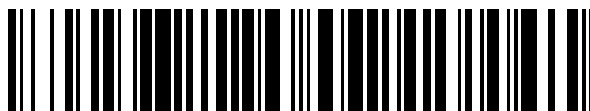


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 803**

51 Int. Cl.:

C07H 19/073 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2009 E 09008634 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2141172**

54 Título: **Agentes inhibidores de la ciclopropil polimerasa**

30 Prioridad:

01.07.2008 EP 08159396

08.12.2008 EP 08171005

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

27.02.2013

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:

JONCKERS, TIM HUGO MARIA;

RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD y

VANDYCK, KOEN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 396 803 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes inhibidores de la ciclopropil polimerasa

Campo técnico

5 Este invento se refiere a unos derivados de nucleósidos que son agentes inhibidores de los virus de la hepatitis C (VHC) así como a su uso en el tratamiento o la profilaxia de los VHC.

Antecedentes del invento

10 Un VHC es un virus de ARN de sentido positivo, de una sola hebra, que pertenece a la familia de virus *Flaviviridae* en el género de los hepacivirus. A continuación de una infección aguda inicial, una mayoría de los individuos infectados desarrollan una hepatitis crónica, puesto que el VHC se replica preferentemente en hepatocitos, pero no es directamente citopático. En particular, se manifiesta que la falta de una enérgica respuesta a los linfocitos T y la alta propensión del virus a mutarse favorecen una alta tasa de infecciones crónicas. Una hepatitis crónica puede progresar hasta convertirse en una fibrosis hepática, conduciendo a una cirrosis, una enfermedad del hígado en etapa terminal, y a un HCC (carcinoma hepatocelular), convirtiéndose en la causa principal de trasplantes de hígado.

15 Hay seis genotipos principales de los VHC y más de 50 subtipos, que están distribuidos geográficamente de una manera diferente. El genotipo 1 de los VHC es el genotipo predominante en Europa y en los Estados Unidos de América. La extensa heterogeneidad genética de los VHC tiene importantes implicaciones diagnósticas y clínicas, que explican posiblemente las dificultades en el desarrollo de vacunas y la limitada eficacia de la actual terapia.

20 La transmisión de los VHC puede producirse mediante contacto con una sangre contaminada o con productos sanguíneos contaminados, por ejemplo a continuación de una transfusión de sangre o de un uso de fármacos por vía intravenosa. La introducción de ensayos de diagnóstico usados para la exploración de una sangre ha conducido a una tendencia descendente en la incidencia de los VHC después de una transfusión. Sin embargo, la lenta progresión hasta la enfermedad hepática en etapa terminal, las infecciones existentes continuarán presentando una grave carga médica y económica durante un período de tiempo muy largo.

25 El actual patrón de cuidados contra los VHC está basado en un alfa interferón (IFN- α) (pegilado) en combinación con ribavirina. Esta terapia en combinación proporciona una respuesta virológica prolongada en aproximadamente un 50 % de los pacientes que están afectados con los VHC del genotipo 1 y aproximadamente un 80 % de los que están infectados con los genotipos 2 y 3. Junto a la limitada eficacia del genotipo 1 de los VHC, esta terapia en combinación tiene importantes efectos colaterales y es malamente tolerada en muchos pacientes. Los efectos colaterales principales incluyen síntomas similares a la influenza (gripe), anormalidades hematológicas y síntomas neuropsiquiátricos. Por lo tanto existe una necesidad de unos tratamientos más efectivos y convenientes y mejor tolerados.

35 La experiencia obtenida con los fármacos contra los VIH (virus de la deficiencia humana), en particular con agentes inhibidores de proteasas de los VIH ha enseñado que una farmacocinética inferior a la óptima y unos regímenes de dosificación complejos dan como resultado unos inadvertidos fallos de la capacidad de distensión (compliance). Esto a su vez significa que la concentración a lo largo de 24 horas (concentración mínima en plasma) para los respectivos fármacos en un régimen contra los VIH desciende frecuentemente por debajo del umbral de CI_{90} o DE_{90} durante grandes partes del día. Se considera un nivel mantenido a lo largo de 24 horas de por lo menos la CI_{50} , y de manera más realista, la CI_{90} o DE_{90} , es esencial para decelerar el desarrollo de mutantes de escape de fármacos. La consecución de la farmacocinética y del metabolismo de fármacos que se necesitan para permitir dichos niveles continuos proporciona un reto exigente para el diseño de fármacos.

45 La región NS5B de los poligenes de ARN codifica una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp), que es esencial para la replicación de los virus. Por lo tanto, esta enzima ha suscitado un importante interés entre los profesionales químicos medicinales. Se conocen agentes inhibidores de la NS5B que son tanto nucleósidos como no nucleósidos. Los agentes inhibidores que son nucleósidos pueden actuar o bien como un agente terminador de cadena o como un agente inhibidor competitivo, que interfiere con la fijación de nucleótidos a la polimerasa. Para funcionar como un agente terminador de cadena, el compuesto análogo a nucleósidos debe ser asimilado por la célula y convertido *in vivo* en un trifosfato. Esta conversión en el trifosfato es mediada corrientemente por unas cinasas celulares, que imparten requisitos estructurales adicionales a un potencial agente inhibidor de polimerasas que es un nucleósido. Además, esto limita la evaluación directa de ciertos nucleósidos como agentes inhibidores de la replicación de los VHC en ensayos basados en células, que son capaces de una fosforilación *in situ*.

55 Se han hecho varios intentos de desarrollar unos nucleósidos como agentes inhibidores de una RdRp de VHC pero mientras que una gran cantidad de compuestos han entrado en un desarrollo clínico, ninguno ha avanzado todo el camino hasta llegar a ser registrado. Entre los problemas con los que los nucleósidos dirigidos al VHC se han encontrado hasta la fecha, están los de toxicidad, mutagenicidad, falta de selectividad, mala eficacia, mala

biodisponibilidad, regímenes de dosificación inferiores a los óptimos y una consiguiente alta carga con píldoras, y el coste de los productos.

Varias patentes y solicitudes de patente así como publicaciones científicas describen unos compuestos análogos a nucleósidos que tienen una actividad inhibidora de los VHC. El documento de solicitud de patente internacional WO 2004/002999 describe unos profármacos de 2' y 3'-nucleósidos modificados para tratar infecciones causadas por los flaviviridae. El documento WO 2008/043704 describe la 4-amino-1-((2R,3S,4S,5R)-5-azido-4-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona y sus derivados ésteres como agentes inhibidores de la polimerasa de VHC. Murakami Eisuke y colaboradores en Antimicrobial Agents and Chemotherapy (agentes antimicrobianos y quimioterapia), American Society for Microbiology (Sociedad americana de microbiología), volumen 51, nº 2, páginas 503-509 (2007) describen la fosforilación y la inhibición de la polimerasa de NS5B de VHC efectuada por la β-D-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil citidina y algunos compuestos análogos. El documento WO2006/021341 describe unos 4'-azido-nucleósidos antivíricos como agentes inhibidores de la polimerasa de VHC. El documento WO02/100415 describe unos nucleósidos sustituidos en posición 4' para el tratamiento de enfermedades mediadas por los VHC. Ninguno de estos compuestos tiene un sustituyente 2'-espiro-ciclopropilo.

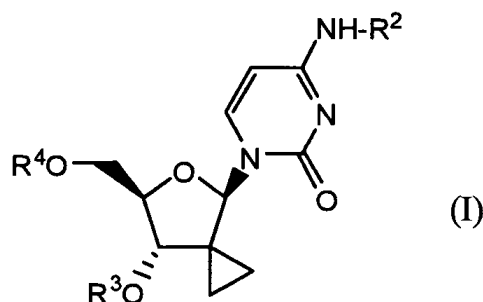
Existe una necesidad de agentes inhibidores de los VHC que puedan superar una o más de las desventajas de la actual terapia contra los VHC, tales como efectos colaterales, limitada eficacia, aparición de una resistencia y fallos de capacidad de distensión, así como que mejoren una respuesta prolongada de los virus.

El presente invento concierne a unas 4-amino-1-(7-hidroxi-6-hidroximetil-5-oxa-espiro[2,4]hept-4-il)-1H-pirimidin-2-onas inhibidoras de los VHC con útiles propiedades en lo que concierne a uno o más de los siguientes parámetros: eficacia antivírica, favorable perfil de desarrollo de resistencia, un perfil virológico favorable, un perfil toxicológico y genotológico favorable, y una farmacocinética y una farmacodinámica favorables, y una facilidad de formulación y administración. Uno de dichos compuestos, a saber el 4-amino-1-((4R,6R,7S)-7-hidroxi-6-hidroximetil-5-oxa-espiro[2,4]hept-4-il)-1H-pirimidin-2-ona, también citado como 2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil citidina, ha sido descrito en Can. J. Chem., volumen 71, páginas 413-416, pero no como un agente inhibidores de los VHC.

Los compuestos del invento pueden también ser atractivos debido al hecho de que ellos carecen de actividad contra otros virus, en particular contra los VIH. Los pacientes infectados con los VIH padecen con frecuencia de infecciones concomitantes tales como las causadas por los VHC. El tratamiento de dichos pacientes con un agente inhibidor de los VHC que también inhiba a los VIH puede conducir a la aparición de cepas de VIH resistentes.

Descripción del invento

En un aspecto, el presente invento proporciona unos compuestos que pueden ser representados por la fórmula I:



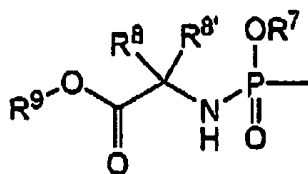
incluyendo a cualesquiera posibles estereoisómeros de los mismos, en donde:

R^2 es hidrógeno o alquilo de C_1-C_4 ;

R^3 y R^4 se seleccionan independientemente entre el conjunto que consiste en hidrógeno, $-C(=O)R^5$ y $-C(=O)CHR^6-NH_2$; o

R^3 es hidrógeno y R^4 es un éster monofosfato, difosfato o trifosfato;

o R^3 es hidrógeno, $-C(=O)CHR^5$ o $-C(=O)CHR^6-NH_2$ y R^4 es un grupo de fórmula



cada R^5 se selecciona independientemente entre el conjunto que consiste en hidrógeno, alquilo de C_1-C_6 , y cicloalquilo de C_3-C_7 ;

R^6 es hidrógeno; o alquilo C_1-C_6 ;

R^7 es fenilo, opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes, cada uno de los cuales está seleccionado independientemente entre halo, alquilo de C_1-C_6 , alquenilo de C_3-C_6 , alcoxi de C_1-C_6 , hidroxi y amino, o R^7 es naftilo; o R^7 es indolilo;

R^8 es hidrógeno, alquilo de C_1-C_6 o bencilo;

$R^{8'}$ es hidrógeno, alquilo de C_1-C_6 o bencilo; o

R^8 y $R^{8'}$ conjuntamente con el átomo de carbono al que ellos están unidos, forman un cicloalquilo de C_3-C_7 ;

R^9 es alquilo de C_1-C_6 , bencilo o fenilo, en donde dicho fenilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes, cada uno de los cuales está seleccionado independientemente entre hidroxi, alcoxi de C_1-C_6 , amino y mono- y di-alquil de C_1-C_6 -amino;

con la condición de que R^2 , R^3 y R^4 no han de ser todos ellos hidrógeno; o unas sales o unos solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En un aspecto adicional, el invento concierne al uso de unos compuestos de fórmula I, como aquí se especifica, incluyendo al compuesto de fórmula I en la que R^2 , R^3 y R^4 son todos ellos hidrógeno, para inhibir y tratar una infección causada por los VHC. Alternativamente, se proporciona el uso para la producción de un medicamento de un compuesto de fórmula I, tal como aquí se especifica, incluyendo al compuesto en el que R^2 , R^3 y R^4 son todos ellos hidrógeno, para inhibir y tratar una infección causada por los VHC.

