4$ y $C(=O)CHR^5NHR^6$;

R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en (a) alquilo de C_{1-18} ramificado o no ramificado, (b) haloalquilo de C_{1-18}, (c) cicloalquilo de C_{3-8}, (d) heteroalquilo de C_{1-10}, y (e) fenilo, estando dicho fenilo opcionalmente sustituido con uno a tres grupos seleccionados independientemente de alquilo de C_{1-3}, alcoxi de C_{1-3}, halógeno, ciano o nitro;

R^5 es hidrógeno, alquilo de C_{1-10}, fenilo o fenilalquilo de C_{1-3}, estando dicho fenilo opcionalmente sustituido con uno a tres grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, hidroxi, alcoxi de C_{1-3}, alquilo de C_{1-3}, ciano y nitro;

R^6 es hidrógeno o alcoxi de C_{1-6}; o

sales de adición de ácidos del mismo.

Se describe aquí el uso de acuerdo con la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en combinación con otro agente o agentes antivirales eficaces, e incluyendo opcionalmente al menos un vehículo,

excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de la infección por VHC, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de VHC en un hospedante.

Sin desear estar ligados a teoría alguna, se cree que los compuestos descritos se fosforilan en serie en células humanas por cinasas dando el 5'-O-monofosfato, 5'-O-difosfato y finalmente el 5'-O-trifosfato que es el metabolito antiviralmente activo. Se describen aquí también estas especies 5'-O fosforiladas, es decir, compuestos de la fórmula I en la que R^1 y R^3 son H y R^2 es un éster de monofosfato, difosfato o trifosfato.

La actividad antiviral de un inhibidor nucleosídico típicamente es el resultado combinado de la captación del nucleósido en las células hospedantes, la conversión del nucleósido en el trifosfato activo, la estabilidad intracelular del trifosfato, y la capacidad del trifosfato de interferir con la actividad de síntesis de ARN de la polimerasa viral. Como se presenta en los ejemplos biológicos más adelante, los compuestos descritos se fosforilan fácilmente in vivo hasta el trifosfato activo, y tienen una larga semivida de trifosfato intracelular, permitiendo de esa manera concentraciones altas y sostenidas de las especies antiviralmente activas.

También se describe aquí un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La expresión "como se han definido aquí anteriormente" se refiere a la definición más amplia para cada grupo como se proporciona en la definición de la fórmula I dada anteriormente. En otras realizaciones que se proporcionan a continuación, los sustituyentes presentes en cada realización que no se definen explícitamente conservan la definición más amplia que se proporciona en el Sumario de la descripción.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2 y R^3 son hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 y R^3 son H y R^2 es un éster de monofosfato, difosfato o trifosfato.

En aún otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que cada uno de R^1, R^2 y R^3 es independientemente hidrógeno, COR^4 o $C(=O)OR^4$, y R^4 es como se ha descrito anteriormente en el presente documento; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En todavía otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que cada uno de R^1, R^2 y R^3 es independientemente hidrógeno, COR^4 o $C(=O)OR^4$, y R^4 es alquilo de C_{1-10} sin ramificar o ramificado, tal como alquilo inferior, especialmente metilo, etilo, i-propilo o t-butilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En todavía otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 es hidrógeno; R^2 y R^3 son COR^4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En todavía otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 es hidrógeno; R^2 y R^3 son COR^4, y R^4 es alquilo de C_{1-10} sin ramificar o ramificado, tal como alquilo inferior, especialmente metilo, etilo, i-propilo o t-butilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Cuando un compuesto comprende dos restos R^4, son típicamente iguales, para mayor comodidad de síntesis.

En todavía otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 y R^3 son hidrógeno; R^2 es COR^4, $C(=O)OR^4$ o $COCH(R^5)NHR^6$; y R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En todavía otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 y R^2 son hidrógeno; R^3 es COR^4, $C(=O)OR^4$ o $COCH(R^5)NHR^6$; y R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^2 es $COCH(R^5)NHR^6$, R^5 es *iso*-propilo, *iso*-butilo o *sec*-butilo, y R^6 es hidrógeno. En una disposición preferida de esta realización, la configuración estérica del grupo R^5 es (S), es decir, R^2 es un resto de L-aminoácido alifático. R^1 en esta realización es típicamente H, mientras que R^3 es H o $COCH(R^5)NHR^6$, R^5 es *iso*-propilo, *iso*-butilo o *sec*-butilo, y R^6 es hidrógeno. Cuando un compuesto tiene dos de dichos restos $COCH(R^5)NHR^6$, son típicamente el mismo aminoácido para mayor comodidad de síntesis.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^3 es $COCH(R^5)NHR^6$, R^5 es *iso*-propilo, *iso*-butilo o *sec*-butilo, y R^6 es hidrógeno. En una disposición preferida de esta realización, la configuración estérica del grupo R^5 es (S), es decir, R^3 es un resto de L-aminoácido alifático. R^1 en esta realización es típicamente H.

En todavía otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 y R^3 son hidrógeno; R^2 es COR^4; y R^4 es como se ha definido aquí anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 y R^3 son hidrógeno; R^2 es COR^4; y R^4 es alquilo de C_{1-10} sin ramificar o ramificado, tal como alquilo inferior, especialmente metilo, etilo, i-propilo o t-butilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2 y R^3 son hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 es hidrógeno; R^2 y R^3 son cada uno COR^4, R^4 se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior de C_{1-10} sin ramificar o ramificado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1 y R^3 son hidrógeno; R^2 es COR^4 o $COCH(R^5)NHR^6$; y R^4 se selecciona del grupo que consiste en alquilo inferior de C_{1-10} sin ramificar o ramificado; R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite, una dosis entre 1 y 100 mg/kg de peso corporal del paciente por día de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende coadministrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos un modulador del sistema inmune y/o al menos un agente antiviral que inhibe la replicación del VHC.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende coadministrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos un modulador del sistema inmune seleccionado de interferón, interleucina, factor de necrosis tumoral o factor estimulante de colonias. Un experto en la técnica médica será consciente de que estas moléculas del sistema inmune pueden estar en su forma natural o pueden modificarse químicamente para conferir propiedades farmacocinéticas beneficiosas.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende coadministrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un interferón o interferón derivatizado químicamente.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende coadministrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos algún otro agente antiviral.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), que comprende coadministrar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 son como se han definido aquí anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos algún otro inhibidor de proteasa de VHC, otro inhibidor nucleosídico de polimerasa de VHC, un inhibidor no nucleosídico de polimerasa de VHC, un inhibidor de helicasa de VHC, un inhibidor de primasa de VHC o un inhibidor de la fusión de VHC.

En una realización de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, mezclada con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un comprimido obtenido por compresión, de 500-1500 mg, que contiene 35-75% en peso de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el resto al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un comprimido obtenido por compresión, de 500-1500 mg, que contiene 40-60% en peso de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en la que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 son como se han definido aquí anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el resto al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La expresión “una” entidad, como se usa en el presente documento, se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos, o al menos a un compuesto. Como tales, los términos “un” (o “uno”), “uno o más” y “al menos uno” pueden usarse de forma intercambiable en el presente documento.

La frase “como se ha definido aquí anteriormente” se refiere a la primera definición para cada grupo como se ha proporcionado en la definición de la fórmula I.

Los términos “opcional” u “opcionalmente”, como se usan en el presente documento, significan que un acontecimiento o circunstancia descrita puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que se produce dicho acontecimiento o circunstancia y casos en los que no. Por ejemplo, “fenilo opcionalmente sustituido” significa que el fenilo puede estar o puede no estar sustituido, y que la descripción incluye tanto fenilo sin sustituir como fenilo en el que hay sustitución.

Los compuestos de la presente descripción pueden tener centros asimétricos localizados en la cadena lateral de un resto de éster carboxílico, amida o carbonato que producen diastereómeros cuando se unen al nucleósido. Se contemplan todos los estereoisómeros de una cadena lateral de los compuestos de la presente invención, tanto mezclados como en forma pura o sustancialmente pura. La definición de los compuestos de acuerdo con la descripción abarca tanto enantiómeros de isómeros ópticos aislados como sus mezclas, incluyendo la forma racémica. El isómero óptico puro puede prepararse por síntesis estereoespecífica a partir de α-D-ribosa, o la forma racémica puede resolverse por métodos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos o separación por cromatografía en columna quiral. Los isómeros ópticos individuales pueden obtenerse a partir de los racematos por métodos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de sal con un ácido ópticamente activo, seguido de cristalización.

El término “alquilo”, como se usa en el presente documento, indica un resto de hidrocarburo de cadena sin ramificar o ramificada, que contiene 1 a 18 átomos de carbono. La expresión “alquilo inferior” indica un resto de hidrocarburo de cadena sin ramificar o ramificada, que contiene 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo inferior representativos incluyen metilo, etilo, propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *i*-butilo, *t*-butilo o pentilo.

Cuando el término “alquilo” se usa como un sufijo a continuación de otro término, como en “fenilalquilo” o “hidroxialquilo,” se pretende que haga referencia a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que está sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del otro grupo nombrado específicamente. De este modo, por ejemplo, “fenilalquilo” se refiere a un grupo alquilo que tiene uno a dos sustituyentes fenilo, y de este modo incluye bencilo, feniletilo y bifenilo. Un “alquilaminoalquilo” es un grupo alquilo que tiene uno a dos sustituyentes alquilamino.

El término “haloalquilo”, como se usa en el presente documento, indica un grupo alquilo de cadena sin ramificar o ramificada como se ha definido anteriormente, en el que 1, 2, 3 o más átomos de hidrógeno están sustituidos por un halógeno. Son ejemplos 1-fluorometilo, 1-clorometilo, 1-bromometilo, 1-yodometilo, trifluorometilo, triclorometilo, tribromometilo, triyodometilo, 1-fluoroetilo, 1-cloroetilo, 1-bromoetilo, 1-yodoetilo, 2-fluoroetilo, 2-cloroetilo, 2-bromoetilo, 2-yodoetilo, 2,2-dicloroetilo, 3-bromopropilo o 2,2,2-trifluoroetilo.

El término “cicloalquilo”, como se usa en el presente documento, indica un anillo carbocíclico saturado que contiene 3 a 8 átomos de carbono, es decir, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo.

El término “cicloalquilalquilo”, como se usa en el presente documento, se refiere al radical R’R”-, en el que R’ es un radical cicloalquilo como se define en el presente documento, y R” es un radical alquileno como se define en el presente documento, entendiendo que el punto de unión del resto cicloalquilalquilo estará en el radical alquileno. Los ejemplos de radicales cicloalquilalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilmetilo, ciclohexilmetilo, ciclopentiletilo. Cicloalquil C_{3-7}-alquilo C_{1-3} se refiere al radical R’R” en el que R’ es cicloalquilo de C_{3-7} y R” es alquileno de C_{1-3} como se define el presente documento.

El término “alquileno”, como se usa en el presente documento, indica un radical hidrocarburo lineal saturado divalente de 1 a 8 átomos de carbono, o un radical hidrocarburo divalente saturado ramificado de 3 a 8 átomos de carbono, a menos que se indique de otro modo. Los ejemplos de radicales alquileno incluyen, pero sin limitación, metileno, etileno, propileno, 2-metil-propileno, butileno, 2-etilbutileno.