El grupo $-NH-C(R^8)(R^{8'})-C(=O)-$ forma un residuo de aminoácido, que incluye residuos de aminoácidos naturales y no naturales. Presentan interés aquellos residuos de aminoácidos en los que $R^{8'}$ es hidrógeno. Cuando, en el último caso, R^8 es distinto de hidrógeno, la configuración del átomo de carbono asimétrico que es portador de un R^8 puede ser la de un L-aminoácido. Esta configuración puede ser también designada como la configuración S. Ejemplos de esto son alanina (Ala), es decir en donde R^8 es hidrógeno y $R^{8'}$ es metilo; o valina (Val), es decir en donde $R^{8'}$ es hidrógeno y R^8 es isopropilo; leucina (Leu) es decir en donde $R^{8'}$ es hidrógeno y R^8 es $-CH_2CH(CH_3)_2$; isoleucina (Ile) es decir en donde $R^{8'}$ es hidrógeno y R^8 es $-CH(CH_3)CH_2CH_3$; y fenilalanina (Phe) es decir en donde $R^{8'}$ es hidrógeno y R^8 es bencilo; en particular L-Ala, L-Val, L-Ile y L-Phe. Un ejemplo de un residuo de aminoácido en el que R^8 y $R^{8'}$, en común con el átomo de carbono con el que ellos están unidos, forman un cicloalquilo de C_3-C_7 , es decir un 1,1-ciclopropil-aminoácido. Cuando R^8 y $R^{8'}$ son ambos hidrógeno, el grupo $-NH-C(R^8)(R^{8'})-C(=O)-$ forma glicina (Gly).

El grupo $-C(=O)CHR^6-NH_2$ forma un éster de aminoácido, con un aminoácido que no tiene ninguna cadena lateral (R^6 es hidrógeno) o tiene una cadena lateral de alquilo de C_1-C_6 . Dichos aminoácidos comprenden glicina (R^6 es hidrógeno), valina (R^6 es isopropilo), leucina (R^6 es $-CH_2CH(CH_3)_2$ o isoleucina (R^6 es $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), en particular las formas L-estereoisoméricas H-L-Val-, H-L-Leu- o H-L-Ile-.

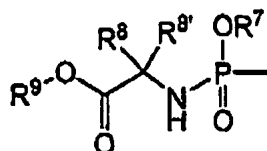
Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que R^2 es hidrógeno.

Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que R^3 es hidrógeno.

Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que R^4 es hidrógeno.

Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son aquellos compuestos de fórmula I, o subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que uno de los R^3 y R^4 es hidrógeno y el otro de los R^3 y R^4 se selecciona entre acetilo, pivaloilo y, preferiblemente, isobutirilo; o uno de los R^3 y R^4 es hidrógeno y el otro de los R^3 y R^4 se selecciona entre leucilo, isoleucilo y, preferiblemente, valilo; o ambos R^3 y R^4 se seleccionan entre acetilo, pivaloilo y, preferiblemente, isobutirilo; o ambos R^3 y R^4 se seleccionan entre leucilo, isoleucilo y, preferiblemente, valilo. En una forma de realización, R^3 es hidrógeno y R^4 es como se ha definido anteriormente. En otra forma de realización, R^4 es hidrógeno y R^3 es como se ha definido anteriormente. Unos subconjuntos particulares de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que R^3 y R^4 son ambos isobutirilo ($-C(=O)-CH(CH_3)_2$).

Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que R^3 es hidrógeno o $-C(=O)R^5$, y R^4 es un grupo de fórmula



Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que cada uno de los R^5 es alquilo de C_1-C_6 , en particular metilo, isopropilo (1-metil-etilo), isobutilo (2-metil-propilo) o sec-butilo (1-metil-propilo).

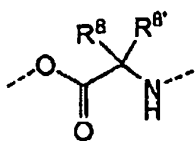
- 5 Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que R^6 es hidrógeno o alquilo de C_1-C_4 , en particular hidrógeno, metilo o isobutilo.

Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que:

- 10 (a) R^7 es fenilo, opcionalmente sustituido con 1 o 2 sustituyentes, cada uno de los cuales está seleccionado independientemente entre halo, alquilo de C_1-C_6 , alqueno de C_3-C_6 , alcoxi de C_1-C_6 , hidroxi y amino, o R^7 es naftilo; o R^7 es indolilo;
- (b) R^7 es fenilo, opcionalmente sustituido con halo, alquilo de C_1-C_6 , alqueno de C_3-C_6 o alcoxi de C_1-C_6 , o R^7 es naftilo;
- (c) R^7 es fenilo, opcionalmente sustituido con halo o alquilo de C_1-C_6 , o R^7 es naftilo;
- 15 (d) R^7 es fenilo, opcionalmente sustituido con halo.

En una forma de realización, el grupo indolilo en los compuestos de fórmula I o en cualquiera de los subconjuntos de los mismos es 5-indolilo.

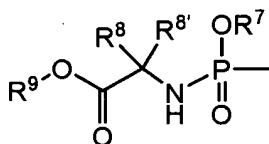
- 20 Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que R^8 es hidrógeno y $R^{8'}$ es metilo o alquilo de C_1-C_6 , tal como isopropilo o isobutilo. Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que el resto



es glicilo, alanilo o valilo (Gly, Ala, o Val; en particular Gly, L-Ala o L-Val).

Unos subconjuntos de compuestos de fórmula I son los compuestos de fórmula I, o los subconjuntos de compuestos de fórmula I, como aquí se ha definido, en los que

- 25 (a) R^9 es alquilo de C_1-C_6 o bencilo;
- (b) R^9 es alquilo de C_1-C_6 ;
- (c) R^9 es alquilo de C_1-C_4 ; o
- (d) R^9 es metilo, etilo o t-butilo.
- 30 Los compuestos de fórmula I tienen varios centros de quiralidad, en particular junto a los átomos de carbono 1', 3' y 4'. Aunque la estereoquímica junto a estos átomos de carbono es fija, los compuestos pueden presentar una pureza enantiomérica de por lo menos 75 %, preferiblemente de por lo menos 90 %, por ejemplo por encima de 95 %, junto a cada uno de los centros quirales. Una quiralidad puede estar también presente en los sustituyentes, tal como cuando R^3 y/o R^4 son $-C(=O)CHR^6-NH_2$, con R^6 distinto de hidrógeno; o tal como en el grupo



- 35 , que pueden tener una quiralidad junto al carbono portador de R^8 (cuando R^8 y $R^{8'}$ son diferentes) y junto al átomo de fósforo. El centro con fósforo puede estar presente como R_P o S_P , o una mezcla de dichos estereoisómeros, incluyendo los racematos. Pueden existir de igual manera unos diastereoisómeros que resultan del centro con fósforo quiral y un átomo de carbono quiral.

- 40 Unas formas de realización del invento conciernen al uso como agentes inhibidores de los VHC del compuesto denominado 2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil citidina (el compuesto de fórmula I en la que R^2 , R^3 y R^4 son todos ellos hidrógeno); o el compuesto denominado bis 3',5'-isobutiril-2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil citidina (el compuesto de fórmula I en la que R^2 es hidrógeno y R^3 y R^4 son ambos $-C(=O)R^5$ en donde R^5 es isopropilo); tanto en la forma libre como en la forma de una sal por adición de ácido o de un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; como agentes inhibidores de los VHC.

- 45 Una forma de realización concierne a los compuestos designados como compuestos 1, 2a, 2b, 2c, 2d, 3, 4, 5, 6 y 7, como se mencionan aquí seguidamente en la sección de ejemplos, en forma libre. Otra forma de realización

conciene a estos compuestos así como a las sales y los solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Una forma de realización particular concierte al compuesto bis 3',5'-isobutiril-2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil citidina en forma libre. Otra forma de realización particular adicional concierte a la bis 3',5'-isobutiril-2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil citidina, a las sales por adición de ácidos y a los solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas.

5 En un aspecto adicional, el invento proporciona un compuesto de fórmula I o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, destinado/a a usarse en el tratamiento o la profilaxia (o la producción de un medicamento destinado al tratamiento o a la profilaxia) de una infección causada por los VHC. Unos genotipos de los VHC representativos en el contexto del tratamiento o de la profilaxia de acuerdo con el invento incluyen el genotipo 1b (prevalente en Europa) o 1a (prevalente en América del Norte).

10 Los compuestos de fórmula I se representan como un estereoisómero definido. La configuración absoluta de dichos compuestos se puede determinar usando métodos conocidos en la especialidad tales como, por ejemplo, una difracción de rayos X o una RMN (resonancia magnética nuclear) y/o una implicación a partir de materiales de partida con una estereoquímica conocida. Unas composiciones farmacéuticas de acuerdo con el invento comprenderán de manera preferible unas formulaciones sustancialmente puras estereoisoméricamente del estereoisómero indicado.

15 Unas formas estereoisoméricas puras de los compuestos y de los compuestos intermedios que aquí se mencionan, se definen como isómeros sustancialmente libres de otras formas enantioméricas o diastereoisoméricas que tienen la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o compuestos intermedios. En particular, el término "puros estereoisoméricamente" concierte a compuestos o compuestos intermedios que tienen un exceso estereoisomérico de por lo menos 80 % (a saber, un mínimo de 90 % de un isómero y un máximo de 10 % de los otros isómeros posibles) hasta llegar a un exceso estereoisomérico de 100 % (es decir, 100 % de un isómero y nada del otro), más en particular a los compuestos o compuestos intermedios que tienen un exceso estereoisomérico de 90 % hasta de 100 %, incluso más en particular a los que tienen un exceso estereoisomérico de 94 % hasta de 100 % y de manera sumamente particular a los que tienen un exceso estereoisomérico de 97 % hasta de 100 %.

20 Los términos "puros enantioméricamente" y "puros diastereoisoméricamente" deberán entenderse de una manera similar, pero entonces tomando en cuenta el exceso enantiomérico y el exceso diastereoisomérico, respectivamente, de la mezcla en cuestión.

25 Unas formas estereoisoméricas puras de los compuestos y compuestos intermedios de este invento se pueden obtener mediante la aplicación de procedimientos conocidos en la especialidad. Por ejemplo, los enantiómeros se pueden separar de cada uno de los otros mediante la cristalización selectiva de sus sales diastereoisoméricas con ácidos o bases ópticamente activos/as. Ejemplos de los/las mismos/as son ácido tartárico, ácido di-benzoil-tartárico, ácido di-toluoil-tartárico y ácido canfo-sulfónico. Alternativamente, los enantiómeros pueden ser separados por técnicas cromatográficas usando unas fases estacionarias quirales. Dichas formas isoméricas puras estereoquímicamente se pueden derivar también de las formas isoméricas puras estereoquímicamente de los apropiados materiales de partida, con la condición de que la reacción se ha de realizar de una manera estereoespecífica. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto es sintetizado por unos métodos estereoespecíficos de preparación. Estos métodos emplearan ventajosamente unos materiales de partida enantioméricamente puros.

30 Los racematos diastereoisoméricos de los compuestos de fórmula I se pueden obtener por separado mediante métodos convencionales. Unos apropiados métodos de separación física, que se pueden emplear de manera ventajosa, son, por ejemplo, una cristalización selectiva y una cromatografía, p.ej. una cromatografía en columna.

35 Se pretende también que el presente invento incluya a todos los isótopos de átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masas. A modo general y sin ninguna limitación, los isótopos del hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los isótopos del carbono incluyen C-13 y C-14.

40 Las sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables comprenden las formas de sales por adición de ácidos y de bases no tóxicas, terapéuticamente activas, de los compuestos de fórmula I. Presentan interés las formas libres (es decir que no son sales) de los compuestos de fórmula I, o de cualquier subconjunto de compuestos de fórmula I aquí especificada. Como se usa en el presente contexto, el término "forma libre" se refiere a un compuesto de fórmula I que no está en la forma de una sal ni de un solvato.

45 Las sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables se pueden obtener de manera conveniente tratando la forma libre con un ácido apropiado. Unos ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos halogenados, p.ej. ácido clorhídrico o bromhídrico, los ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales, como por ejemplo, los ácidos acético, propiónico, hidroxiaacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir etanodioico), malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir ácido hidroxi-butanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico,

ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y otros similares. A la inversa, dichas formas de sales por adición de ácidos pueden ser convertidas en la forma libre por tratamiento con una base apropiada.