El término “alquenilo”, como se usa en el presente documento, indica un radical de cadena de hidrocarburo sin sustituir [o sustituido] que tiene de 2 a 18 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 4 átomos de carbono, y que tiene uno o dos dobles enlaces olefínicos, preferentemente un doble enlace olefínico. Son ejemplos vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo) o 2-butenilo (crotilo).

El término “alquinilo”, como se usa en el presente documento, indica un radical de cadena de hidrocarburo sin sustituir que tiene de 2 a 18 átomos de carbono, [preferentemente de 2 a 4 átomos de carbono], y que tiene uno, o cuando sea posible dos, triples enlaces [preferentemente un triple enlace]. Son ejemplos etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo o 3-butinilo.

El término “alcoxi”, como se usa en el presente documento, indica un grupo alquiloxi sin sustituir de cadena sin ramificar o ramificada en el que la parte “alquilo” es como se ha definido anteriormente, tal como metoxi, etoxi, *n*-propiloxi, *i*-propiloxi, *n*-butiloxi, *i*-butiloxi, *t*-butiloxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, incluyendo sus isómeros. “Alcoxi inferior”, como se usa en el presente documento, indica un grupo alcoxi con un grupo “alquilo inferior” como se ha definido previamente.

El término “alquiltio” o “tioalquilo”, como se usa en el presente documento, indica un grupo (alquil)S- de cadena ramificada o sin ramificar en el que la parte “alquilo” es como se ha definido anteriormente. Son ejemplos metiltio, etiltio, *n*-propiltio, *i*-propiltio, *n*-butiltio, *i*-butiltio o *t*-butiltio.

Los términos “alquilsulfinilo” y “arilsulfinilo”, como se usan en el presente documento, indican un grupo de fórmula -S(=O)R en la que R es alquilo o arilo, respectivamente, y alquilo y arilo son como se definen en el presente documento.

Los términos “alquilsulfonilo” y “arilsulfonilo”, como se usan en el presente documento, indican un grupo de fórmula -$S(=O)_2R$ en la que R es alquilo o arilo, respectivamente, y el alquilo y el arilo son como se definen en el presente documento.

El término “arilo”, como se usa en el presente documento, indica un grupo aromático monocíclico o policíclico opcionalmente sustituido que comprende átomos de carbono e hidrógeno. Los ejemplos de grupos arilo adecuados incluyen, pero sin limitación, fenilo y naftilo (por ejemplo, 1-naftilo o 2-naftilo). Los sustituyentes adecuados para arilo se seleccionan del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, ariloxi, cicloalquilo, acilo, acilamino, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, halógeno, hidroxi, nitro y ciano.

El término “acilo” (“alquilcarbonilo”), como se usa en el presente documento, indica un grupo de fórmula C(=O)R en la que R es hidrógeno, un alquilo sin ramificar o ramificado que contiene 1 a 7 átomos de carbono, o un grupo fenilo.

Los términos “alcoxicarbonilo” y “ariloxicarbonilo”, como se usan en el presente documento, indican un grupo de fórmula -C(=O)OR en la que R es alquilo o arilo respectivamente, y el alquilo y el arilo son como han definido en el presente documento.

El término halógeno representa flúor, cloro, bromo o yodo, preferentemente flúor, cloro o bromo.

La expresión “agente acilante”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anhídrido, haluro de acilo u otro derivado activado de un ácido carboxílico. El término “anhídrido”, como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos de la estructura general RC(O)-O-C(O)R en la que R es como se ha definido en el párrafo anterior. La expresión “haluro de acilo”, como se usa en el presente documento, se refiere al grupo RC(O)X, en el que X es bromo o cloro. La expresión “derivado activado” de un compuesto, como se usa en el presente documento, se refiere a una forma reactiva transitoria del compuesto original que hace al compuesto activo en una reacción química deseada, en la que el compuesto original es sólo moderadamente reactivo o no reactivo. La activación se logra por formación de un derivado o un agrupamiento químico dentro de la molécula con un contenido de energía libre mayor que el del compuesto original, que hace a la forma activada más susceptible de reaccionar con otro reactivo. En el contexto de la presente invención, la activación del grupo carboxi es de particular importancia. La expresión agente acilante, como se usa en el presente documento, incluye además reactivos que producen ésteres de carbonatos $OC(=O)OR^4$, en los que R^4 es como se ha definido anteriormente en el presente documento.

La expresión “grupo protector”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo químico que (a) previene que un grupo reactivo participe en una reacción química indeseable; y (b) que puede eliminarse fácilmente después de que ya no se necesite la protección del grupo reactivo. Por ejemplo, el trialquilsililo es un grupo protector para una función hidroxilo primaria, y un acetónido es un grupo protector para un diol vecinal.

En la representación gráfica de los compuestos proporcionados a lo largo de la presente solicitud, un enlace con forma de cuña cónica más gruesa indica un sustituyente que está por encima del plano del anillo al que pertenece el carbono asimétrico (también nombrado β), y un enlace de cuña discontinuo indica un sustituyente que está por debajo del plano del anillo al que pertenece el carbono asimétrico (también designado α).

El término “combinación” o “terapia de combinación”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de una pluralidad de fármacos en un régimen terapéutico por administración concurrente o secuencial de los fármacos al mismo tiempo o en momentos distintos.

La expresión “interferón derivatizado químicamente”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de interferón unida covalentemente a un polímero que altera las propiedades físicas y/o farmacocinéticas del interferón. Un lista no limitante de dichos polímeros incluye homopolímeros de poli(óxido de alquileno) tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG), polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloques de los mismos, con la condición de que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloques. Un experto en la técnica se dará cuenta de diversos enfoques para unir el polímero y el interferón (por ejemplo, véase A. Kozlowski y J. M. Harris J. Control. Release 2001 72(1-3):217-24). Una lista no limitante de IFNα derivatizado químicamente contemplada en la presente patente incluye peginterferón-α-2a (PEGASYS®) y peginterferón-α-2b (PEGINTRON®).

Los compuestos de fórmula I presentan tautomería. Los compuestos tautoméricos pueden existir en forma de dos o más especies interconvertibles. Los tautómeros prototrópicos resultan de la migración de un átomo de hidrógeno enlazado covalentemente entre dos átomos. Los tautómeros existen generalmente en equilibrio, y los intentos de aislar un tautómero individual producen normalmente una mezcla cuyas propiedades físicas y químicas son coherentes con una mezcla de compuestos. La posición del equilibrio depende de características químicas en la molécula. Por ejemplo, en muchas cetonas y aldehidos alifáticos, tales como acetaldehído, predomina la forma ceto, mientras que en fenoles, predomina la forma enol. Los tautómeros prototrópicos habituales incluyen tautómeros ceto/enol (-C(=O)-CH- $\rightleftarrows$ -C(-OH)=CH-), amida/ácido imídico (-C(=O)-NH- $\rightleftarrows$ -C(-OH)=N-) y amidina (-C(=NR)-NH- $\rightleftarrows$ -C(-NHR)=N-). Los dos últimos son particularmente habituales en heteroarilos y anillos heterocíclicos, y la presente invención abarca todas las formas tautoméricas de los compuestos.

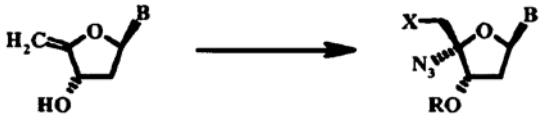
Las abreviaturas usadas normalmente incluyen: acetilo (Ac), azo-*bis*-isobutirilnitrilo (AIBN), atmósferas (Atm), *terc*-butoxicarbonilo (Boc), pirocarbonato de di-*terc*-butilo o anhídrido de boc (BOC_2O), bencilo (Bn), butilo (Bu), benciloxicarbonilo (CBZ o Z), carbonildiimidazol (CDI), 1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano (DABCO), 1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno (DBN), 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), N,N’-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,2-dicloroetano (DCE), diclorometano (DCM), azodicarboxilato de dietilo (DEAD), azodicarboxilato de di-*iso*-propilo (DIAD), hidruro de di-*iso*-butilaluminio (DIBAL o DIBAL-H), di-iso-propiletilamina (DIPEA), N,N-dimetilacetamida (DMA), 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI), etilo (Et), acetato de etilo (EtOAc), etanol (EtOH), éster etílico del ácido 2-etoxi-2*H*-quinolin-1-carboxílico (EEDQ), éter dietílico (Et_2O), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N’N’-tetrametiluronio (HATU), ácido acético (HOAc), 1-N-hidroxibenzotriazol (HOBt), cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), hexametildisilazano de litio (LiHMDS), metanol (MeOH), punto de fusión (pf), $MeSO_2$- (mesilo o Ms), metilo (Me), acetonitrilo (MeCN), ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA), espectro de masas (ms), metil *t*-butil éter (MTBE), N-bromosuccinimida (NBS), N-carboxianhídrido (NCA), N-clorosuccinimida (NCS), N-metilmorfolina (NMM), N-metilpirrolidona (NMP), clorocromato de piridinio (PCC), dicromato de piridinio (PDC), fenilo (Ph), propilo (Pr), *iso*-propilo (*i*-Pr), libra por pulgada al cuadrado (psi), piridina (pyr), temperatura ambiente (rt o RT), *terc*-butildimetilsililo o *t*-$BuMe_2Si$ (TBDMS), trietilamina (TEA o Et_3N), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxilo (TEMPO), triflato o CF_3SO_2- (Tf), ácido trifluoroacético (TFA), cromatografía de capa fina (TLC), tetrahidrofurano (THF), trimetilsililo o Me_3Si (TMS), ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato (TsOH o pTsOH), 4-Me-$C_6H_4SO_2$- o tosilo (Ts), N-uretano-N-carboxianhídrido (UNCA). La nomenclatura convencional, incluyendo los prefijos *normal* (*n*), *iso* (*i*-), *secundario* (*sec*-), *terciario* (*terc*-) y *neo*, tiene su significado habitual cuando se usa con un resto alquilo. (J. Rigaudy y D. P. Klesney, Nomenclature in Organic Chemistry, IUPAC 1979 Pergamon Press, Oxford.).

Los compuestos de la presente descripción se pueden fabricar por una diversidad de métodos representados en los esquemas de reacción sintéticos ilustrativos que se muestran y describen a continuación. Los materiales de partida y los reactivos usados en la preparación de estos compuestos están generalmente disponibles en proveedores habituales, tales como Aldrich Chemical Co., o se preparan por métodos conocidos por los expertos en la técnica siguiendo procedimientos expuestos en referencias tales como Fieser and Fieser’s Reagents for Organic Synthesis; Wiley & Sons: Nueva York, volúmenes 1-21; R. C. LaRock, Comprehensive Organic Transformations, 2ª edición Wiley-VCH, Nueva York 1999; Comprehensive Organic Synthesis, B. Trost e I. Fleming (Eds.) vol. 1-9 Pergamon, Oxford, 1991; Comprehensive Heterocyclic Chemistry, A. R. Katritzky y C. W. Rees (Eds) Pergamon, Oxford 1984, vol. 1-9; Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, A. R. Katritzky y C. W. Rees (Eds) Pergamon, Oxford 1996, vol. 1-11; y Organic Reactions, Wiley & Sons: Nueva York, 1991, Volúmenes 1-40. Los siguientes esquemas de reacción sintéticos son meramente ilustrativos de algunos métodos mediante los cuales pueden sintetizarse los compuestos de la presente descripción, y pueden hacerse diversas modificaciones a estos esquemas de reacción sintéticos y se le ocurrirán al experto en la técnica mediante referencia a la descripción contenida en esta Solicitud.