Los compuestos de fórmula I que contienen un protón de carácter ácido, pueden también ser convertidos en sus formas de sales por adición de metales o aminas farmacéuticamente aceptables por tratamiento de la forma libre con una apropiada base orgánica o inorgánica. Unas apropiadas formas de sales de bases comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalino térreos, p.ej. las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y otras similares, sales con bases orgánicas, p.ej. las sales de benzatina, de *N*-metil-D-glucamina, de hidrabramina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares. A la inversa, dichas formas de sales por adición de metales o aminas pueden ser convertidas en la forma libre por tratamiento con un ácido apropiado.

El término "solvatos" cubre a cualesquiera solvatos farmacéuticamente aceptables que son capaces de formar los compuestos de fórmula I así como las sales de los mismos. Tales solvatos son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos, p.ej. etanolatos, propanolatos, y similares.

Algunos de los compuestos de fórmula I pueden existir también en sus formas tautoméricas. Por ejemplo, unas formas tautoméricas de grupos de amidas (-C(=O)-NH-) son iminoalcoholes (-C(OH)=N-), que pueden resultar estabilizados en unos anillos con un carácter aromático. Se pretende que dichas formas, aunque no se indican explícitamente en las fórmulas estructurales que aquí se representan, sean incluidas dentro del alcance del presente invento.

Tal como se usa en el presente contexto, un "alquilo de C₁-C₄" como un conjunto o parte de un conjunto, define a unos radicales hidrocarbilo saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-1-propilo o 2-metil-2-propilo. Un "alquilo de C₁-C₆" abarca radicales alquilo de C₁-C₄ y los homólogos superiores de los mismos que tienen 5 ó 6 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 2-metil-1-butilo, 2-metil-1-pentilo, 2-etil-1-butilo, 3-metil-2-pentilo, y otros similares. Entre los alquilos de C₁-C₆ presenta interés un alquilo de C₁-C₄.

"Alcoxi de C₁-C₆" significa un radical -O-alquilo de C₁-C₆ en donde el alquilo de C₁-C₆ es como se ha definido anteriormente. Ejemplos de los alcoxi de C₁-C₆ son metoxi, etoxi, *n*-propoxi e isopropoxi.

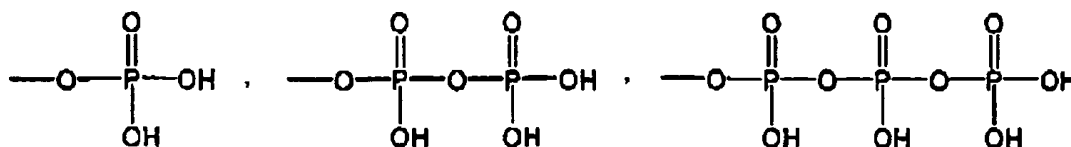
Un cicloalquilo de "C₃-C₇" incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Un subconjunto de éstos es un cicloalquilo de C₃-C₆. Tiene interés el ciclopropilo.

El término "alqueno de C₃-C₆" como un conjunto o parte de un conjunto, define a unos radicales hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen enlaces insaturados de carbono con carbono y por lo menos un doble enlace, y que tienen de 3 a 6 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, 1-propenilo, 2-propenilo (o alilo), 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-metil-2-propenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 2-metil-2-butenilo, 2-metil-2-pentenilo y otros similares. Presenta interés, entre los alquenos de C₃-C₆, un alqueno de C₃-C₄. Entre los alquenos de C₃-C₆ o alquenos de C₃-C₄ tienen interés los radicales que tienen un doble enlace.

El término "halo" es genérico para fluoro, cloro, bromo y yodo.

Tal como se usa en el presente contexto, el término "(=O)" u "oxo" forma un resto carbonilo cuando se une a un átomo de carbono. Deberá hacerse observar que un átomo solamente puede ser sustituido con un grupo oxo cuando la valencia de ese átomo así lo permite.

El término "éster monofosfato, difosfato o trifosfato" se refiere a grupos:

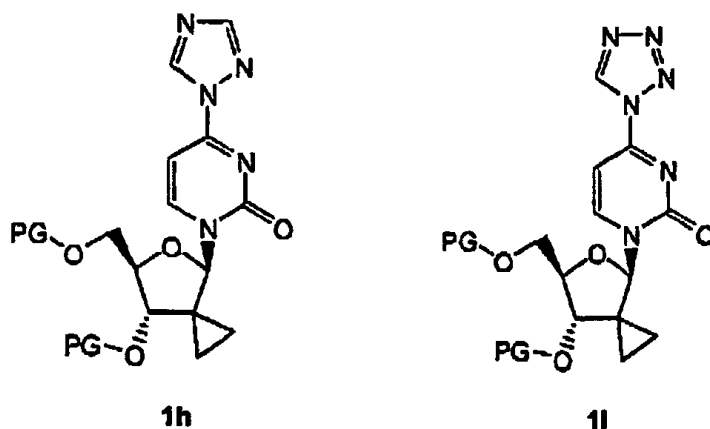


Como se usan en el presente contexto, las posiciones de radicales en cualquier resto molecular usado en las definiciones pueden estar en cualquier lugar en dicho resto, siempre y cuando que éste sea químicamente estable. Cuando está presente cualquier variable más de una vez en cualquier resto dado, cada definición de esta variable es independiente.

Cuando se usa en el presente contexto, se entiende que el término “compuestos de fórmula I” o “los presentes compuestos” o unos términos similares, incluyen a los compuestos de fórmula I, incluyendo a las posibles formas estereoquímicamente isoméricas, y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

Métodos de preparación

- 5 Los compuestos de fórmula I en los que R^3 y R^4 son ambos hidrógeno, aquí representados por la fórmula I-a, se pueden preparar por una reacción de conversión de uracilo en citosina a partir de una 2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil uridina **1f** para dar la correspondiente 2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil citidina **1g**, seguida por una eliminación de los grupos protectores PG proporcionando el deseado producto final I-a. Esta conversión de uracilo en citosina se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el derivado de uracilo con $POCl_3$ o un fósforo-dicloridato, tal como un fósforo-dicloridato de fenilo o fenilo sustituido, p.ej. el fósforo-dicloridato de 4-cloro-fenilo, y triazol o tetrazol. Esta reacción se puede llevar a cabo en el seno de un disolvente inerte para la reacción en la presencia de una base, por ejemplo un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, en la presencia de una amina terciaria tal como trietilamina. O bien, se puede usar también un disolvente de carácter básico tal como piridina. Si se desea, los resultantes derivados de triazol o tetrazol de fórmulas



- 15 se pueden aislar y purificar. El tratamiento de estos últimos con amoníaco o R^2-NH_2 proporciona el correspondiente derivado de citosina **1g**. La eliminación de los grupos PG conduce finalmente al deseado producto final I. Como se usa en el presente contexto, PG representa un grupo protector de hidroxilo, en particular uno de los grupos que se mencionan aquí seguidamente.

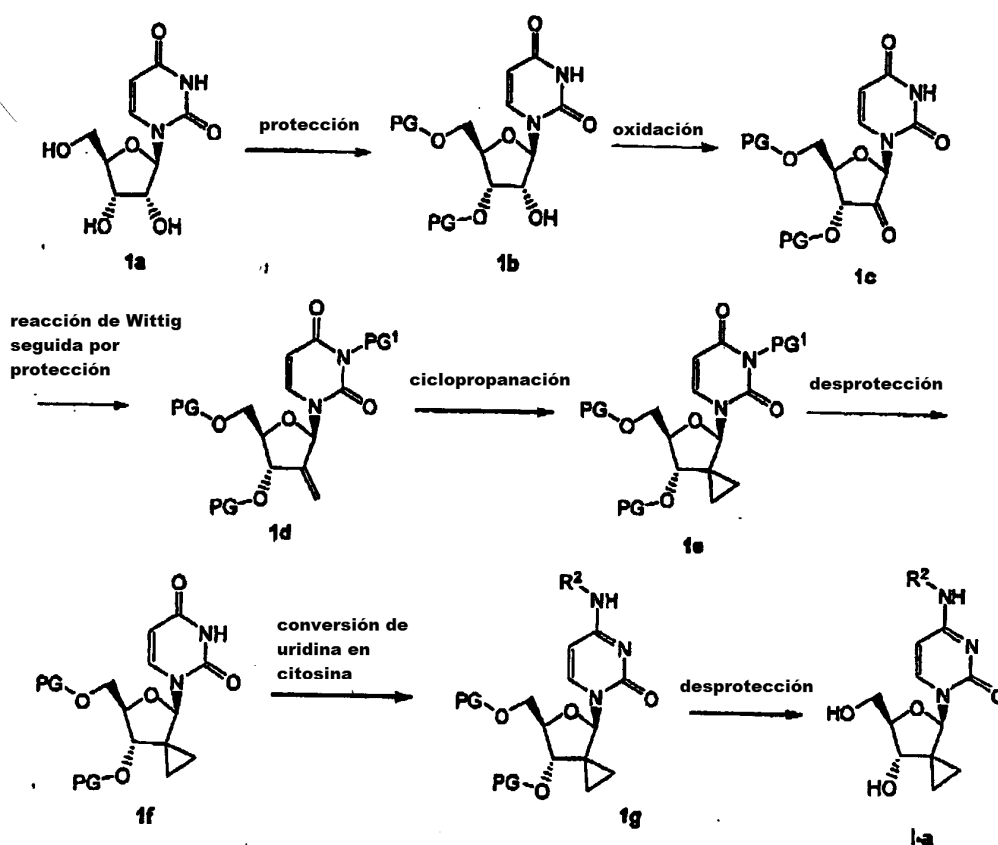
- 20 Los compuestos intermedios **1f**, usados en la conversión más arriba descrita, se obtienen mediante una reacción de formación del anillo de ciclopropano junto al doble enlace exo en compuestos intermedios **1d** y una subsiguiente eliminación del grupo protector de nitrógeno en compuestos intermedios **1e**. La formación del anillo de ciclopropano implica la reacción por adición de diazometano con el doble enlace exo, seguida por una transposición fotoquímica con la formación de un resto de ciclopropano y la expulsión de nitrógeno, preferiblemente en la presencia de un agente fotosensibilizador tal como benzofenona. Estas reacciones se realizan preferiblemente en el seno de disolventes inertes para la reacción, por ejemplo la reacción con diazometano se puede realizar en el seno de un éter tal como dietil-éter y la transposición fotoquímica se puede realizar en el seno de un hidrocarburo aromático tal como benceno o tolueno, o en el seno de un disolvente dipolar aprótico dipolar tal como acetonitrilo, o mezclas de los mismos.
- 25 Los compuestos intermedios **1d** se obtienen mediante una reacción de Wittig a partir de unos compuestos intermedios **1c**. En esta reacción, los últimos se hacen reaccionar con un halogenuro de metil-trifenil-fosfonio, preferiblemente el cloruro o bromuro, en un disolvente inerte para la reacción tal como un éter, p.ej. dietil-éter o tetrahidrofurano. Los compuestos intermedios **1c**, a su vez, se derivan mediante una reacción de oxidación del grupo 2'-hidroxilo en compuestos intermedios **1b**, por ejemplo con trióxido de cromo en la presencia de anhídrido de ácido acético en piridina. Una protección selectiva de los grupos hidroxilo en las posiciones 4' y 5' en el compuesto **1a** proporciona los compuestos intermedios **1b**.
- 30
- 35

- Con el fin de evitar reacciones secundarias, los grupos 4' y 5'-hidroxilo son protegidos preferiblemente con grupos protectores de hidroxilo PG y la función amino (NH) en el resto de uracilo es protegida con un grupo protector de amino PG¹. Los grupos protectores de hidroxilo PG pueden ser diferentes o iguales, o combinados forman un grupo protector cíclico. Un PG, por ejemplo, es un grupo trialquil-sililo tal como trimetil-sililo (TMS), *tert*-butil-dimetil-sililo (TBDMS) o triisopropil-sililo (TIPS). O bien, los dos grupos PG combinados forman un grupo disiloxano-1,3-diilo polialquilado tal como tetraisopropil-disiloxano-1,3-diilo (TIPDS). Estos grupos pueden ser eliminados mediante un
- 40

ácido o un ion de fluoruro (tal como NaF o fluoruro de tetra-n-butil-amonio - TBAF). Otro grupo protector de hidrógeno, que puede ser también un grupo protector de amino, es el grupo tritilo o un grupo tritilo sustituido, p.ej. 4-metoxi-tritilo ((4-metoxi-fenil)(bis-fenil)metilo), que se elimina en condiciones ácidas, p.ej. por tratamiento con una mezcla de etanol y HCl, o con ácido acético.

- 5 El grupo protector de amino PG¹ se selecciona de manera tal que sea disociable selectivamente hacia los grupos PG. Un grupo protector de amino que se puede usar es un grupo benzoílo. Otro de tales grupos es el grupo dimetilamino metileno, que se puede introducir usando el dimetil-acetal de dimetil-formamida. El grupo dimetilamino metileno se elimina en condiciones ácidas, p.ej. por tratamiento con una mezcla de etanol y HCl.

Las reacciones antes descritas son ilustradas en el siguiente esquema de reacciones.

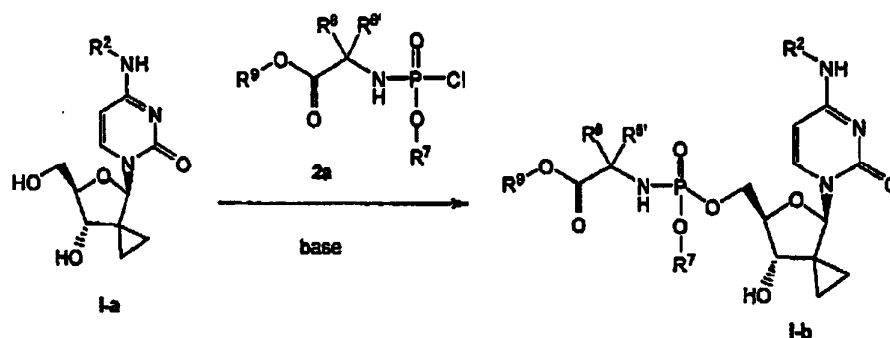


10

Esquema 1: Síntesis general de 2'-desoxi-2'-espiro-ciclopropil citidinas

Los compuestos de fórmula **1-a** a su vez pueden ser convertidos en fósforo-amidatos, tal como se bosqueja en el siguiente esquema de reacción. Los compuestos **1-a** se hacen reaccionar con un fósforo-cloridato **2a** en la presencia de una base proporcionando los fósforo-amidatos **1b**. Unos disolventes que se pueden usar en esta reacción comprenden éteres, p.ej. dietil-éter o THF, o piridina, o mezclas de estos compuestos. Se puede añadir una base, tal como N-metil-imidazol para capturar el ácido que se forma durante la reacción.

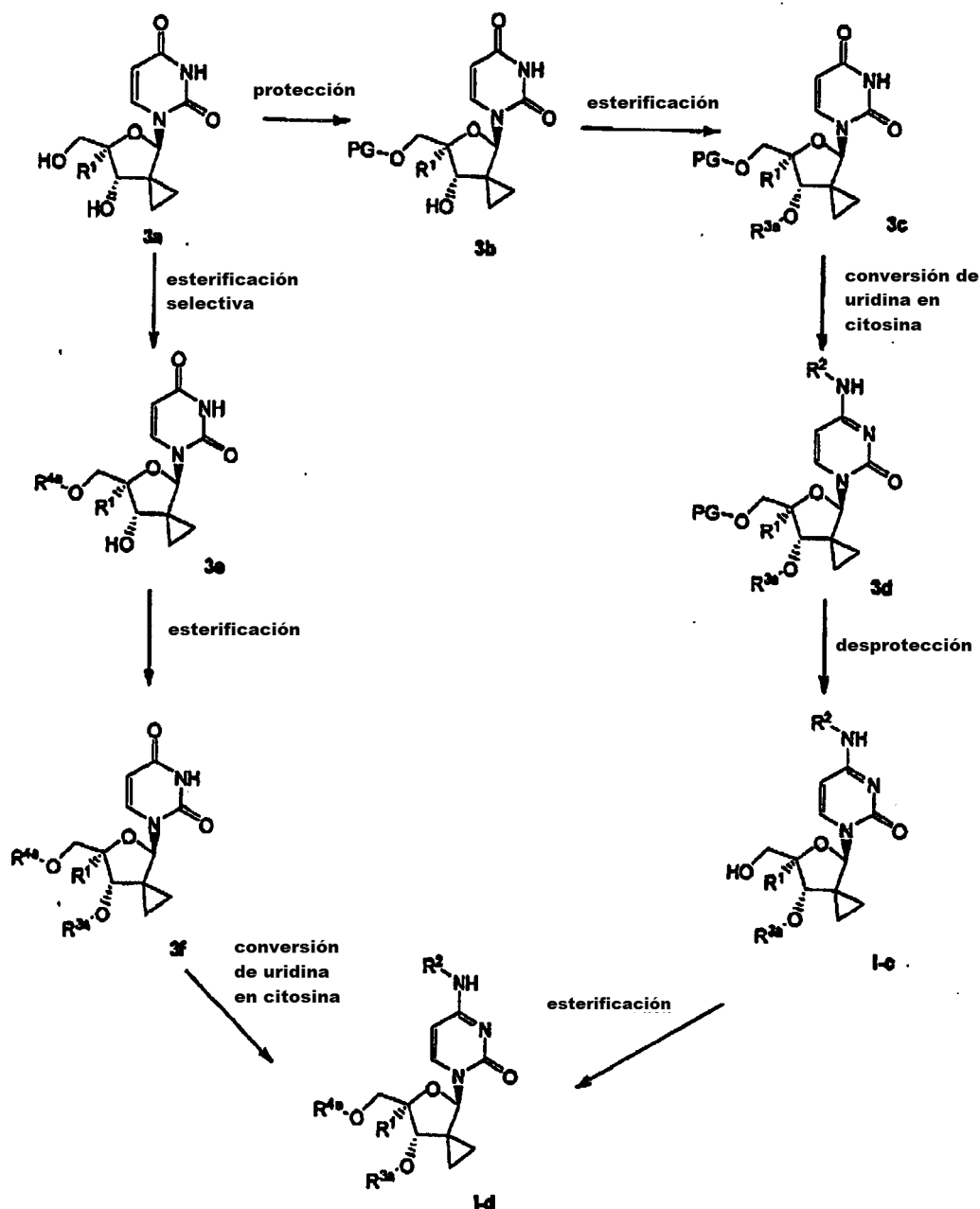
15



Esquema 2: Método general para la síntesis de fósforo-amidatos

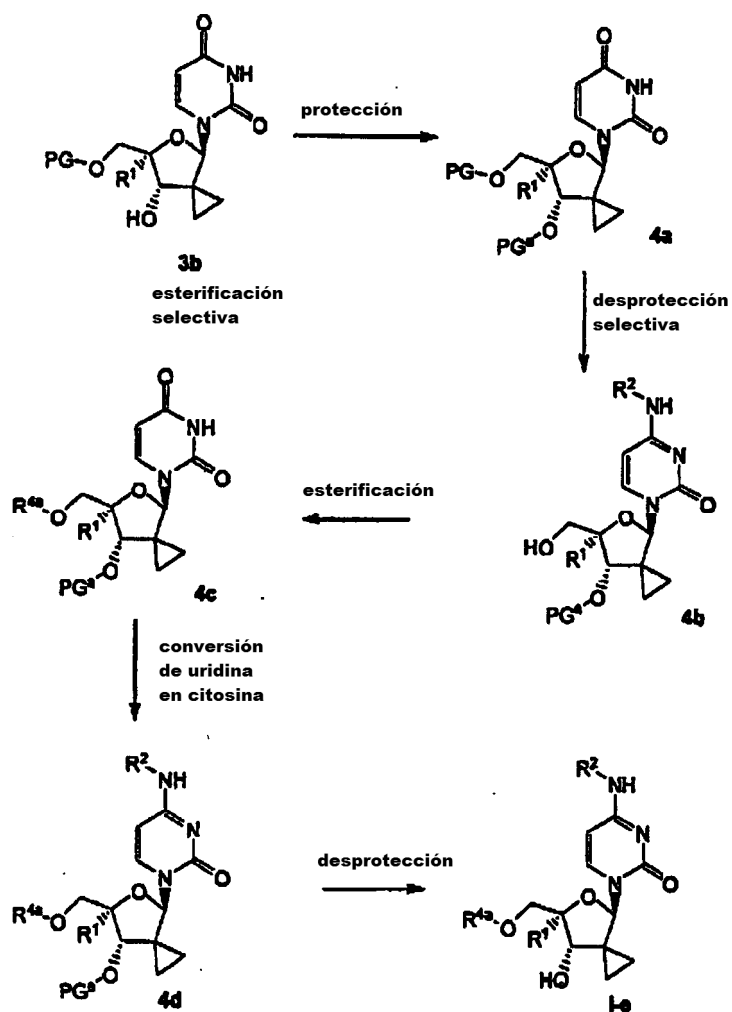
La síntesis de los mono- o di-ésteres de **1a** se describe en el Esquema 3 dado seguidamente. En este esquema R^{3a} y R^{4a} son independientemente $-C(=O)R^5$ o $-C(=O)CHR^6-NH_2$, o en particular R^{3a} y R^{4a} son independientemente $-C(=O)R^5$. Cuando R^{3a} y R^{4a} son independientemente $-C(=O)CHR^6-NH_2$, el amino en el último grupo es preferiblemente protegido por un grupo protector de amino, tal como cualquiera de los grupos protectores de amino PG^1 que antes se han descrito, y este grupo puede ser representado por $-C(=O)CHR^6-NH-PG^1$. El grupo protector de amino puede ser eliminado usando las apropiadas condiciones de reacción para la eliminación de dicho grupo. Por ejemplo PG^1 puede ser un grupo BOC y se puede eliminar en condiciones ácidas. El grupo protector de amino se puede eliminar en cualquier etapa cuando el grupo amino libre ya no pueda interferir con subsiguientes etapas de reacción, pero usualmente se elimina en la última etapa.

El grupo 5'-hidroxi más reactivo en el compuesto intermedio **3a** puede ser protegido selectivamente como en el compuesto intermedio **3b**, que a su vez es esterificado para dar el compuesto **3c**, seguido por una conversión de uracilo en citosina para dar el compuesto **3d**. Este último es desprotegido proporcionando el 3'-monoéster **1c**. Una esterificación del 5'-hidroxi en **1c** proporciona el producto final **1d**. El 5'-hidroxi más reactivo puede ser esterificado selectivamente introduciendo un grupo R^4 para proporcionar el compuesto **3e**, y el resultante compuesto intermedio 5'-éster puede subsiguientemente ser esterificado con un ácido diferente, introduciendo de esta manera un grupo R^{3a} , que es como más arriba se ha definido. Estas reacciones de esterificación proporcionan unos compuestos intermedios di-ésteres **3f**, que son sometidos a una conversión de uracilo en citosina, para proporcionar los productos finales **1d**. La conversión de uracilo en citosina se realiza usando los procedimientos más arriba descritos para la preparación de un compuesto intermedio **1g**.