Los materiales de partida y los intermedios de los esquemas de reacción sintéticos pueden aislarse y purificarse, si se desea, usando técnicas convencionales, que incluyen, pero sin limitación, filtración, destilación, cristalización, cromatografía, y similares. Dichos materiales pueden caracterizarse usando medios convencionales, que incluyen constantes físicas y datos espectrales.

A menos que se especifique lo contrario, las reacciones descritas en el presente documento se realizan preferentemente en una atmósfera inerte a presión atmosférica a un intervalo de temperaturas de reacción de alrededor de -78ºC a alrededor de 150ºC, más preferentemente de alrededor de 0ºC a alrededor de 125ºC, y aún más preferentemente y convenientemente a alrededor de la temperatura de la sala (o ambiente), por ejemplo, alrededor de 20ºC.

Mientras que se ha explorado la modificación química de las posiciones 2' y 3' de nucleósidos, la modificación de la posición 4' ha sido menos prevalente, muy probablemente debido a los desafíos sintéticos añadidos asociados con su síntesis. Maag y col. (Anti-HIV Activity of 4'-Azido and 4'-Methoxynucleosides, J. Med Chem. 1992 35:1440-1451) describen la síntesis de 4'-azido-2-desoxirribonucleósidos y 4-azido nucleósidos. C. O'Yang, y col. (Tetrahedron Lett. 1992 33(1): 37-40 y 33(1): 41-44) describen la síntesis de nucleósidos sustituidos con compuestos 4'-ciano, 4'-hidroximetil y 4'-formil nucleosídicos. Estos compuestos se evaluaron como compuestos anti-VIH. Maag y col. (supra) enseñaron que los 4'-azido nucleósidos **16c** pueden prepararse mediante adición de azida de yodo a nucleósidos de 5-metilen-tetrahidrofuran-2-ilo **15** en los que B es timina, uracilo, adenina o guanosina.

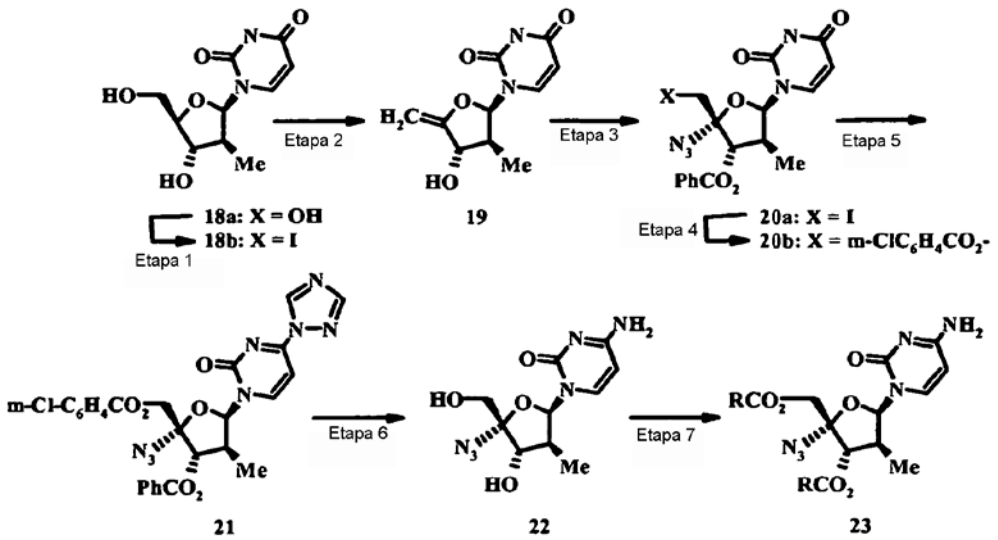


(15)

16a: X = I; R = H
16b: X = OC(O)-*m*-Cl-C_6H_4Cl; R = COPh
16c: X = OH; R = H

En la Publicación de Patente U.S. nº 20050038240, publicada el 17 de febrero de 2005, T. J. Connolly y col. describen un procedimiento mejorado para preparar 4'-azido nucleósidos. En el documento WO 02/100415, R. Devos y col. describen los nuevos derivados de nucleósido 4'-sustituidos que inhiben la ADN polimerasa viral NS5B del VHC. La adición de azida de yodo se lleva a cabo de la manera más eficaz en las uridinas **15** (B = uracilo), que pueden convertirse en la citidina correspondiente utilizando el métodos descrito por A. D. Borthwick y col., (J. Med. Chem. 1990 33(1):179; véase también K. J. Divakar y C. B. Reese J. Chem Soc., Perkin Trans. I 1982 1171-1176).

Esquema A



Se prepara 4-amino-1-(5-azido-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (**22**) a partir de 1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (**18a**) (D. O. Cicero y col., "Stereoselective synthesis of novel analogs of 2'-deoxy- and 2',3'-dideoxynucleosides with potential antiviral activity", Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994 4(7):861-6; A. Iribarren, documento EP547008 A1 titulado "Preparation of new (2'R)- and (2'S)-2'-deoxy-2'-C-hydrocarbyl antisense oligonucleotides useful in scientific research, therapeutics and diagnostics", ("Preparación de nuevos oligonucleótidos antisentido de (2'R)- y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-hidrocarbilo útiles en investigación científica, terapia y diagnóstico"), publicado el 16 de junio de 1993) usando el procedimiento de Maag y col. (*véase más arriba*) (ESQUEMA A). La 4-amino-1-(5-azido-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (**22**) muestra buena actividad en un ensayo de replicón a base de células para la actividad de polimerasa de VHC (TABLA I). Además, el compuesto mostró bajos niveles de citotoxicidad en el ensayo. El compuesto 19 es el objeto de la presente invención.

TABLA 1		
Compuesto	% Máximo de Inhibición de Pol de VHC (100 μM)	% Máximo de Citotoxicidad (100 (μM)
22	98,58	9,48

A menudo, los derivados nudeosídicos son potentes agentes quimioterapéuticos antivirales (por ejemplo, VIH, VHC, Herpes simple, CMV) y anti-cancerosos. Desafortunadamente, su utilidad práctica está limitada a menudo por dos factores. En primer lugar, las malas propiedades farmacocinéticas limitan con frecuencia la absorción del nucleósido desde el intestino y la concentración intracelular de los derivados nudeosídicos, y, en segundo lugar, las propiedades físicas subóptimas restringen las opciones de formulación que podrían emplearse para mejorar el suministro del ingrediente activo.

Albert introdujo el término profármaco para describir un compuesto que carece de actividad biológica intrínseca pero que puede experimentar una transformación metabólica en la sustancia farmacéutica activa (A. Albert, Selective Toxicity, Chapman y Hall, Londres, 1951). Recientemente se han revisado los profármacos (P. Ettmayer y col., J. Med Chem. 2004 47(10):2393-2404; K. Beaumont y col., Curr. Drug Metab. 2003 4:461-485; H. Bundgaard, Design of Prodrugs: Bioreversible derivatives for various functional groups and chemical entities en Design of Prodrugs, H. Bundgaard (ed) Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1985; G. M. Pauletti y col. Adv. Drug Deliv. Rev. 1997 27:235-256; R. J. Jones y N. Bischofberger, Antiviral Res. 1995 27:1-15; y C. R. Wagner y col., Med. Res. Rev. 2000 20:417-45). Aunque la transformación metabólica puede catalizarse por enzimas específicas, a menudo hidrolasas, el compuesto activo también puede regenerarse por procesos químicos no específicos.

Profármacos farmacéuticamente aceptables se refiere a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo se hidroliza o se oxida, en el hospedante para formar el compuesto de la presente invención. La bioconversión debe evitar la formación de fragmentos con predisposición toxicológica. Los ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles unidos a un resto funcional del compuesto activo. En el diseño de pronucleótidos se han utilizado alquilación, acilación u otra modificación lipófila del grupo o grupos hidroxi en el resto de azúcar. Estos polinucleótidos pueden hidrolizarse o desalquilarse *in vivo* para generar el compuesto activo.

Los factores que limitan la biodisponibilidad oral son con frecuencia la absorción desde el tubo disgestivo, y la excreción de primer paso por la pared intestinal y el hígado. La optimización de la absorción transcelular a través del tubo digestivo requiere un valor de $D_{(7,4)}$ mayor de cero. La optimización del coeficiente de distribución, sin embargo, no asegura el éxito. El profármaco puede tener que evitar transportadores activos de salida en el enterocito. El metabolismo intracelular en el enterocito puede dar como resultado un transporte pasivo o un transporte activo del metabolito, a través de bombas de salida, de nuevo a la luz intestinal. El profármaco también puede resistir las biotransformaciones indeseadas en la sangre antes de alcanzar las células o receptores diana.

Aunque los supuestos profármacos algunas veces pueden diseñarse de forma racional basándose en la funcionalidad química presente en la molécula, la modificación química de un compuesto activo produce una entidad molecular totalmente nueva que puede mostrar propiedades físicas, químicas y biológicas indeseables, ausentes en el compuesto progenitor. Los requisitos reguladores para la identificación de metabolitos pueden representar desafíos si múltiples rutas conducen a una pluralidad de metabolitos. De esta manera, la identificación de profármacos sigue siendo un ejercicio incierto y desafiante. Además, la evaluación de las propiedades farmacocinéticas de los profármacos potenciales es una tarea costosa y desafiante. Los resultados farmacocinéticos de modelos animales pueden ser difíciles de extrapolar a los seres humanos.

En la patente U.S. nº 6.846.810, concedida el 25 de enero de 2005, J. A. Martin y col. han mostrado que se ha descubierto que 4'-azidonucleósidos acilados son profármacos eficaces. Los derivados diacílicos **23** de **22** pueden prepararse por acilación del nucleósido progenitor **22**.

Los compuestos de la presente descripción se preparan convenientemente en una etapa mediante acilación de **22** en un disolvente orgánico acuoso. El disolvente puede ser una disolución acuosa homogénea o una disolución de dos fases. El pH del disolvente orgánico acuoso se mantiene por encima de 7,5 mediante adición de una base para neutralizar el ácido producido por la acilación. La base puede ser un hidróxido de metal alcalino o álcali, o una amina terciaria. La reacción se lleva a cabo en presencia de DMAP que se sabe en la técnica que es un catalizador para la acilación. Una ventaja del presente procedimiento es que el producto deseado puede obtenerse sin acilación de la base heterocíclica.

Como alternativa, la acilación se lleva a cabo convenientemente con un anhídrido o haluro de acilo correspondiente en un disolvente tal como DCM, cloroformo, tetracloruro de carbono, éter, THF, dioxano, benceno, tolueno, MeCN, DMF, disolución de hidróxido sódico o sulfolano, opcionalmente en presencia de una base inorgánica u orgánica a temperaturas comprendidas entre -20 y 200ºC, pero preferentemente a temperaturas comprendidas entre -10 y 160ºC. La reacción de acilación también puede llevarse a cabo según Schotten Baumann en un medio bifásico orgánico-acuoso en presencia de catalizadores de transferencia de fase y DMAP.

Puede lograrse la acilación selectiva de los grupos hidroxi. Como alternativa, el grupo N-acilo de un nucleósido N,O,O-triacílico puede escindirse selectivamente con bromuro de cinc para producir el compuesto diacílico protegido (R. Kierzek y col. Tetrahedron Lett. 1981 22(38): 3762-64).

La acilación selectiva de los grupos hidroxilo específicos en el radical carbohidrato puede lograrse convenientemente mediante acilaciones o desacilaciones catalizadas por enzimas. La catálisis enzimática proporciona condiciones selectivas suaves para las transformaciones orgánicas. S. M. Roberts ha revisado las biotransformaciones preparativas (J. Chem. Soc. Perkin 1, 2001, 1475; 2000 611; 1999, 1; y, 1998 157). M. Mahmoudian y col. (Biotechnol. Appl. Biochem. 1999 29:229-233) dio a conocer la acilación selectiva de la posición 5' de 2-amino-9-β-D-arabinofuranosil-6-metoxi-9H-purina con Novozyme 435, una preparación inmovilizada de la lipasa de *Candida antarctica*. Otras enzimas dadas a conocer que acilan selectivamente el 5'-hidroxilo incluyen: proteasa de *Bacillus licheniformis*, Lipozyme IM (lipasa de *Mucor miehei*, CLEC-BL (proteasa de *B. licheniformis*), savinasa (proteasa de *Bacillus sp.*), Novozyme-243 (proteasa de *Bacillus licheniformis*), lipasa y lipolasa de *Alcaligenes sp.* (Novo).

Se encontró que la preparación enzimática Lipolase® (lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, nº de catálogo de Sigma L 0777) hidroliza selectivamente el grupo 5'-acilo de derivados triacílicos para producir compuestos 2',3'-diacilados. En el documento WO 2004043894, G. G. Heraldsson y col. describen el uso de la lipasa de *T. lanuginosus* para la esterificación de aceites marinos. N. Weber y col. (Eur. J. of Lipid Sci. and Technol. 2003 105(10):624-626) describen la transesterificación catalizada por *T. lanuginosus* de oleato de metilo. V. Bodai y col. (Adv. Synth. Cat. 2003 345(6 y 7):811-818) describen nuevas hidrolasas procedentes de hongos filamentosos termófilos que pueden usarse para biotransformaciones selectivas.

Otros informes de hidrólisis enzimáticas regioselectivas de ésteres incluyen: R. Hanson y col., Bioorg. and Med. Chem. 2000, 2681-2687 (síntesis de un profármaco de lobucavir a través de acilación e hidrólisis regioselectiva); R. Pfau y col., Syn Lett 1999, 1817-1819 (hidrólisis selectiva de un éster de carbohidrato); A. Bianco y col, J. of Mol. Cat. B: Enzymatic 1997 209-212 (acilación e hidrólisis regioselectiva para la síntesis de derivados de ácido siálico); Y. Ota et. al., Bioscience, Biotechnology, Biochemistry (1997), 166-167 (hidrólisis de éster regioselectiva de 1,2,3-trihexanolilglicerol); U. T. Bornscheuer y col., Enzyme Microbial Technol. 1995, 578-86 (síntesis catalizada por lipasa de monoacilglicerol; revisión); C. T. Goodhue y col., documento W09403625 (procedimiento regioselectivo para la resolución de monoésteres de carbohidratos); N. W. Boaz, documento W09115470 (Separación de mezcla de alcohol-éster por hidrólisis enzimática selectiva); Y. S. Sanghvi y col., documento US 2002142307 (hidrólisis regioselectiva de 3',5'-di-O-levulinilnucleósidos); J. García y col. J. Org. Chem. 2002, 4513-4519 (hidrólisis regioselectiva de 3',5'-di-O-levulinilnucleósidos); O. Kirk y col. Biocat and Biotransformation (1995) 91-7 (acilación y desacilación regioselectivas de glucosa y derivados catalizadas por lipasa).

Un experto en la técnica reconocerá que las esterificaciones selectivas también pueden lograrse mediante metodología química convencional. Se ha descrito la protección selectiva del grupo 5'-hidroxilo, que permitirá la esterificación directa del 2'-hidroxilo o, como alternativa, la incorporación de un segundo grupo protector que permitirá la desprotección y acilación selectiva del alcohol primario.

Los compuestos de la presente descripción pueden formularse en una amplia variedad de formas de dosificación de administración oral y vehículos. La administración oral puede estar en forma de comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas de gelatina duras y blandas, disoluciones, emulsiones, jarabes o suspensiones. Los compuestos de la presente descripción son eficaces cuando se administran por administración de supositorios, entre otras vías de administración. La manera de administración más conveniente es generalmente la oral, usando un régimen de dosificación diario conveniente que puede ajustarse de acuerdo con la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente a la medicación antiviral.

Un compuesto o compuestos de la presente descripción, así como sus sales farmacéuticamente utilizables, junto con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes convencionales, puede ponerse en forma de composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitarias pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos activos adicionales, y las formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo en proporción con el intervalo de dosificación diario pretendido a emplear. Las composiciones farmacéuticas pueden emplearse como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o líquidos tales como suspensiones, emulsiones, o cápsulas rellenas para uso oral; o en forma de supositorios para administración rectal o vaginal. Una preparación típica contendrá de alrededor de 5% a alrededor de 95% de compuesto o compuestos activos (p/p). La expresión "preparación" o "forma de dosificación" pretende incluir formulaciones tanto sólidas como líquidas del compuesto activo, y un experto en la técnica apreciará que un ingrediente activo puede existir en diferentes preparaciones dependiendo de la dosis deseada y de parámetros farmacocinéticos.

El término "excipiente", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que se usa para preparar una composición farmacéutica, y generalmente es seguro, no tóxico y no es indeseable desde el punto de vista biológico o de otra manera, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Los compuestos de la presente descripción pueden administrarse solos, pero generalmente

se administrarán mezclados con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticos adecuados seleccionados con respecto a la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica convencional.

Una forma de “sal farmacéuticamente aceptable” de un ingrediente activo también puede conferir inicialmente una propiedad farmacocinética deseable al ingrediente activo que está ausente en la forma no salina, e incluso puede afectar positivamente a la farmacodinámica del ingrediente activo con respecto a su actividad terapéutica en el cuerpo. La frase “sal farmacéuticamente aceptable” de un compuesto, como se usa en presente documento, significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto parental. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canfosulfónico, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido salicílico, ácido mucónico y similares. Debe entenderse que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolventes (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos) como se definen en el presente documento, de la misma sal de adición de ácidos.

Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, pastillas, cápsulas, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes saborizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes de disgregación de comprimidos, o un material de encapsulamiento. En los polvos, el vehículo generalmente es un sólido finamente dividido que está mezclado con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo generalmente se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad aglutinante necesaria en proporciones adecuadas, y se compacta hasta obtener la forma y el tamaño deseados. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares. Las preparaciones en forma sólida pueden contener, además del componente activo, colorantes, sabores, estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares.

Las formulaciones líquidas también son adecuadas para administración oral, e incluyen formulaciones líquidas, incluyendo emulsiones, jarabes, elixires y suspensiones acuosas. Éstas incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse en preparaciones en forma líquida poco antes del uso. Las emulsiones pueden prepararse en disoluciones, por ejemplo en disoluciones acuosas de propilenglicol, o pueden contener agentes emulsionantes tales como lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga. Las suspensiones acuosas pueden prepararse dispersando el componente activo finamente dividido en agua con un material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión bien conocidos.

Los compuestos de la presente descripción pueden formularse para administración como supositorios. Primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa homogéneamente, por ejemplo por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte después en moldes del tamaño conveniente, y se deja enfriar y solidificar.

Los compuestos de la presente descripción pueden formularse para administración vaginal. Son apropiados pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones que contienen, además del ingrediente activo, dichos vehículos como se conocen en la técnica.

Las formulaciones adecuadas junto con vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticos se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pennsylvania. Un científico de formulación experto puede modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una vía de administración particular sin hacer que las composiciones de la presente descripción sean inestables o se comprometa su actividad terapéutica.

La modificación de los presentes compuestos para hacer que sean más solubles en agua u otro vehículo, por ejemplo puede lograrse fácilmente por modificaciones pequeñas (por ejemplo, formulación de sales) que están dentro de la pericia normal en la técnica. También está dentro de la pericia normal en la técnica modificar la vía de administración y el régimen de dosificación de un compuesto particular para manejar la farmacocinética de los presentes compuestos para conseguir efectos beneficiosos máximos en los pacientes.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en el presente documento, significa una cantidad requerida para reducir los síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requisitos individuales en cada caso particular. Esta dosificación puede variar dentro de amplios límites, dependiendo de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y estado de salud general del

paciente, otros medicamentos con los que se está tratando el pariente, la vía y forma de administración y las preferencias y experiencia del especialista médico implicado. Para la administración oral, una dosificación diaria comprendida entre alrededor de 0,1 y alrededor de 10 g al día debería ser apropiada en monoterapia y/o en terapia de combinación. Una dosificación diaria preferida está comprendida entre alrededor de 0,5 y alrededor de 7,5 g al día, y una más preferida entre 1,5 y alrededor de 6,0 g al día. Generalmente, el tratamiento se inicia con una gran "dosis de carga" inicial para reducir rápidamente o eliminar el virus, seguido de una reducción de la dosis hasta un nivel suficiente para prevenir la reaparición de la infección. Un experto normal en el tratamiento de enfermedades descritas en el presente documento podrá, sin experimentación innecesaria, y basándose en el conocimiento personal, la experiencia y las descripciones de la presente solicitud, determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente descripción para una enfermedad y paciente dados.

La eficacia terapéutica puede determinarse a partir de ensayos de la función hepática que incluyen, pero sin limitación, niveles de proteína tales como proteínas del suero (por ejemplo, albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (por ejemplo, alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, -glutaminiltranspeptidasa, etc.), síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol y síntesis de ácidos biliares; la función metabólica hepática, incluyendo, pero sin limitarse a, el metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y de amoniaco. Como alternativa, la eficacia terapéutica puede monitorizarse midiendo el ARN de VHC. Los resultados de estos ensayos permitirán optimizar la dosis.

En realizaciones de la descripción, el compuesto activo o una sal pueden administrarse en combinación con otro agente antiviral tal como ribavirina, otro inhibidor nucleosídico de la polimerasa de VHC, un inhibidor no nucleosídico de la polimerasa de VHC, un inhibidor de la proteasa de VHC, un inhibidor de la helicasa de VHC o un inhibidor de la fusión de VHC. Cuando el compuesto activo o su derivado o sal se administran en combinación con otro agente antiviral, la actividad puede aumentarse con respecto a la del compuesto progenitor. Cuando el tratamiento es la terapia de combinación, dicha administración puede ser concurrente o secuencial con respecto a la de los derivados nucleosídicos. "Administración concurrente", como se usa en el presente documento, incluye así la administración de los agentes al mismo tiempo o en momentos diferentes. La administración de dos o más agentes al mismo tiempo puede conseguirse mediante una sola formulación que contiene dos o más ingredientes activos, o mediante la administración sustancialmente simultánea de dos o más formas de dosificación con un sólo agente activo.