Esquema 3: Síntesis de mono- y di-ésteres

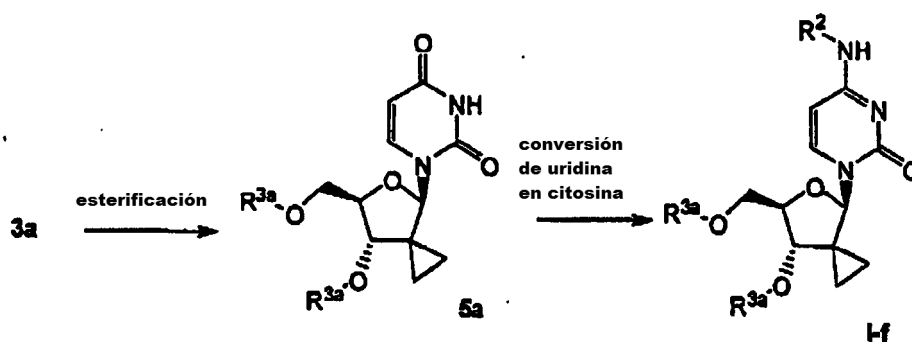
Los compuestos de fórmula I en la que R^{3a} es hidrógeno y R^{4a} es un éster como más arriba se ha especificado, estando representados dichos compuestos por I-e, se pueden preparar protegiendo el hidroxilo libre en un compuesto intermedio **3b** con un grupo protector de hidroxilo que es disociable selectivamente hacia el otro grupo protector de hidroxilo dando como resultado los compuestos intermedios **4a**. La siguiente etapa implica luego la eliminación del grupo protector de 5'-hidroxilo que proporciona los compuestos intermedios **4b**, seguida por una reacción de esterificación para dar los compuestos intermedios **4c**. Una subsiguiente conversión de uracilo en citosina proporciona los correspondientes derivados de citidina protegidos en 4'-hidroxilo **4d**, que son desprotegidos para proporcionar los derivados **I-e** sustituidos en 5', sin sustituir en 4'. Estas reacciones son representadas en el Esquema 4, en donde el grupo PG^a tiene el mismo significado que PG, pero se selecciona de manera tal que PG sea disociable selectivamente hacia el grupo PG^a . Por ejemplo PG puede ser un grupo tritilo o 4-metoxi-tritilo y PG^a puede ser un grupo trialquil-sililo tal como trimetil-sililo o t.-butil-dimetil-sililo



Esquema 4: Síntesis de monoésteres

Los compuestos de fórmula I en la que R^{3a} y R^{4a} son los mismos grupos ésteres, representados aquí posteriormente por 1-f, pueden ser preparados a partir de los compuestos 3a esterificando ambos grupos hidroxilo con el mismo ácido carboxílico

5



Esquema 5: síntesis de di-ésteres

Los materiales de partida 3a se pueden preparar eliminando los grupos protectores de hidroxilo PG en compuestos intermedios 1f, que pueden ser preparados tal como se ha ilustrado anteriormente en el Esquema 1.

Los términos “grupo protector de amino” o “grupo protector de N” incluyen unos grupos acilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butil-acetilo, 2-cloro-acetilo, 2-bromo-acetilo, trifluoro-acetilo, tricloro-acetilo, ftalilo, o-nitro-fenoxi-acetilo, α -cloro-butililo, benzoilo, 4-cloro-benzoilo, 4-bromo-benzoilo, 4-nitro-benzoilo, y similares; grupos sulfonilo tales como benceno-sulfonilo, p-tolueno-sulfonilo, y similares; grupos formadores de carbamatos tales como benciloxycarbonilo, p-cloro-benciloxycarbonilo, p-metoxi-benciloxycarbonilo, p-nitro-benciloxycarbonilo, 2-nitro-benciloxycarbonilo, p-bromo-benciloxycarbonilo, 3,4-dimetoxi-benciloxycarbonilo, 4-metoxi-benciloxycarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxi-benciloxycarbonilo, 3,4,5-trimetoxi-benciloxycarbonilo, 1-(p-bifenil)-1-metil-etoxycarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxi-benciloxycarbonilo, benzhidriloxycarbonilo, t-butoxi-carbonilo, diisopropil-metoxycarbonilo, isopropiloxycarbonilo, etoxycarbonilo, metoxycarbonilo, aliloxycarbonilo, 2,2,2-tricloro-etoxycarbonilo, fenoxycarbonilo, 4-nitro-fenoxycarbonilo, fluorenil-9-metoxycarbonilo, ciclopentiloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo, ciclohexiloxycarbonilo, feniltiocarbonilo y similares; unos grupos alquilo tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo y similares; y unos grupos sililo tales como trimetil-sililo y similares.

Los grupos protectores de hidroxilo incluyen éteres tales como éteres metílicos, éteres metílicos sustituidos tales como metoximetilo, metiltiommetilo, benciloximetilo, t-butoximetilo, 2-metoxi-etoximetilo y similares; éteres silílicos tales como trimetil-sililo (TMS), t-butil-dimetil-sililo (TBDMS), tribencil-sililo, trifenil-sililo, t-butil-difenil-sililo, triisopropil-sililo y similares; éteres etílicos sustituidos tales como 1-etoximetilo, 1-metil-1-metoxietilo; t-butilo, alilo, bencilo, p-metoxi-bencilo, difenilmetilo, tritilo y similares. Unos grupos ésteres protectores de hidroxilo incluyen unos ésteres tales como formiato, bencil-formiato, cloroacetato, metoxiacetato, fenoxiacetato, pivaloato, adamantato, mesitoato, benzoato y similares.

En un aspecto adicional, el presente invento concierne a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, tal como se especifica aquí, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una cantidad terapéuticamente eficaz en este contexto es una cantidad suficiente para actuar de una manera profiláctica contra, o para estabilizar o reducir una infección vírica, particularmente una infección vírica causada por los VHC, en individuos infectados o en individuos que están en riesgo de resultar infectados. En todavía un aspecto adicional, este invento se refiere a un procedimiento de preparar una composición farmacéutica tal como se especifica aquí, que comprende mezclar íntimamente un vehículo farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, tal como se especifica aquí.

Los compuestos del presente invento o cualquier subconjunto de los mismos se pueden formular como diversas formas farmacéuticas para finalidades de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las composiciones usualmente empleadas para administrar fármacos por vía sistémica. Para preparar las composiciones farmacéuticas de este invento, una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de una sal por adición o de un complejo con metales, como el ingrediente activo, es combinada en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuyo vehículo puede adoptar una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en una forma de dosificación unitaria apropiada, particularmente, para una administración por vía oral, rectal, percutánea, o por inyección parenteral. Por ejemplo, al preparar las composiciones en una forma de dosificación por vía oral, se pueden emplear cualesquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares, en el caso de formulaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o unos vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, agentes aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y tabletas. A causa de su facilidad en administración, las tabletas y las cápsulas representan las formas de unidades de dosificación por vía oral más ventajosas, en cuyo caso se emplean evidentemente unos vehículos farmacéuticos sólidos. Para unas composiciones parenterales, el vehículo comprenderá usualmente agua estéril, por lo menos en una gran parte, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo, para ayudar a la solubilidad. Se pueden preparar, por ejemplo, unas soluciones inyectables en las que el vehículo comprende una solución salina, una solución de glucosa o una mezcla de una solución salina y una solución de glucosa. Se pueden preparar también unas suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear unos apropiados vehículos líquidos, agentes suspendedores y similares. También se incluyen unas formulaciones en forma sólida destinadas a ser convertidas, brevemente antes del uso, en unas formulaciones en forma líquida. En las composiciones apropiadas para administración por vía percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente intensificador de la penetración y/o un apropiado agente humectante, opcionalmente combinados con aditivos apropiados de cualquier naturaleza en unas proporciones minoritarias, cuyos aditivos no introducen ningún efecto perjudicial significativo sobre la piel. Los compuestos del presente invento se pueden administrar también por medio de una inhalación o insuflación oral en la forma de una solución, una suspensión o un polvo seco usando cualquier sistema de suministro conocido en la especialidad.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas antes mencionadas en una forma de dosificación unitaria para obtener facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Una forma de dosificación unitaria, como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un ingrediente activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de dichas formas de dosificación unitarias son tabletas (incluyendo tabletas ranuradas o revestidas), cápsulas, píldoras, supositorios,

paquetes de polvos, obleas, soluciones o suspensiones inyectables y similares, y múltiples segregados de las mismas.

Los compuestos de fórmula I muestran una actividad contra los VHC y se pueden usar en el tratamiento y la profilaxia de una infección causada por los VHC o enfermedades asociadas con los VHC. Estas últimas incluyen fibrosis, inflamación y necrosis hepáticas progresivas que conducen a una cirrosis, una enfermedad hepática de etapa terminal, y un HCC. Los compuestos de este invento, además, pueden ser activos contra cepas mutadas de VHC. Adicionalmente, los compuestos de este invento pueden mostrar un favorable perfil farmacocinético y pueden tener unas atractivas propiedades en términos de biodisponibilidad, incluyendo una semivida, un AUC (área bajo la curva) y unos valores de pico aceptables, y carecen de fenómenos desfavorables tales como un comienzo rápido insuficiente y una retención en tejidos.

Los compuestos del invento son también atractivos debido a su baja toxicidad y a su favorable índice de selectividad tal como se puede demostrar, por ejemplo, en un ensayo de toxicidad celular. Los compuestos del invento carecen además de actividad contra otros virus, en particular contra los VIH. El uso de fármacos con un efecto antivírico doble o múltiple en pacientes concomitantemente infectados, puede conducir a una dosificación inferior a la óptima contra los otros virus, lo cual a su vez puede conducir a la aparición de cepas víricas resistentes.

La actividad antivírica *in vitro* contra los VHC de los compuestos de fórmula I se puede ensayar en un sistema de replicones de VHC celulares basándose en lo descrito por Lohmann y colaboradores (1999) Science 285:110-113, con las modificaciones adicionales descritas por Krieger y colaboradores (2001) Journal of Virology 75: 4614-4624, que se ejemplifica adicionalmente en la sección de ejemplos. Este modelo, aunque no es un modelo de infección completa para los VHC, está ampliamente aceptado como el modelo más robusto y eficiente de replicación autónoma de ARN de VHC, actualmente disponible. Se apreciará que es importante distinguir entre unos compuestos que interfieren específicamente con funciones de los VHC con respecto de los que ejercen efectos citotóxicos o citostáticos en el modelo de replicones de VHC, y como consecuencia causan una disminución en la concentración del ARN de VHC o de enzimas reporteras engarzadas. Se conocen en el sector unos ensayos para la evaluación de la citotoxicidad celular basados, por ejemplo, en la actividad de enzimas mitocondriales usando unos tintes redox fluorogénicos tales como resazurina. Además, existen sistemas celulares de cribado inverso para la evaluación de una inhibición no selectiva de la actividad de genes reporteros engarzados, tales como la luciferasa de luciérnaga. Unos apropiados tipos de células pueden ser equipados por transfección estable con un gen reportero de luciferasa, cuya expresión es dependiente de un promotor génico activo constitutivamente, y dichas células se pueden usar como un sistema de cribado inverso para eliminar agentes inhibidores no selectivos.

Debido a sus propiedades antivíricas, particularmente sus propiedades anti-VHC, los compuestos de fórmula I, incluyendo cualesquiera posibles estereoisómeros, las sales por adición o los solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles en el tratamiento de animales de sangre caliente, en particular de seres humanos. Infectados con los VHC, y para la profilaxia de infecciones causadas por los VHC en animales de sangre caliente, en particular seres humanos.

Los compuestos del presente invento se pueden usar, por lo tanto, como una medicina, en particular como una medicina anti-VHC o como una medicina inhibidora de los VHC. El presente invento se refiere también al uso de los compuestos en la producción de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de una infección causada por los VHC. Dicho uso como una medicina comprende la administración por vía sistémica a individuos infectados por los VHC, o a individuos que son susceptibles a una infección causada por los VHC, de una cantidad de un compuesto de fórmula I, tal como se especifica aquí, que es efectiva para combatir a las condiciones asociadas con una infección causada por los VHC.

En general, se considera que una cantidad diaria efectiva antivíricamente estaría entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 700 mg/kg, o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 400 mg/kg, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 250 mg/kg, o entre aproximadamente 2 y aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida en forma de dos, tres, cuatro o más sub-dosis en intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas sub-dosis se pueden formular como formas de dosificación unitaria, que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000 mg, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 3.000 mg, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 mg, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mg de un ingrediente activo por cada forma de dosificación unitaria.

El invento se refiere también a una combinación de un compuesto de fórmula I, de una sal o de un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y de otro compuesto antivírico, en particular otro compuesto anti-VHC. El término "combinación" se puede relacionar con un producto que contiene (a) un compuesto de fórmula I, como más arriba se ha especificado, y (b) opcionalmente otro compuesto anti-VHC, como una formulación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de infecciones causadas por los VHC.

Los compuestos anti-VHC que se pueden usar en tales combinaciones incluyen agentes inhibidores de la polimerasa de VHC, agentes inhibidores de proteasas de VHC, agentes inhibidores de otras dianas en el ciclo de vida de los VHC, y unos agentes inmunomoduladores, y combinaciones de los mismos. Los agentes inhibidores de polimerasas de VHC incluyen NM283 (valopicitabina), R803, JTK-109, JTK-003, HCV-371, HCV-086, HCV-796 y R-1479, R-7128, MK-0608, VCH-759, PF-868554, GS9190, XTL-2125, NM-107, GSK625433, R-1626, BILB-1941, ANA-598, IDX-184, IDX-375, MK-3281, MK-1220, ABT-333, PSI-7851, PSI-6130, VCH-916. Los agentes Inhibidores de proteasas de VHC (agentes inhibidores de NS2-NS3 y agentes inhibidores de NS3-NS4A) incluyen BILN-2061, VX-950 (telaprevir), GS-9132 (ACH-806), SCH-503034 (boceprevir), TMC435350 (también citado como TMC435), TMC493706, ITMN-191, MK-7009, BI-12202, BILN-2065, BI-201335, BMS-605339, R-7227, VX-500, BMS650032, VBY-376, VX-813, SCH-6, PHX-1766, ACH-1625, IDX-136, IDX-316. Un ejemplo de un agente inhibidor de la NS5A de VHC es BMS790052, y A-831, A-689, NIM-811 y DEBIO-025 son ejemplos de agentes inhibidores de la ciclofilina de NS5B.

Los agentes inhibidores de otras dianas en el ciclo de vida de los VHC, que incluyen la helicasa de NS3; agentes inhibidores de metalo-proteasas; agentes inhibidores de oligonucleótidos antisentido, tales como ISIS-14803 y AVI-4065; siARN's tales como SIRPLEX-140-N; ARN de horquilla corta codificado por un vector (shARN); ADNzimas; ribozimas específicas para los VHC, tales como heptazima, RPI,13919; inhibidores de la entrada tales como HepeX-C, HuMax-HepC; agentes inhibidores de alfa glucosidasas tales como, UT-231B y similares; KPE-02003002; y BIVN 401.

Los agentes inmunomoduladores incluyen compuestos de isoformas de interferón naturales y recombinantes, incluyendo α -interferón, β -interferón, γ -interferón y ω -interferón, tales como Intron A®, Roferon-A®, Canferon-A300®, Advaferon®, Infergen®, Humoferon®, Sumiferon MP®, Alfaferone®, IFN-beta®, y Feron®; compuestos de interferón derivatizados con poli(etilen glicoles) (pegilados), tales como PEG interferón- α -2a (Pegasys®), PEG interferón- α -2b (PEG-Intron®), y IFN- α -conl pegilado; formulaciones de acción prolongada y derivatizaciones de compuestos de interferón, tales como el interferón fusionado con albúmina albuferón α ; compuestos que estimulan la síntesis de interferón en células tales como resiquimod; interleucinas; compuestos que intensifican el desarrollo de una respuesta a células T cooperantes del tipo 1, tales como SCV-07; agentes agonistas de receptores similares a TOLL tales como CpG-10101 (actilón), y isatoribina; timosina α -1; ANA-245; ANA-246; dihidrocloruro de histamina; propagermanio; tetraclorodecaóxido; ampligén; IMP-321; KRN-7000; anticuerpos, tales como XTL-6865; y vacunas profilácticas y terapéuticas tales como InnoVac C y VHC E1E2/MF59.

Otros agentes antivíricos incluyen ribavirina, amantadina, viramidina, nitazoxanida; telbivudina; NOV-205; taribavirina; agentes inhibidores de la entrada en ribosomas internos; agentes inhibidores víricos de amplio espectro, tales como agentes inhibidores de IMPDH, y ácido micofenólico y derivados del mismo, y que incluyen, pero no se limitan a, VX-497 (merimepodib), VX-148, y/o VX-944); o combinaciones de cualesquiera de los anteriores.

Unos agentes particulares destinados a usarse en dichas combinaciones incluyen interferón- α (IFN- α), interferón- α pegilado o ribavirina, así como agentes terapéuticos basados en anticuerpos dirigidos contra epítomos de los VHC, ARN interferente pequeño (Si ARN), ribozimas, ADNzimas, ARN antisentido, agentes antagonistas de moléculas pequeñas de, por ejemplo, una proteasa de NS3, una helicasa de NS3 y una polimerasa de NS5B.

En otro aspecto, se proporcionan unas combinaciones de un compuesto de fórmula I, tal como se especifica aquí, y de un compuesto anti-VIH. Los últimos son preferiblemente aquellos agentes inhibidores de VIH que tienen un efecto positivo sobre el metabolismo y/o una farmacocinética de fármacos que mejoran la biodisponibilidad. Un ejemplo de dicho agente inhibidor de VIH es ritonavir. Como tal, este invento proporciona además una combinación que comprende (a) un compuesto de fórmula I o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y (b) ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto ritonavir, sus sales farmacéuticamente aceptables y unos métodos para su preparación se describen en el documento WO 94/14436. El documento de los EE.UU. US 6.037.157, y las referencias citadas en él; el documento US 5.484.801, el documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 08/402.690, los documentos WO 95/07696 y WO 95/09614 describen unas formas de dosificación preferidas del ritonavir.

El invento concierne también a un procedimiento para preparar una combinación tal como aquí se describe, que comprende la etapa de combinar un compuesto de fórmula I, tal como más arriba se ha especificado, y otro agente, tal como un agente antivírico, incluyendo un agente anti-VHC o anti-VIH, en particular los que más arriba se han mencionado.

Dichas combinaciones pueden encontrar uso en la producción de un medicamento destinado al tratamiento de una infección causada por los VHC en un mamífero infectado con ellos, comprendiendo dicha combinación en particular un compuesto de fórmula I, tal como más arriba se ha especificado, e interferón- α (IFN- α), interferón- α pegilado o ribavirina. O bien, el invento proporciona un método de tratar a un mamífero, en particular a un ser humano, infectado con los VHC, que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad eficaz de una combinación como aquí se especifica. En particular, dicho tratamiento comprende la administración por vía sistémica

de dicha combinación, y una cantidad eficaz es aquella cantidad que es eficaz para tratar las condiciones clínicas asociadas con una infección causada por los VHC.

En una forma de realización, las combinaciones antes mencionadas son formuladas en la forma de una composición farmacéutica que incluye los ingredientes activos más arriba descritos y un vehículo, como se ha descrito más arriba. Cada uno de los ingredientes activos se puede formular por separado y las formulaciones se pueden administrar concomitantemente, o se puede proporcionar una formulación que contenga a ambos y, si se desearan, otros ingredientes activos. En el primero de los casos, las combinaciones se pueden formular también como una formulación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en una terapia contra los VHC. Dicha composición puede adoptar cualquiera de las formas más arriba descritas. En una forma de realización, ambos ingredientes son formulados en una forma de dosificación tal como una combinación de dosificación fija. En una forma particular de realización, el presente invento proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, incluyendo una posible forma estereoisomérica del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (c) un vehículo.

Los componentes individuales de las combinaciones del presente invento se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el curso de una terapia, o concurrentemente en formas en combinación divididas o únicas. Se entiende que el presente invento abarca todos dichos regímenes de tratamiento simultáneo o alternante, y el término "administrar" se ha de interpretar de una manera correspondiente. En una forma de realización preferida, las formas de dosificación separadas son administradas simultáneamente.

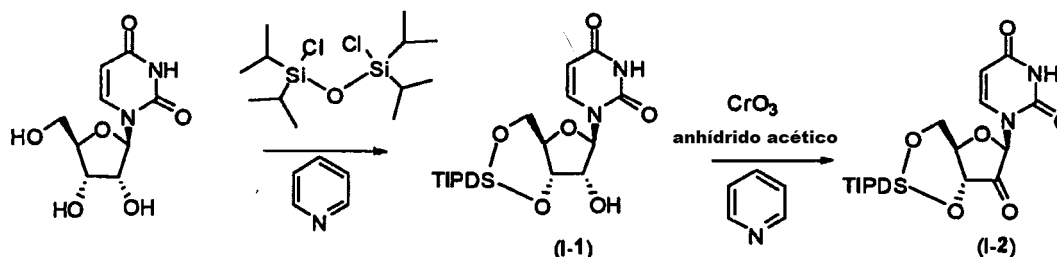
En una forma de realización, las combinaciones del presente invento contienen una cantidad de ritonavir, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es suficiente para mejorar clínicamente la biodisponibilidad del compuesto de fórmula I con relación a la biodisponibilidad cuando dicho compuesto de fórmula I se administra a solas. O bien, las combinaciones del presente invento contienen una cantidad de ritonavir, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es suficiente para aumentar por lo menos una de las variables farmacocinéticas del compuesto de fórmula I, seleccionadas entre $t_{1/2}$, C_{min} , C_{max} , C_{ss} , el AUC a las 12 horas, o el AUC a las 24 horas, en relación con dicha por lo menos una variable farmacocinética cuando el compuesto de fórmula I se administra a solas.

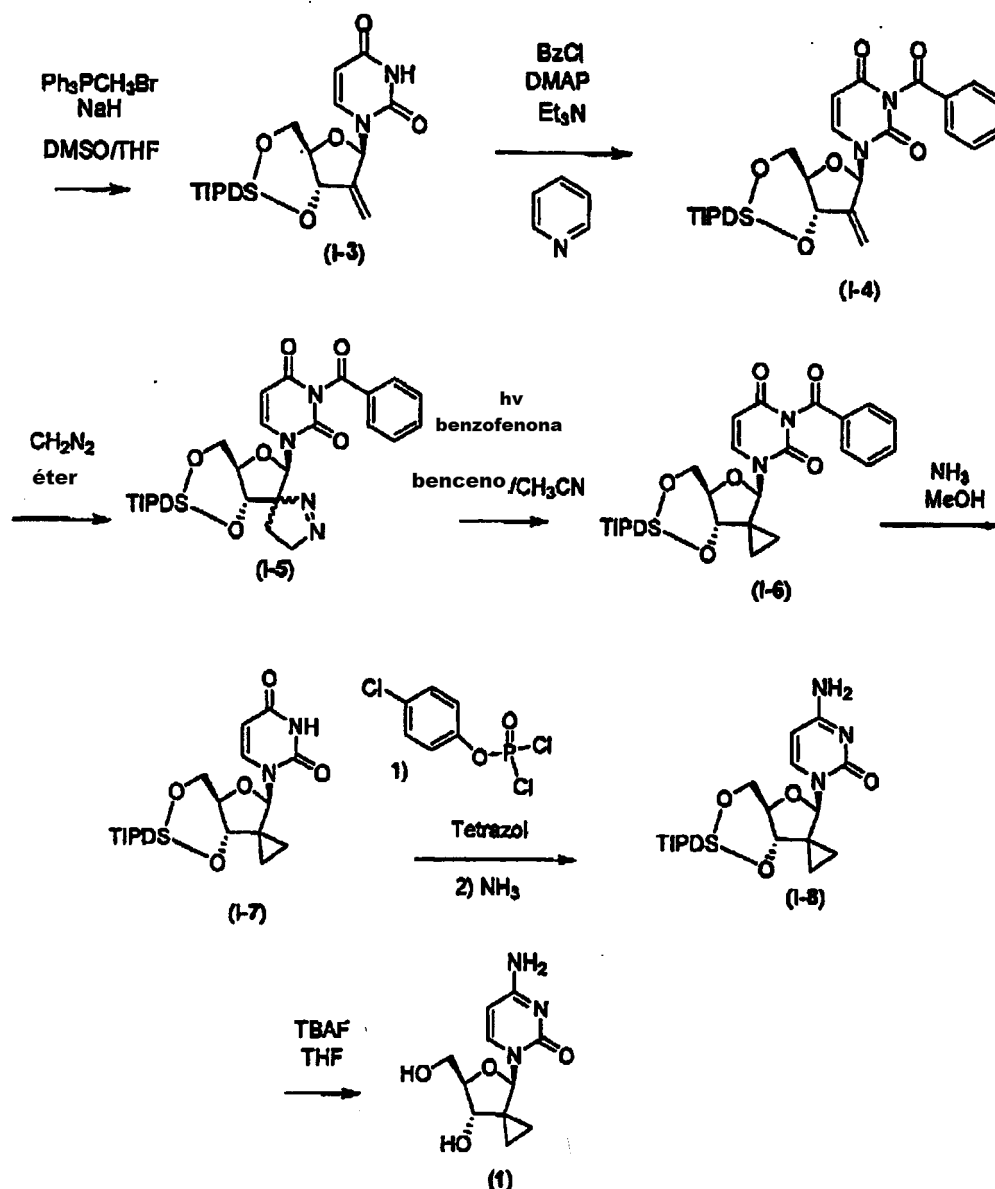
Las combinaciones de este invento se pueden administrar a seres humanos en unos intervalos de dosificación que son específicos para cada componente comprendido en dichas combinaciones, p.ej. el compuesto de fórmula I como más arriba se especifica, y ritonavir o una sal farmacéuticamente aceptable, pueden tener unos niveles de dosificación situados en el intervalo de 0,02 a 5,0 g/día. La relación ponderal del compuesto de fórmula I al ritonavir puede estar situada en el intervalo de desde aproximadamente 30:1 hasta aproximadamente 1:15, o desde aproximadamente 15:1 hasta aproximadamente 1:10, o desde aproximadamente 15:1 hasta aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 3:1 hasta aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 2:1 hasta 1:1. El compuesto de fórmula I y el ritonavir se pueden administrar concomitantemente una vez o dos veces por día, preferiblemente por vía oral, en donde la cantidad del compuesto de fórmula I por dosis es como más arriba se ha descrito, y la cantidad de ritonavir por dosis es de desde 1 hasta aproximadamente 2.500 mg, o desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 1.500 mg, o desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 800 mg, o desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 400 mg, o desde 40 hasta aproximadamente 100 mg de ritonavir.