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

Ejemplo 1

Etapa 1 - Una disolución de **18a** (2,17 g, 8,96 mmoles, 1 equiv.), imidazol (732 mg, 10,7 mmoles, 1,2 equiv.) y Ph_3P (2,82 g, 10,7 mmoles, 1,2 equiv.) en THF seco (30 ml) se enfrió en un baño de hielo-agua, y se añadió gota a gota una disolución de yodo (2,50 g, 9,85 mmoles, 1,1 equiv.) en THF seco (10 ml) durante 10 min. La mezcla de reacción se agitó a 0-5ºC durante otros 10 minutos. El baño de hielo-agua se retiró y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 70 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (200 ml) y se lavó con $Na_2S_2O_3$ 0,5 M en $NaHCO_3$ acuoso saturado (150 ml). La fase acuosa se lavó con DCM (4 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía sobre SiO_2 eluyendo con un gradiente por etapas de MeOH/DCM (1-5% v/v de MeOH), proporcionando 1,75 g (55%) de **18b**: Datos de RMN ^1H ($CDCl_3$, 25ºC): δ 8,22 (br s, 1H), 7,59 (d, 1H), 6,19 (d, 1H), 5,75 (dd, 1H), 3,79 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,57 (dd, 1H), 3,47 (dd, 1H), 2,69 (m, 1H), 2,13 (d, 1H), 1,00 (d,3H).

Etapa 2 - Una disolución de **18b** (1,84 g, 5,22 mmoles) y metóxido sódico 0,4 M en MeOH (81 ml) se agitó a 60ºC durante 5 h, y después se enfrió en un baño de hielo-agua. La forma de piridinio DOWEX H^+ (preparada tratando DOWEX H^+ con piridina (10 ml/g de resina), filtrando y lavando con MeOH antes de su uso) se añadió en porciones hasta que el pH de la disolución fue neutro (total 5-6 g). El baño de hielo-agua se retiró y la mezcla se agitó a RT durante 5 min. La resina se eliminó por filtración y se lavó con MeOH (100 ml). El residuo se suspendió en EtOH al 6%/DCM, se aplicó una columna de SiO_2 y se eluyó con un gradiente de EtOH/DCM (EtOH al 6-7% en v/v), proporcionando 0,942 g (80%) de **19** lo suficientemente puro para su uso en la siguiente etapa.

Etapa 3 - Se suspendieron cloruro de benciltrietilamonio (1,91 g, 8,4 mmoles, 2 equiv.) y azida sódica (546 mg, 8,4 mmoles, 2 equiv.) en MeCN seco (32 ml), y la mezcla se sometió a ultrasonidos durante unos pocos minutos. La suspensión fina resultante se agitó a RT durante 3 h y después se filtró en una atmósfera de N_2 en una disolución en THF seco (30 ml) del compuesto **19** (942 mg, 4,2 mmoles, 1 equiv.). Se añadió NMM (140 µl, 0,106 mmoles, 0,3 equiv.) y la disolución resultante se enfrió en un baño de hielo-agua, y se añadió gota a gota una disolución de yodo (1,81 g, 7,14 mmoles, 1,7 equiv.) en THF seco (39 ml) durante 1 h. La mezcla de reacción resultante se agitó a 0-5ºC durante 2 h más. Se añadió *N*-acetil-L-cisteína (69 mg, 0,035 mmoles, 0,1 equiv.), y la disolución se agitó hasta que disminuyó el burbujeo. Se añadieron NMM (2,31 ml, 21,0 mmoles, 5 equiv.) y DMAP (513 mg, 4,2 mmoles, 1 equiv.), seguido de una adición gota a gota de cloruro de benzoílo (1,1 ml, 9,24 mmoles, 2,2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a 0-5ºC durante 30 min, y después se almacenó en un frigorífico toda la noche. Los análisis de TLC y LC-MS mostraron una reacción completa. Se añadió MeOH (5 ml), y después de unos pocos minutos el

disolvente se concentró hasta la mitad del volumen en un evaporador rotatorio y después se añadió con agitación una disolución de $Na_2S_2O_3$ 0,1 M en $NaHCO_3$ acuoso saturado (300 ml) y la mezcla se calentó a RT. La mezcla se extrajo con DCM (150 ml), y la fase acuosa se extrajo dos veces con DCM (50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron. Después, la fase orgánica se extrajo con ácido cítrico al 5%, y la fase acuosa se lavó dos veces con DCM (2 x 50 ml). Los extractos de DCM se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron *a vacío*. El residuo se purificó por cromatografía sobre SiO_2 eluyendo con un gradiente por etapas de EtOH/DCM (0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 y 2,0% de EtOH), proporcionando 1,72 g (83%) de **20a**: Datos de RMN ^1H ($CDCl_3$, 25ºC): δ 8,22-7,46 (7H), 6,49-6,39 (1H), 5,84 (dd, 1H), 5,55-5,47 (1H), 3,85 (d, 1H), 3,74 (d, 1H), 3,18 (m, 1H), 1,09 (d, 3H).

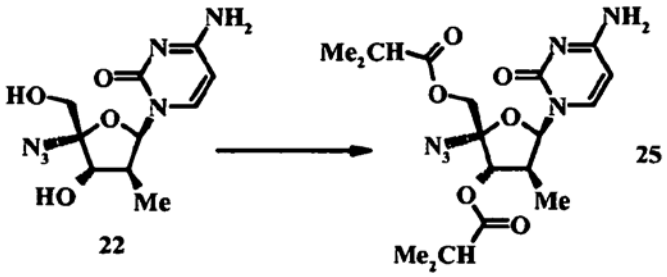
Etapa 4 - Se combinó una disolución de compuesto **20a** (1,72 g, 3,47 mmoles, 1 equiv.) en DCM (155 ml) con una mezcla de Bu_4N HSO_4 (825 mg, 2,43 mmoles, 0,7 equiv.) y ácido *m*-clorobenzoico (359 mg, 2,29 mmoles, 0,66 equiv.) en K_2HPO_4 acuoso 1,75 M (55 ml). El sistema de dos fases se agitó vigorosamente a RT y se añadieron dos porciones de una mezcla de reactivos disponible comercialmente que contenía MCPBA al 55%, ácido *m*-clorobenzoico al 10% y H_2O al 35% (2 x 3,57 g, correspondientes a 2 x 16,5 mmoles o 2 x 3,28 equiv. de MCPBA y 2 x 3,3 mmoles o 2 x 0,66 equiv. de ácido *m*-clorobenzoico) durante un intervalo de 1,5 h. La mezcla se agitó vigorosamente a RT durante otras 18 h. El análisis LC-MS mostró >96% de reacción. Se añadió una disolución de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (35 g) en $NaHCO_3$ acuoso saturado (500 ml), y la mezcla se agitó vigorosamente a RT durante 30 min. La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se lavó con DCM (2x10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con $NaHCO_3$ acuoso saturado (40 ml). La fase de $NaHCO_3$ acuoso se lavó con DCM (2x10 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía sobre SiO_2, eluyendo con un gradiente de EtOH/DCM (EtOH al 1-2% en v/v), proporcionando 1 g (56%) de **20b**: RMN ^1H ($CDCl_3$, 25ºC): δ 8,19 (br s, 1H), 8,07-7,88 (4H), 7,65-7,36 (6H), 6,57-6,45 (1H), 5,64 (dd, 1H), 5,51-5,42 (1H), 4,80 (m, 2H), 3,24 (m, 1H), 1,09 (d, 3H).

Etapa 5 - El diéster **20b** (100 mg, 0,19 mmoles, 1 equiv.) y 1,2,4-triazol (131 mg, 1,9 mmoles, 10 equiv.) se coevaporaron en piridina seca y se redisolvieron en piridina seca (1 ml). La disolución se enfrió en un baño de hielo-agua, y se añadió gota a gota una disolución de $POCl_3$ (44 µl, 0,475 mmoles, 2,5 equiv.) en MeCN (0,5 ml) durante unos pocos minutos. La mezcla de reacción se agitó a 0-5ºC durante otros 5 min, y después se agitó a RT durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a la mitad del volumen en un evaporador rotatorio, y después se trató con NH_3 saturado en etanol (20 ml) y la disolución resultante se agitó a RT toda la noche. Después de la evaporación, el residuo se purificó por cromatografía sobre SiO_2, eluyendo con un gradiente por etapas de EtOH/DCM (6, 10, 15 y 20% en v/v de EtOH), proporcionando 0,036 g (66%) de **22**, que tenía una pureza del 98% según el análisis por LCMS (~2,0% de isómero 2' contaminante).

Esta reacción se repitió con 900 mg del compuesto **20b**, dando como resultado 270 mg (54%, 97% de pureza) de **22** después de la cromatografía: RMN ^1H (DMSO-d_6, 25ºC): δ 7,69 (d, 1H), 7,14 (d, 2H), 6,32 (br s, 1H), 5,72 (d, 1H), 5,78 (br s, 2H), 3,89 (br s, 1H), 3,74 (d,d,d, 2H), 2,54 (m, 1H), 0,77 (d, 3H).

Ejemplo 2 de referencia

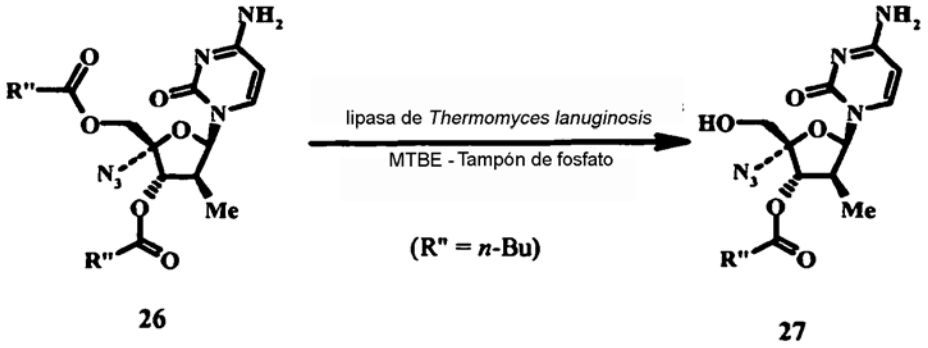
Éster (2R,3S,4S,5R)-5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-2-isobutiriloximetil-4-metil-tetrahidro-furan-3-ílico del ácido isobutírico (**25**)



El pH de una disolución de **22** (0,700 g, 2,48 mmoles) en THF (7 ml) y salmuera diluida (7 ml) se ajustó con KOH acuoso diluido hasta aprox. 11. Se añadió lentamente (gota a gota) cloruro de isobutirilo (1,0 g) a la mezcla de reacción bifásica agitada enfriada con hielo mientras el pH se mantenía a un pH de alrededor de 11 añadiendo KOH acuoso diluido cuando fue necesario. El alcance de la reacción se monitorizó mediante HPLC. 1 equiv. adicional añadido de cloruro de isobutirilo en la HPLC indicó la conversión casi completa. La mezcla de reacción se dejó en reposo toda la noche a RT. La disolución se diluyó con EtOAc (50 ml) y el pH de la fase acuosa se ajustó hasta aprox. 7,5 con HCl conc. Las fases se separaron, y la fase orgánica se lavó tres veces con agua y se evaporó hasta sequedad para obtener **25**.