Ejemplos

En los siguientes Ejemplos, los nombres de los compuestos fueron generados por el programa lógico Chemdraw Ultra®, Cambridgesoft, versión 9.0.7.

Ejemplo 1: 4-Amino-1-(7-hidroxi-6-hidroximetil-5-oxa-espiro[2.4]hept-4-il)-1H-pirimidin-2-ona (1)





Etapla 1: 1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-hidroxi-2,2,4,4-tetraisopropil-6a,8,9,9a-tetrahidro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]-trioxadisilocin-8-il)-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**I-1**)

- 5 Una mezcla de D-uridina (20 g) y de 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano (1,018 eq.) en piridina (300 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante 64 horas. La piridina se eliminó en vacío (30°C). El residuo se disolvió renovadamente en 100 ml de CH_2Cl_2 , se lavó con agua (3x75 ml), se secó con MgSO_4 anhidro y se filtró. El material filtrado se evaporó hasta sequedad y se usó tal como estaba en la siguiente reacción. LC-MS [cromatografía de fase líquida - espectro de masas]: Rt: 3,16 min, m/z: 487 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

- 10 **Etapla 2:** 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-tetraisopropil-9-oxotetrahidro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**I-2**)

- 15 El compuesto intermedio **I-1** (19,93 g) se disolvió en 200 ml de CH_2Cl_2 , se añadieron piridina (1 eq.) y anhídrido de ácido acético (2,91 eq.) seguidos por CrO_3 (2,75 eq.). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente y después de 30 minutos se observó un suave reflujo. Después de haber agitado durante 90 minutos, el LC-MS indicó que se había formado el producto de reacción **I-2** (50 %) y se había dejado el material de partida **I-1** (50 %). Una agitación adicional durante 2 horas dio como resultado que había quedado 55 % del producto **I-2** y 45 % del **I-1**. Se añadieron otros 10 ml de piridina, 5 ml de anhídrido de ácido acético y 5 gramos de CrO_3 y la mezcla se agitó adicionalmente a la temperatura ambiente durante una noche. El LC-MS indicó poco progreso. La solución de color pardo oscuro se

vertió en 1.300 ml de acetato de etilo y el residuo se filtró a través de una almohadilla de dicalite. El precipitado se lavó con una cantidad adicional de acetato de etilo. Los materiales filtrados combinados se evaporaron hasta sequedad. El compuesto intermedio **I-2** se purificó por una cromatografía en columna usando un gradiente de desde CH_2Cl_2 hasta una mezcla 1:1 de CH_2Cl_2 y acetato de etilo. La cromatografía de capa fina (TLC) indicó dos manchas. Por lo tanto, el compuesto intermedio **I-2** se volvió a purificar por una cromatografía en columna usando un gradiente de desde heptano hasta una mezcla 7:3 de heptano y acetona. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y evaporaron dando como resultado 8,5 gramos de un material sólido de color blanco (**I-2**). LC-MS: Rt: 3,31 min, m/z: 485 (M+H)⁺, nota: se observa también el hidrato de la cetona: LC-MS: Rt: 3,20 min, m/z: 503 (M+H)⁺.

Etapas 3: 1-((6aR,8R,9aS)-2,2,4,4-tetraisopropil-9-metilenetetrahydro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-il)-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**I-3**)

Se suspendió NaH (0,897 g) en 15 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) seco, y se calentó a 65°C durante 1,5 horas bajo Ar. Se añadió bromuro de metil-trifenil-fosfonio (12,84 g) con agitación, seguido por 30 ml de DMSO seco y 15 ml de tetrahydrofurano (THF) seco. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se formó una mezcla de colores amarillo y anaranjado. Luego, el compuesto intermedio **I-2** (6,97 g), disuelto en 20 ml de THF seco, se añadió gota a gota a través de una jeringa, y el conjunto se agitó durante 1,5 horas a la temperatura ambiente y luego a 50°C durante 1 hora. Luego la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente. El precipitado se separó por filtración sobre un tapón de dicalite, el material filtrado se concentró (para eliminar el THF) y el residuo se repartió entre CHCl_3 y agua (300 ml de cada). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se volvió a extraer con CHCl_3 . Las capas combinadas se filtraron sobre un tapón de dicalite y se concentraron. El producto se purificó por una cromatografía en columna usando un gradiente de desde CH_2Cl_2 hasta una mezcla 7:3 de CH_2Cl_2 y acetato de etilo como el eluyente. La evaporación dio como resultado 2,97 g del compuesto intermedio **I-3** como un material sólido de color blanco. LC-MS: Rt: 3.56 min, m/z: 483 (M+H)⁺.

Etapas 4: 3-benzoil-1-((6aR,8R,9aS)-2,2,4,4-tetraisopropil-9-metilenetetrahydro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**I-4**)

El compuesto intermedio **I-3** (2,4 g) se evaporó dos veces con 20 ml de piridina seca. Luego se disolvió renovadamente en 30 ml de piridina seca. Se añadió di-isopropil-etil-amina (3 eq.) seguida por cloruro de benzoilo (1,5 eq.). La mezcla se agitó durante 2 horas a la temperatura ambiente. La piridina se evaporó en vacío por debajo de 30°C y se añadieron 150 ml de CH_2Cl_2 . La mezcla resultante se lavó dos veces con 50 ml de NaHCO_3 saturado. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó, y el residuo se secó en vacío durante 64 horas. El compuesto intermedio **I-4** se purificó por una cromatografía en columna usando un gradiente de desde CH_2Cl_2 hasta una mezcla 8:2 de CH_2Cl_2 y acetato de etilo como el eluyente. Después de una evaporación, se obtuvieron 2,89 g de **I-4** como una espuma de color blanco. LC-MS: Rt: 3,79 min, m/z: 587 (M+H)⁺.

Etapas 5: 3-benzoil-1-((3'R,6aR,8R,9aS)-2,2,4,4-tetraisopropil-4',5',6,6a,8,9a-hexahidro-espiro[furo[3,2-f][1,3,5,2,4]-trioxadisilocina-9,3'-pirazol]-8-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona y su epímero 3-benzoil-1-((3'S,6aR,8R,9aS)-2,2,4,4-tetraisopropil-4',5',6,6a,8,9a-hexahidro-espiro[furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisilocina-9,3'-pirazol]-8-il)-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**I-5**)

El diazometano, generado a partir de N-metil-N-nitroso-p-toluenosulfonamida (DIAZALD) (4,862 g), y KOH (2,9 g) en dietil-éter y 2-(2-etoxietoxi)etanol, se destiló para dar una solución en agitación de **I-4** (1,072 g) en dietil-éter (20 ml), que se enfrió en un baño de hielo y agua. Cuando estuvo completa la destilación, la solución de color amarillo se agitó a la temperatura ambiente hasta que la TLC o el LC-MS mostraron que se había completado la reacción. La mezcla se evaporó hasta sequedad dando como resultado 1,149 g de una espuma de color blanco. El LC-MS indicó una mezcla 3:1 de epímeros (**I-5**) que se usó tal como estaba en la siguiente reacción. LC-MS: Rt: 3,67 & 3,68 min, m/z: 629 (M+H)⁺.

Etapas 6: 3-benzoil-1-((6a'R,8'R,9a'S)-2',2',4',4'-tetraisopropil-hexahidro-espiro[ciclopropano-1,9'-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]-trioxadisilocin]-8'-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**I-6**)

Una mezcla del compuesto intermedio **I-5** (250 mg) y de benzofenona (1 eq.) disuelta en 5 ml de una mezcla seca 1:1 de benceno y CH_3CN se agitó a la temperatura bajo Ar. La mezcla se irradió con una lámpara halógena de 150 W hasta que el LC-MS mostró una completa conversión del material de partida. La mezcla se evaporó hasta sequedad y el compuesto **I-6** se purificó por una cromatografía en columna usando CH_2Cl_2 como el eluyente. Después de una evaporación de las fracciones puras, se obtuvo el **I-6** como un aceite transparente (150 mg). LC-MS: Rt: 3.91 min, m/z: 601 (M+H)⁺.

Etapa 7: 1-((6a'R,8'R,9a'S)-2',2',4',4'-tetraisopropil-hexahidro-espiro[ciclopropano-1,9'-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]-trioxadisilocin]-8'-il)-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**I-7**)

El compuesto intermedio **I-6** (150 mg) se disolvió en 3 ml de CH_2Cl_2 y se añadieron 10 ml de una mezcla de NH_3 y metanol. La mezcla se agitó durante 1 hora, se evaporó hasta sequedad, y se purificó por una cromatografía en columna usando un gradiente de desde CH_2Cl_2 hasta una mezcla 9:1 de CH_2Cl_2 y acetato de etilo como el eluyente. Después de la evaporación, se obtuvo un aceite incoloro, el cual, después de una trituración con dietil-éter y una evaporación, dio como resultado 87 mg del compuesto intermedio **I-7** como una espuma de color blanco. LC-MS: Rt: 3,66 min, m/z: 497 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

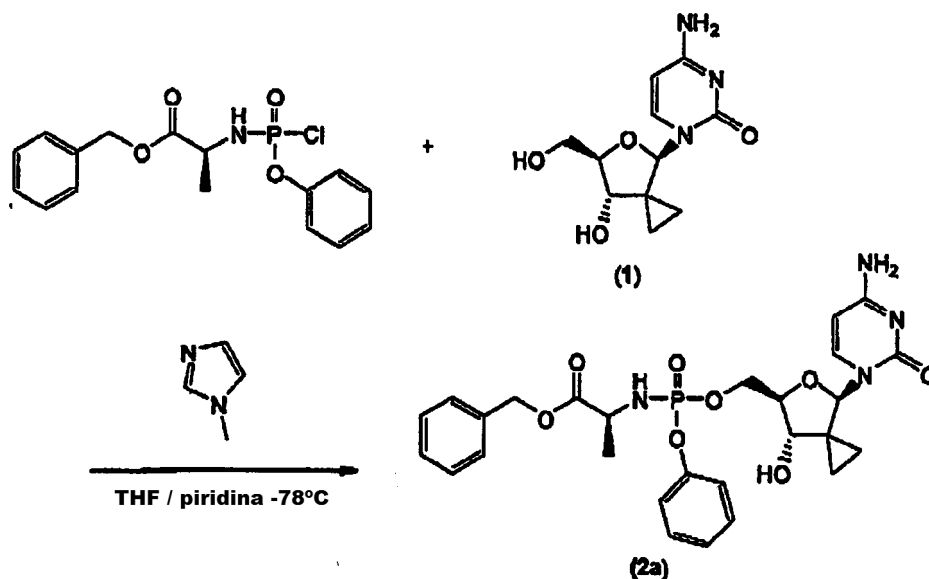
Etapa 8: 4-amino-1-((6a'R,8'R,9a'S)-2',2',4',4'-tetraisopropil-hexahidro-espiro[ciclopropano-1,9'-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]-trioxadisilocin]-8'-il)pirimidin-2(1H)-ona (**I-8**)

Una solución de **I-7** (1,0 g) se disolvió en 20 ml de piridina seca y la solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió gota a gota fósforo-dicloridato de 4-cloro-fenilo (1,5 eq.) y la solución se agitó en estado frío durante 5 minutos. Luego se añadió gota a gota tetrazol (3 eq., solución 0,45 M en CH_3CN). El baño de hielo se retiró y se dejó avanzar la reacción hasta que el LC-MS no mostró ningún progreso adicional. Se añadió otro 1 eq. de fósforo-dicloridato de 4-cloro-fenilo y la mezcla se agitó adicionalmente a la temperatura ambiente durante 3 horas. El LC-MS indicó que no se había dejado nada de material de partida. La mezcla se evaporó hasta sequedad (< 40°C) y el residuo se recogió en CH_2Cl_2 (75 ml) y se lavó dos veces con NaHCO_3 saturado. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó. El residuo de la reacción previa se disolvió en 25 ml de una solución de NH_3 en dioxano (0,5 M). Se añadió una cantidad adicional de NH_3 en dioxano a intervalos regulares hasta que la reacción estuviese completa, como se juzgó por un LC-MS. Cuando se había acabado, la mezcla se evaporó hasta sequedad. El compuesto intermedio **I-8** se purificó por una cromatografía en columna usando un gradiente de desde CH_2Cl_2 hasta una mezcla 9:1 de CH_2Cl_2 y metanol como el eluyente. Después de la evaporación, el **I-8** se obtuvo como un material sólido pegajoso de color desde amarillo hasta anaranjado (840 mg). LC-MS: Rt: 3,42 min, m/z: 496 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Etapa 9: 4-amino-1-(7-hidroxi-6-hidroximetil-5-oxa-espiro[2.4]hept-4-il)-1H-pirimidin-2-ona (**1**)

El compuesto intermedio **I-8** (840 mg) se disolvió en 25 ml de THF. Se añadió fluoruro de tetra-n-butil-amonio (TBAF; 2 eq.). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 1 hora y luego se evaporó en vacío. El compuesto se purificó dos veces mediante una cromatografía en columna usando un gradiente de desde una mezcla 9:1 de CHCl_3 y metanol hasta una mezcla 3:1 de CHCl_3 y metanol como el eluyente. Después de una evaporación de las fracciones que contenían el producto, el compuesto **1** (300 mg) se obtuvo como un material sólido de color blanco. LC-MS: Rt: 1,25 min m/z: 254 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, ¹H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,31 - 0,59 (m, 3 H), 0,93 - 1,02 (m, 1 H), 3,51 - 3,65 (m, 1 H), 3,71 (d, $J = 4,89$ Hz, 2 H), 3,97 (t, $J = 5,87$ Hz, 1 H), 4,98 (t, $J = 4,99$ Hz, 1 H), 5,12 (d, $J = 5,87$ Hz, 1 H), 5,72 (d, $J = 7,43$ Hz, 1 H), 6,01 (s, 1 H), 7,13 (s ancho, 2 H), 7,77 (d, $J = 7,24$ Hz, 1 H),

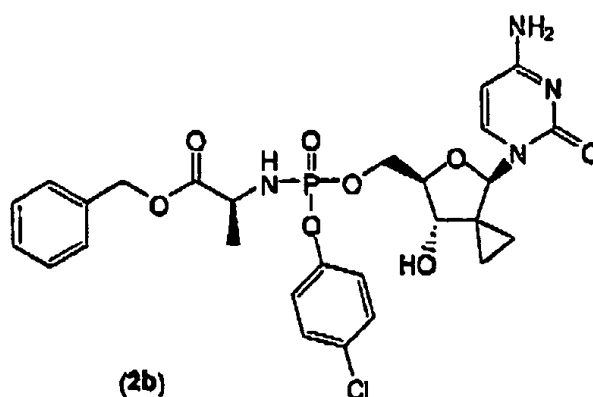
Ejemplo 2: (2S)-2-(((4R,6R,7S)-4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-7-hidroxi-5-oxa-espiro[2.4]heptan-6-il)metoxi)-((fenoxi)-fosforil)amino)-propanoato de bencilo (**2a**)



El compuesto **1** (100 mg) se disolvió en una mezcla seca de THF y piridina juntamente con el (2S)-2-(cloro(fenoxi)fosforilamino)propanoato de bencilo (279 mg, 2,0 eq.). La mezcla se enfrió a -78°C. Se añadió N-metilimidazol (NMI) (259 mg, 8 eq.) y esta mezcla se agitó durante 15 minutos a -78°C y luego se agitó a la TA (temperatura ambiente) durante una noche. La resultante mezcla se evaporó hasta sequedad. Se añadieron 10 ml de CH₂Cl₂ y el residuo se lavó con 10 ml de HCl 0,5 N. La capa orgánica se separó y se lavó con 10 ml de agua, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. El compuesto se purificó por una cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de desde CH₂Cl₂ hasta una mezcla 9-1 de CH₂Cl₂ y MeOH como el eluyente. (R_f = 0,2 en este eluyente). Se obtuvo un material sólido de color amarillo, que se volvió a purificar usando una cromatografía en columna y usando un gradiente de desde EtOAc hasta una mezcla 8-2 de EtOAc y MeOH como el eluyente. Después de la evaporación y de haber secado durante una noche en vacío, se obtuvieron 80 mg (33,4 %) del compuesto **2a** (mezcla de diastereoisómeros). LC-MS: Rt: 3,37 min m/z: 569 (M-H)⁺, ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,31 - 0,41 (m, 1 H), 0,43 - 0,58 (m, 2 H), 0,95 - 1,06 (m, 1 H), 1,20 - 1,31 (m, 3 H), 3,82 - 4,01 (m, 3 H), 4,09 - 4,23 (m, 1 H), 4,23 - 4,36 (m, 1 H), 4,98 - 5,15 (m, 2 H), 5,29 - 5,39 (m, 1 H), 5,70 (d, J = 7,43 Hz, 1 H), 6,07 (s, 1 H), 6,13 (dd, J = 12,81, 10,47 Hz, 1 H), 7,08 - 7,25 (m, 6 H), 7,29 - 7,39 (m, 6 H), 7,54 (d, 1 H).

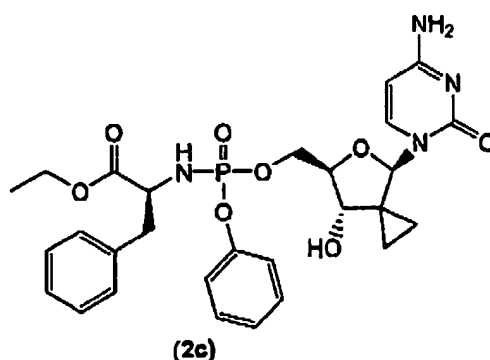
Los siguientes compuestos se prepararon de una manera similar:

(2S)-2-(((4R,6R,7S)-4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-7-hidroxi-5-oxa-espiro[2,4]heptan-6-il)metoxi)-(4-cloro-fenoxi)fosforilamino)propanoato de bencilo (**2b**)



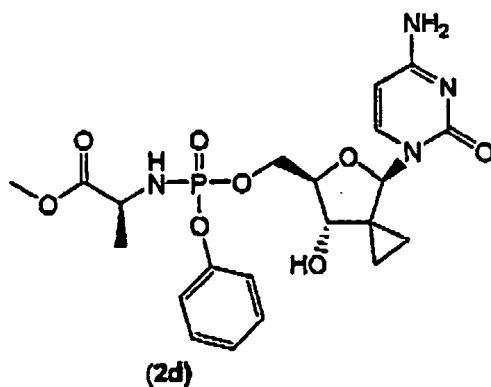
LC-MS: Rt: 3,65 min m/z: 603 (M-H)⁺, ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,30 - 0,43 (m, 1 H), 0,44 - 0,60 (m, 2 H), 0,95 - 1,06 (m, 1 H), 1,20 - 1,31 (m, 3 H), 3,84 - 4,01 (m, 3 H), 4,09 - 4,23 (m, 1 H), 5,04 - 5,14 (m, 2 H), 5,29 - 5,39 (m, 1 H), 5,71 (d, J = 7,63 Hz, 1 H), 6,07 (s, 1 H), 6,12 - 6,27 (m, 1 H), 7,08 - 7,26 (m, 5 H), 7,27 - 7,43 (m, 7 H), 7,55 (d, J = 7,24 Hz, 1 H).

(2S)-2-(((4R,6R,7S)-4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-7-hidroxi-5-oxa-espiro[2,4]heptan-6-il)metoxi)(fenoxi)-fosforilamino)-3-fenil-propanoato de etilo (**2c**)



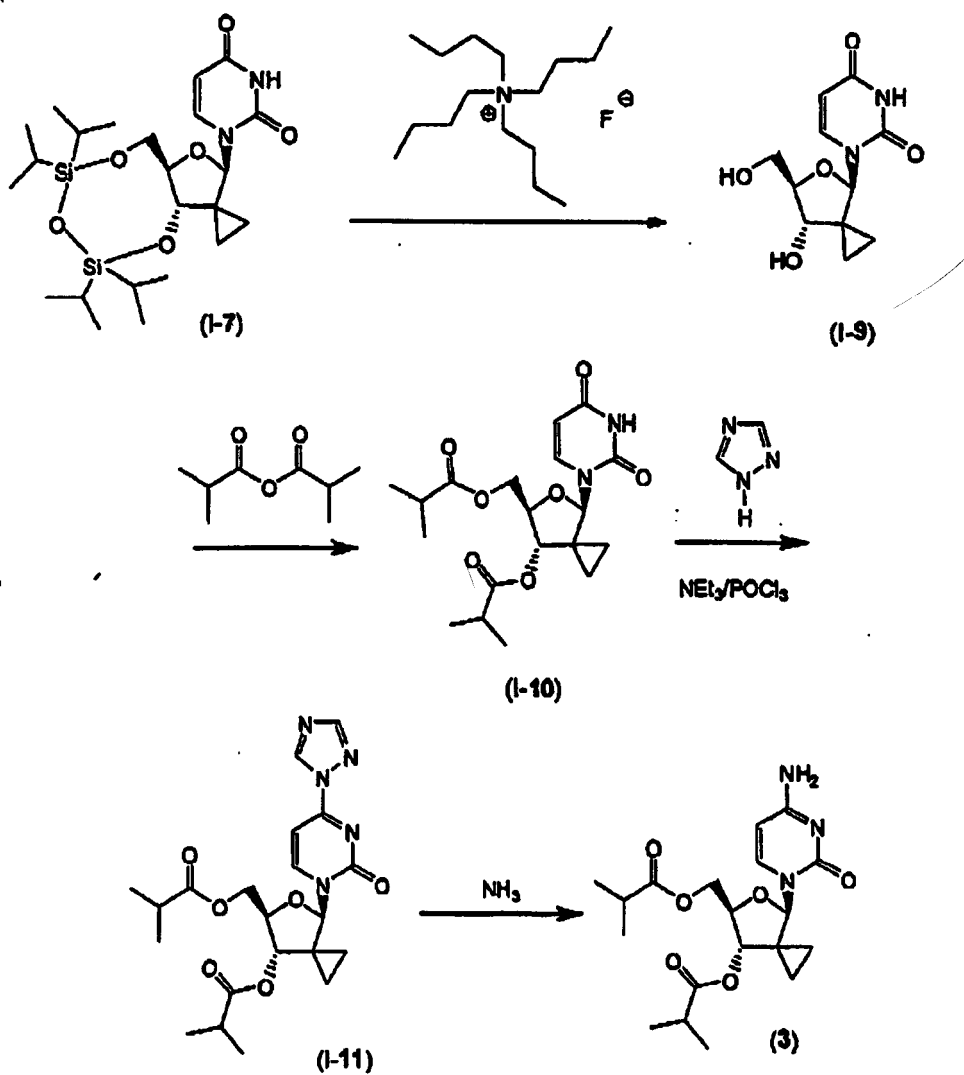
LC-MS: Rt: 1,84 min m/z: 585 (M+H)⁺

(2S)-2-((((4R,6R,7S)-4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-7-hidroxi-5-oxa-espiro[2,4]heptan-6-il)metoxi)(fenoxi)-fosforilamino)-propanoato de metilo (**2d**)