Ejemplo 3 de referencia

Éster (2R,3S,4S,5R)-5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-2-azido-4-hidroxi-2-hidroximetil-tetrahidro-furan-3-ílico del ácido pentanoico (**27**)

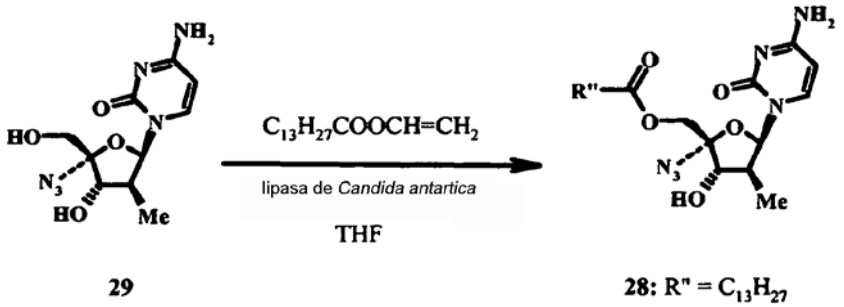


26 **27**

A una suspensión del éster de dipentanoato **26** (R" = n-C_4H_9, 1,9 g, 3,46 mmoles) en MTBE (13 ml) y tampón de fosfato (15 ml, fosfato sódico 5 mM y NaCl 0,1 M ajustado hasta pH de alrededor de 6,5) se añadió Lipolase® (alrededor de 2 ml) (lipasa de *Thermomyces Lanuginosus*, número de catálogo Sigma L 0777). La mezcla de reacción se calentó hasta 35ºC y se agitó durante 2 h. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 6,5 mediante adición de $NaHCO_3$. Después de 2 h, la reacción continuó hasta que se completó en un 8%. Se añadieron 2 ml más de Lipolase®, y la agitación se continuó durante 6 h, después de lo cual se añadió una alícuota adicional de 2 ml de la enzima, y la reacción se agitó durante 24 h más. A la disolución se añadió acetona (10 ml), MTBE (20 ml) y salmuera (10 ml), y la reacción se calentó a 50ºC. Las fases se separaron, y la fase orgánica se extrajo dos veces con MTBE caliente. Las fases orgánicas combinadas se lavaron dos veces con salmuera caliente, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron *a vacío*.

Ejemplo 4 de referencia

Éster (2R,3S,4S,5R)-5-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-2-azido-3-butiriloxi-4-metil-tetrahidro-furan-2-ilmet del ácido tetradecanoico (**28**).

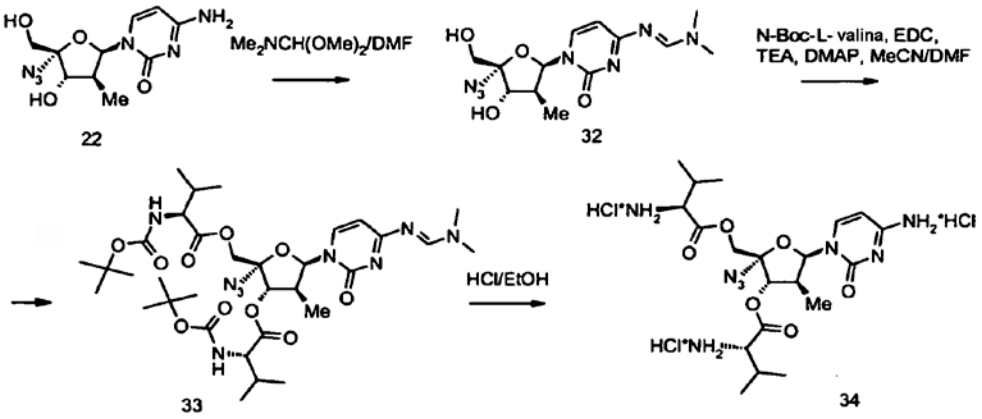


29 **28:** R" = $C_{13}H_{27}$

Una suspensión de **29** (1,0 g, 3,52 mmoles), miristato de vinilo (1,2 g, 4,57 mmoles), lipasa de *Candida antartica* inmovilizada sobre resina de poliacrilato (0,30 g; nº de catálogo de Sigma L4777 de Novosoma) y THF (20 ml) se calentó hasta 60ºC toda la noche. El análisis por HPLC indicó que la reacción se había completado alrededor de 33%, y se añadieron 2,4 ml más de miristato de vinilo y 0,3 g de lipasa. Después de 48 h más, la reacción se había completado en un 50%, y se añadieron 0,3 g más de enzima y 3 ml de miristato de vinilo. Después de aproximadamente 80 h (tiempo de reacción total), la conversión en el monoéster esta terminada. La mezcla de reacción bruta se filtró a través de CELITE®, y la almohadilla del filtro se lavó con THF. La fase orgánica combinada se evaporó. El residuo se disolvió en MeOH (50 ml) y se extrajo con hexano (2 x 20 ml). La disolución metanólica se evaporó, y el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con $NaHCO_3$ y la fase de EtOAc se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó, para dar 0,930 g de **28** (R" = $C_{13}H_{27}$) que se purificó por cromatografía sobre SiO_2 eluyendo con un gradiente de MeOH/DCM (MeOH del 0 al 10%).

Ejemplo 5 de referencia

3',5'-O-bis(L-valinil)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**34**)



N^4-[(Dimetilamino)metilen]-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**32**).

Una disolución de **22** (1,81 g, 6,42 mmoles) en DMF (30 ml) se trató con dimetilacetal de la dimetilformamida (8,2 ml, 61,73 mmoles) y se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La disolución se evaporó a presión reducida y se coevaporó con etanol. La cristalización en etanol/éter produjo el compuesto del título **32**.

3',5'-O-bis[*N*-(*terc*-Butoxicarbonil)-L-valinil]-N^4-[(dimetilamino)metilen]-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**33**).

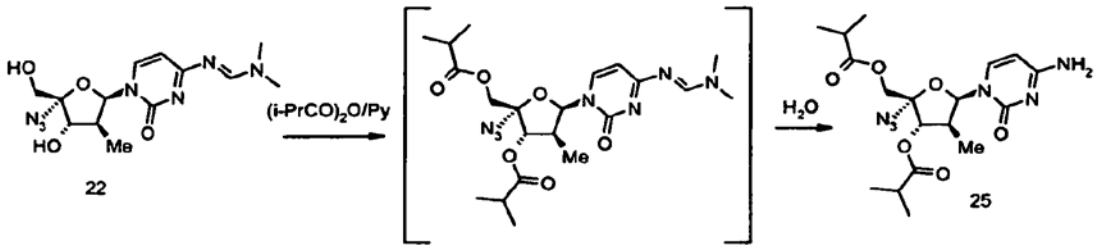
A una disolución de **32** (1,26 g, 3,74 mmoles) en una mezcla de acetonitrilo seco (30 ml) y DMF (15 ml) se añadió sucesivamente Boc-Val-OH (1,62 g, 7,48 mmoles), EDC (1,43 g, 7,48 mmoles), TEA (1,04 ml, 7,48 mmoles) y DMAP (0,1 g). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por HPLC, y la mezcla de reacción se recargó con Boc-Val-OH (0,63 g), EDC (0,72 g), TEA (0,52 ml) y DMAP (0,05 g). Después de que se consumió totalmente el material de partida, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se recogió en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (gradiente de 5-40% de EtOAc en hexano) dio el compuesto del título **33**.

3',5'-*O*-bis(L-valinil)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (sal de trihidrocloruro, **34**).

A una disolución concentrada de **33** (1,6 g, 2,17 mmoles) en EtOH se añadieron lentamente 13 ml de HCl 1 M en EtOH. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y se diluyó con éter. El precipitado se filtró y se lavó con éter para dar el compuesto del título **34** en forma de su sal de trihidrocloruro.

Ejemplo 6 de referencia

Preparación alternativa de 3',5'-O-bis(isobutiril)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina. (Éster (2R,3S,4S,5R)-2-(4-amino-2-oxo-2H-pirimidin-1-il)-2-isobutiriloximetil-4-metil-tetrahidrofurano-3-ílico del ácido isobutírico) (**25**).

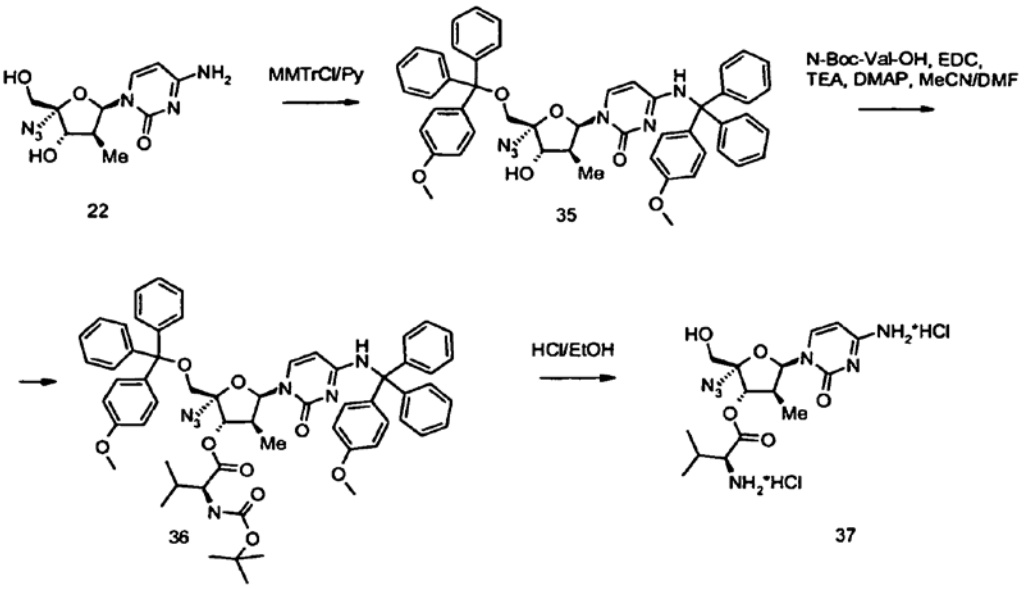


3',5'-O-bis(isobutiril)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**25**).

A una disolución de **22** (1,26 g, 3,74 mmoles) en piridina seca (25 ml) se añadió anhídrido isobutírico (1,77 g, 11,2 mmoles) a 0ºC. La reacción se siguió por HPLC y, cuando se terminó, se paralizó con agua para destruir el exceso de anhídrido isobutírico y eliminar la protección de N^4. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y se coevaporaron con etanol. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con $NaHCO_3$ y salmuera. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (gradiente de 10-40% de EtOAc en hexano) dio el compuesto del título **25**.

Ejemplo 7 de referencia

4'-Azido-3'-O-(L-valinil)-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**37**)



N^4,5'-O-bis(monometoxitritil)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**35**).

Una mezcla de **22** (2,82 g, 10 mmoles) y MMTrCl (9,15 g, 30 mmoles) en piridina (50 ml) se agitó toda la noche a 80ºC. Después de añadir MeOH (5 ml) y agitar durante otras 2 h, el disolvente se evaporó y el residuo se dividió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua, con salmuera, y se evaporó. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-5% MeOH en DCM) proporcionó el compuesto del título **35**.

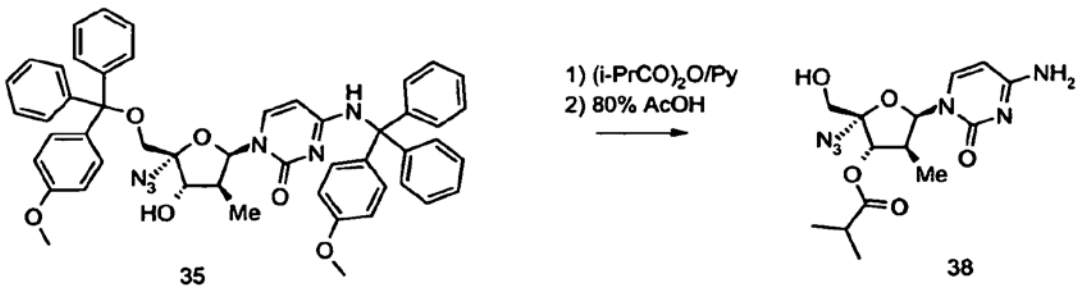
N^4,5'-O-bis(monometoxitritil)-4'-azido-3'-[*N*-(*terc*-butoxicarbonil)-L-valinil]-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**36**).

A una disolución de **35** (3,09 g, 3,74 mmoles) en una mezcla de acetonitrilo seco (30 ml) y DMF (15 ml) se añadieron sucesivamente Boc-Val-OH (0,81 g, 3,74 mmoles), EDC (0,72 g, 3,74 mmoles), TEA (0,52 ml, 3,74 mmoles) y DMAP (0,07 g). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por HPLC, y la mezcla de reacción se recargó con Boc-Val-OH (0,4 g), EDC (0,36 g), TEA (0,26 ml) y DMAP (0,04 g). Cuando el material de partida se consumió por completo, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se recogió en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (gradiente de 5-40% de EtOAc en hexano) dio el compuesto del título **36**.

4'-Azido-3'-O-(L-valinil)-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (sal de dihidrocloruro, **37**). A una disolución concentrada de **36** (2,4 g, 2,34 mmoles) en EtOH se añadieron lentamente 13 ml de HCl 1 M en EtOH. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente, y se diluyó con éter. El precipitado se filtró y se lavó con éter para dar el compuesto del título (**37**) como la sal de dihidrocloruro.

Ejemplo 8 de referencia

4'-Azido-3'-O-isobutiril-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**38**).



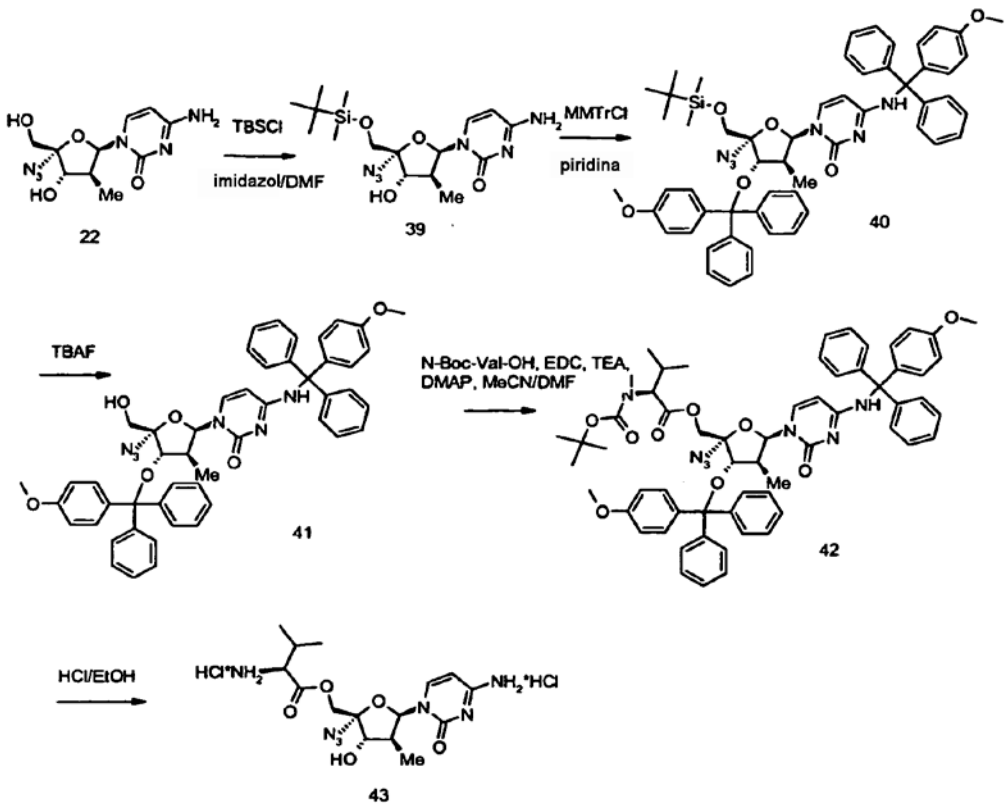
4'-Azido-3'-O-isobutiril-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**38**).

A una disolución de **35** (3,09 g, 3,74 mmoles) en piridina seca (25 ml) se añadió anhídrido isobutírico (0,89 g, 5,61 mmoles) a 0ºC. La reacción se siguió por HPLC y, cuando se completó, se paralizó con agua para destruir el exceso de anhídrido isobutírico. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y se coevaporaron con etanol. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con $NaHCO_3$, con salmuera, y se evaporó. El derivado de 3'-isobutirilo

protegido con MMTr bruto se disolvió en AcOH al 80% y se agitó a 50ºC hasta la desprotección completa de los grupos MMTr. El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-20% de MeOH en DCM) para dar el compuesto del título **38**.

Ejemplo 9 de referencia

5'-O-(L-valinil)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**43**)



5'-O-*t*-Butildimetilsilil-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**39**).

A una disolución de **22** (2,82 g, 10 mmoles) en DMF (5 ml) se añadió imidazol (1,02 g, 15 mmoles) y TBSCl (1,95 g, 13 mmoles). Cuando el material de parida se consumió, la mezcla de reacción se paralizó con MeOH (1 ml) y se dividió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y con salmuera, y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-20% de MeOH en DCM) para dar el compuesto del título **39**.

5'-O-*t*-Butildimetilsilil-4'-azido-N^4,3'-O-bis(monometoxitritil)-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**40**).

Una mezcla de **39** (3,7 g, 9,34 mmoles) y MMTrCl (8,63 g, 28 mmoles) en piridina seca (50 ml) se agitó toda la noche a 80ºC. Después de añadir MeOH (5 ml) y agitar durante otras 2 h, el disolvente se evaporó y el residuo se dividió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y con salmuera, y se evaporó. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-5% MeOH en DCM) dio el compuesto del título **40**.

4'-Azido-N^4,3'-O-bis(monometoxitritil)-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**41**).

Una disolución de **40** (5,3 g, 5,64 mmoles) en THF (20 ml) se trató con TBAF 1 M en THF (5,7 ml, 5,7 mmoles) y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua y con salmuera, y se evaporó. La cromatografía sobre gel de sílice (0-5% de acetato de etilo en $CHCl_3$) dio el compuesto del título **41**.

5-[*N*-*terc*-Butoxicarbonil)-L-valinil]-N^4,3'-O-bis(monometoxitritil)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**42**).

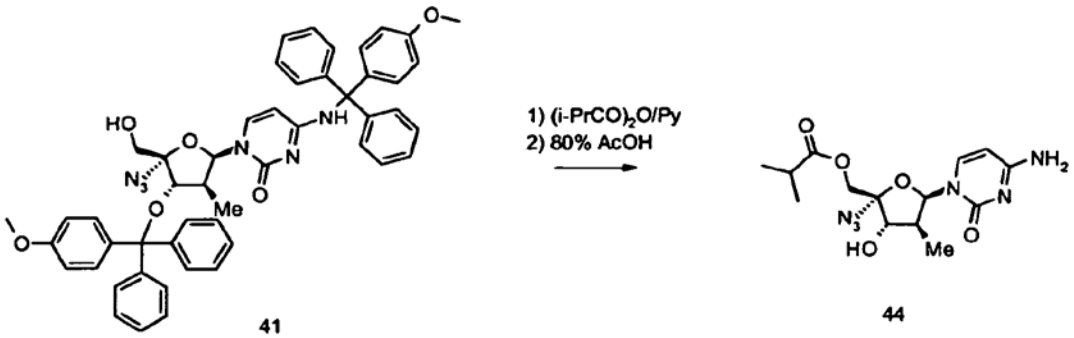
A una disolución de **41** (3,09 g, 3,74 mmoles) en una mezcla de acetonitrilo seco (30 ml) y DMF (15 ml) se añadieron sucesivamente Boc-Val-OH (0,81 g, 3,74 mmoles), EDC (0,72 g, 3,74 mmoles), TEA (0,52 ml, 3,74 mmoles) y DMAP (0,07 g). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por HPLC, y la mezcla de reacción se recargó con Boc-Val-OH (0,4 g), EDC (0,36 g), TEA (0,26 ml) y DMAP (0,04 g). Cuando el material de partida se consumió por completo, el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se recogió en

acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (gradiente de 5-40% de EtOAc en Hexano) dio el compuesto del título **42**.

5'-O-(L-valinil)-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (sal de dihidrocloruro, **43**). A una disolución concentrada de **42** (2,4 g, 2,34 mmoles) en EtOH se añadieron lentamente 13 ml de HCl 1 M en EtOH. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y se diluyó con éter. El precipitado se filtró y se lavó con éter para dar el compuesto del título **43** como la sal de dihidrocloruro.

Ejemplo 10 de referencia

5'-O-isobutiril -4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**44**)



5'-O-isobutiril-4'-azido-2'-β-C-metil-2'-desoxicitidina (**44**).

A una disolución de **41** (3,09 g, 3,74 mmoles) en piridina seca (25 ml) se añadió anhídrido isobutírico (0,89 g, 5,61 mmoles) a 0ºC. La reacción se siguió por HPLC, y cuando se completó se paralizó con agua para destruir el exceso de anhídrido isobutírico. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y se coevaporaron con etanol. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con $NaHCO_3$ y salmuera, y se evaporó. El derivado de 3'-isobutirilo protegido con MMTr bruto se disolvió en AcOH al 80% y se agitó a 50ºC hasta que se desprotegieron completamente los grupos MMTr. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-20% de MeOH en DCM) para dar el compuesto del título **44**.

Ejemplo 11 de referencia

Ensayo de luciferasa de *Renilla*

Este ensayo mide la capacidad de los compuestos de fórmula I para inhibir la replicación de ARN de VHC, y por lo tanto su utilidad potencial para el tratamiento de infecciones por VHC. El ensayo utiliza un informador como una lectura simple del nivel de ARN del replicón de VHC intracelular. El gen de la luciferasa de **Renilla** se introdujo en el marco de lectura abierto de un constructo de replicón NK5.1 (Krieger y col., J. Virol. 75:4614), inmediatamente después de la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), y se fusionó con el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII) a través de un péptido 2A de autoescisión del virus de la fiebre aftosa (Ryan y Drew, EMBO Vol 13:928-933). Después de la transcripción *in vitro*, el ARN se introdujo por electroporación en células Huh7 de hepatoma humano, y se aislaron y se expandieron colonias resistentes a G418. La línea celular seleccionada de forma estable 2209-23 contiene ARN subgenómico de VHC replicativo, y la actividad de la luciferasa de **Renilla** expresada por el replicón refleja su nivel de ARN en las células. El ensayo se llevó a cabo en placas duplicadas, una en blanco opaco y la otra en transparente, para medir la actividad antiviral y la citotoxicidad de un compuesto químico en paralelo, asegurándose de que la actividad observada no se debe a una reducción de la proliferación celular.

Se cultivaron células de replicón de VHC de luciferasa de **Renilla** (2209-23), cultivadas en MEM de Dulbecco (GibcoBRL, nº de cat. 31966-021) con suero bovino fetal al 5% (FCS, GibcoBRL, nº de cat. 10106-169), en una placa de 96 pocillos a 5000 células por pocillo, y se incubaron toda la noche. Veinticuatro horas después, se añadieron diferentes diluciones de compuestos químicos en el medio de crecimiento a las células, que después se incubaron adicionalmente a 37ºC durante tres días. Al final del tiempo de incubación, las células en placas blancas se recogieron, y se midió la actividad de luciferasa usando un sistema de ensayo de luciferasa dual (Promega, nº de cat. E1960). Todos los reactivos descritos en el párrafo siguiente se incluyeron en el kit del fabricante, y se siguieron las instrucciones del fabricante para las preparaciones de los reactivos. Las células se lavaron dos veces con 200 µl de disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,0) (PBS) por pocillo, y se lisaron con 25 µl de tampón de lisis pasivo 1x antes de la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron a cada pocillo 100 microlitros de reactivo LAR II. La placa se insertó después en el luminómetro de microplacas LB 96V (MicroLumatPIus, Berthold) y se inyectaron 100 µl de reactivo Stop & Glo® en cada pocillo, y la señal se midió usando un programa de medición de 10 segundos con un retraso de 2 segundos. El valor de CI_{50}, la concentración

del fármaco necesaria para reducir el nivel del replicón en un 50% con relación al valor de control de células no tratadas, puede calcularse a partir del gráfico del porcentaje de reducción de la actividad de luciferasa frente a la concentración de fármaco.

Para el ensayo de citotoxicidad, se usó reactivo WST-1 de Roche Diagnostic (nº de cat. 1644807). Se añadieron diez microlitros de reactivo WST-1 a cada pocillo, incluyendo los pocillos que contenían medio solo como blancos. Las células después se incubaron durante 1 a 1,5 horas a 37ºC, y el valor de DO se midió mediante un lector de placas de 96 pocillos a 450 nm (filtro de referencia a 650 nm). De nuevo, el valor de CC_{50}, la concentración del fármaco necesaria para reducir la proliferación celular en un 50% con relación al valor de control de células no tratadas, puede calcularse a partir del gráfico de la reducción en porcentaje del valor de WST-1 frente a la concentración de fármaco.

Ejemplo 12 de referencia

Ensayo de MT4/XTT

Los compuestos de la descripción también pueden ensayarse para determinar la actividad contra infecciones concomitantes. Por ejemplo, los individuos con riesgo de infecciones transmitidas a través de la sangre, tales como VHC, algunas veces se coinfectan con VIH.

Los compuestos pueden ensayarse para determinar la actividad del VIH, por ejemplo usando múltiples determinaciones con XTT en células MT-4 (Weislow y col., J Nat Cáncer Inst 1989, vol 81, nº 8, 577 y siguientes), preferentemente incluyendo determinaciones en presencia de suero humano al 40-50% para indicar la contribución de la unión de proteínas. En resumen, un ensayo de XTT típico usa la línea celular MT4 de linfocitos T humanos cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (o suero humano al 40-50%, según sea apropiado), penicilina y estreptomicina, sembradas en microplacas de 96 pocillos ($2 \cdot 10^4$ células/pocillo) infectadas con 10-20 $DICT_{50}$ (dosis infecciosa del 50% en cultivo de tejidos) por pocillo de virus VIH-1_{IIIB} (tipo salvaje) o de virus mutante, tales como los que poseen mutaciones RT Ile 100, Cys 181 o Asn 103. Se añaden compuestos de ensayo diluidos en serie a los pocillos respectivos, y el cultivo se incuba a 37ºC en una atmósfera enriquecida en CO_2, y se determina la viabilidad de las células en el día cinco o seis con colorante vital XTT. Los resultados se presentan típicamente como valor de DE_{50} μM. El compuesto del Ejemplo 1 de Referencia presenta un valor de DE_{50} de alrededor de 0,6 μM en un ensayo XTT.

Ejemplo 13 de referencia

Concentración de trifosfato intracelular y semivida

La supuesta especie activa de los compuestos de la descripción es trifosfato de β-D-2'-desoxi-2'-β-C-metil-4'-azidocitidina. La estabilidad del trifosfato se determina en hepatocitos primarios humanos frescos (CellzDirect o In Vitro Technologies), preincubados con el compuesto progenitor tritiado. Los hepatocitos se cultivan en placas de 6 pocillos revestidas de colágeno (BD Biosciences), típicamente a 1,5 millones de células/pocillo, usando medio completo que contiene suero (CellzDirect o In Vitro Technologies)/37ºC/5% de CO_2. Existen diversas cepas de hepatocitos, tales como Hu497, MHL-091806 y Hu504, y por lo tanto es útil ensayar dichas cepas en paralelo y calcular los valores medios a partir de una serie de cepas.

La preincubación se realiza típicamente durante 24 horas con 2 μM del compuesto progenitor tritiado a 10 μCi/ml. A t_0, la monocapa celular se lava con medio de cultivo celular para eliminar el compuesto progenitor extracelular, y los cultivos celulares se vuelven a incubar con medio de cultivo celular reciente. La concentración de trifosfato intracelular se cuantifica a diferentes puntos de tiempo hasta 72 horas. Son puntos de tiempo convenientes 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 horas con cultivos celulares por duplicado para cada punto de tiempo.

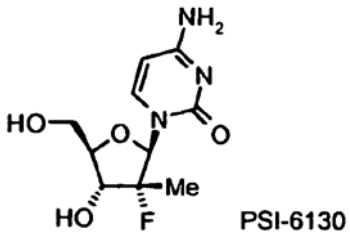
En el punto de tiempo apropiado, las células se recogen aspirando el medio de cultivo celular y lavando las células con PBS frío. Las células se raspan en un medio de extracción tal como 1 ml de metanol al 60% (v/v) enfriado previamente, y se extraen en metanol durante 24 h a -20ºC. Las muestras extraídas se centrifugan para retirar el desecho celular. El sobrenadante se retira a tubos limpios, se evapora y se almacena en nitrógeno líquido para el análisis. Los peletes secos de extracto celular se disuelven en agua y se nanofiltran (por ejemplo, dispositivo centrífugo nanosep, Pall Life Sciences). Antes del análisis de HPLC, a las muestras se les añaden patrones de referencia no marcados para el compuesto progenitor y sus formas de monofosfato, difosfato y trifosfato. Un sistema de HPLC típico emplea una HPLC de intercambio iónico con una columna Whatman Partisil 10SAX (4,6 x 250 mm) acoplada a un detector radiométrico (tal como β-RAM, IN/US Systems Inc). Una fase móvil convencional es un gradiente lineal del 0% de tampón acuoso al 100% de tampón de fosfato (por ejemplo, KH_2PO_4 0,5 M/KCI 0,8 M) a caudales tales como 1 ml/min. Para la detección de especies radiomarcadas en el β-RAM, puede usarse una relación 5:1 de FloScint IV o UltimaFloAP (Perkin Elmer) a eluyente de la columna. Los metabolitos progenitores e intracelulares se identifican por comparación de los tiempos de retención de la especie intracelular en el radiocromatograma con la retención de los patrones de referencia no radiactivos añadidos en las muestras de extracto celular, y se detectan por absorción UV, típicamente a 270 nm.

El transcurso de tiempo de la captación y la fosforilación se mide de una forma análoga, con lo que se incuban hepatocitos primarios humanos con compuesto tritiado de la invención, por ejemplo 2 μM y 10 μCi/ml. Un transcurso de tiempo adecuado es la adición a cultivos duplicados de compuesto a 72, 48, 24, 16, 6 y 1 hora antes de la recolección celular. Para determinar la respuesta a la dosis de la fosforilación de los compuestos de la invención, se incuban hepatocitos primarios humanos con compuesto de ensayo tritiado, por ejemplo a 0, 2, 10, 25, 50, 100 y 250 μM durante 24 horas. Las concentraciones finales se logran suplementando con compuesto de ensayo no radiomarcado. Se recogen cultivos de células por duplicado, generalmente después de 24 horas de incubación.

En dichos ensayos, la semivida media del trifosfato de los compuestos de la descripción fue de 21,4 horas (desviación estándar 4,22 horas). El nivel de trifosfato en estado estacionario a 24 horas a 2 μM es alrededor de 15 pM/millón de células. Usando 3 μl como el volumen medio de células parenquimatosas de hígado humano, esta concentración de trifosfato corresponde a un valor sustancialmente superior al valor de Ki del compuesto progenitor.

Una semivida de trifosfato prolongada y una concentración elevada implican que en las células infectadas por VHC estarán presentes concentraciones antiviralmente activas de las especies activas durante periodos de tiempo prolongados después de la dosificación. Esto significa a su vez que los niveles valle diurnos mínimos se mantendrán elevados incluso con la dosificación QD (una vez al día), minimizando de esta forma las oportunidades de una exposición subóptima al fármaco que dé como resultado el desarrollo de mutantes de escape del fármaco.

A diferencia de la semivida prolongada del trifosfato de los compuestos previos, la semivida del trifosfato del compuesto análogo 2'-β-C-metílico PSI-6130 (β-D-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-β-C-metilcitidina (representado más adelante) fue sólo de 4,7 horas, con una concentración de trifosfato en estado estacionario de 24 horas de únicamente 1,3 pM/millón de células.



PSI-6130

Ejemplo 14 de referencia

Las composiciones farmacéuticas de los compuestos descritos para administración por varias vías se prepararon como se describe en este Ejemplo.

Composición para Administración Oral (A)

Ingrediente	% p/p
Principio activo	20,0%
Lactosa	79,5%
Estearato de magnesio	0,5%

Los ingredientes se mezclan y se introducen en cápsulas que contienen alrededor de 500 a 1000 mg cada una.

Composición para Administración Oral (B)

Ingrediente	% p/p
Principio activo	20,0%
Estearato de magnesio	0,5%
Croscarmelosa sódica	2,0%
Lactosa	76,5%
PVP (polivinilpirrolidina)	1,0%

Los ingredientes se combinan y granulan usando un disolvente tal como metanol. La formulación se seca después y se conforma en comprimidos (que contienen alrededor de 20 mg de compuesto activo) con una máquina de comprimidos apropiada.

Composición para Administración Oral (C)

Ingrediente	% p/p
Compuesto activo	1,0 g
Ácido fumárico	0,5 g
Cloruro sódico	2,0 g
Metil parabeno	0,15 g
Propil parabeno	0,05 g
Azúcar granulado	25,5 g
Sorbitol (disolución al 70 %)	12,85 g
Veegum K (Vanderbilt Co.)	1,0 g
Saborisante	0,035 ml
Colorantes	0,5 mg
Agua destilada	c.s. hasta 100 ml

Los ingredientes se mezclan para formar una suspensión para administración oral.

Formulación Parenteral (D)

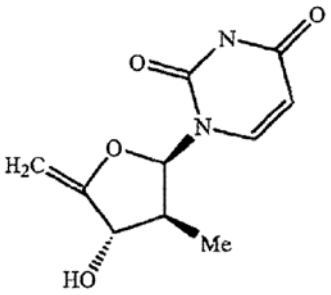
Ingrediente	% p/p
Ingrediente activo	0,25 g
Cloruro sódico	c.s. para hacer la disolución isotónica
Agua para inyección hasta	100 ml

El ingrediente activo se disuelve en una porcioón del agua para inyección. Después se añade una cantidad suficiente de cloruro sódico con agitación para hacer la disolución isotónica. La disolución se completa en peso con el resto del agua para inyección, se filtra a través de un filtro de membrana de 0,2 micrómetros y se envasa en condiciones estériles.

Formulación de Supositorio (E)

Ingrediente	% p/p
Ingrediente activo	1,0 %
Polietilenglicol 1000	74,5 %
Polietilenglicol 4000	24,5 %

Los ingredientes se funden juntos y se mezclan en un baño de vapor, y se vierten en moldes que contienen 2,5 g de peso total.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula I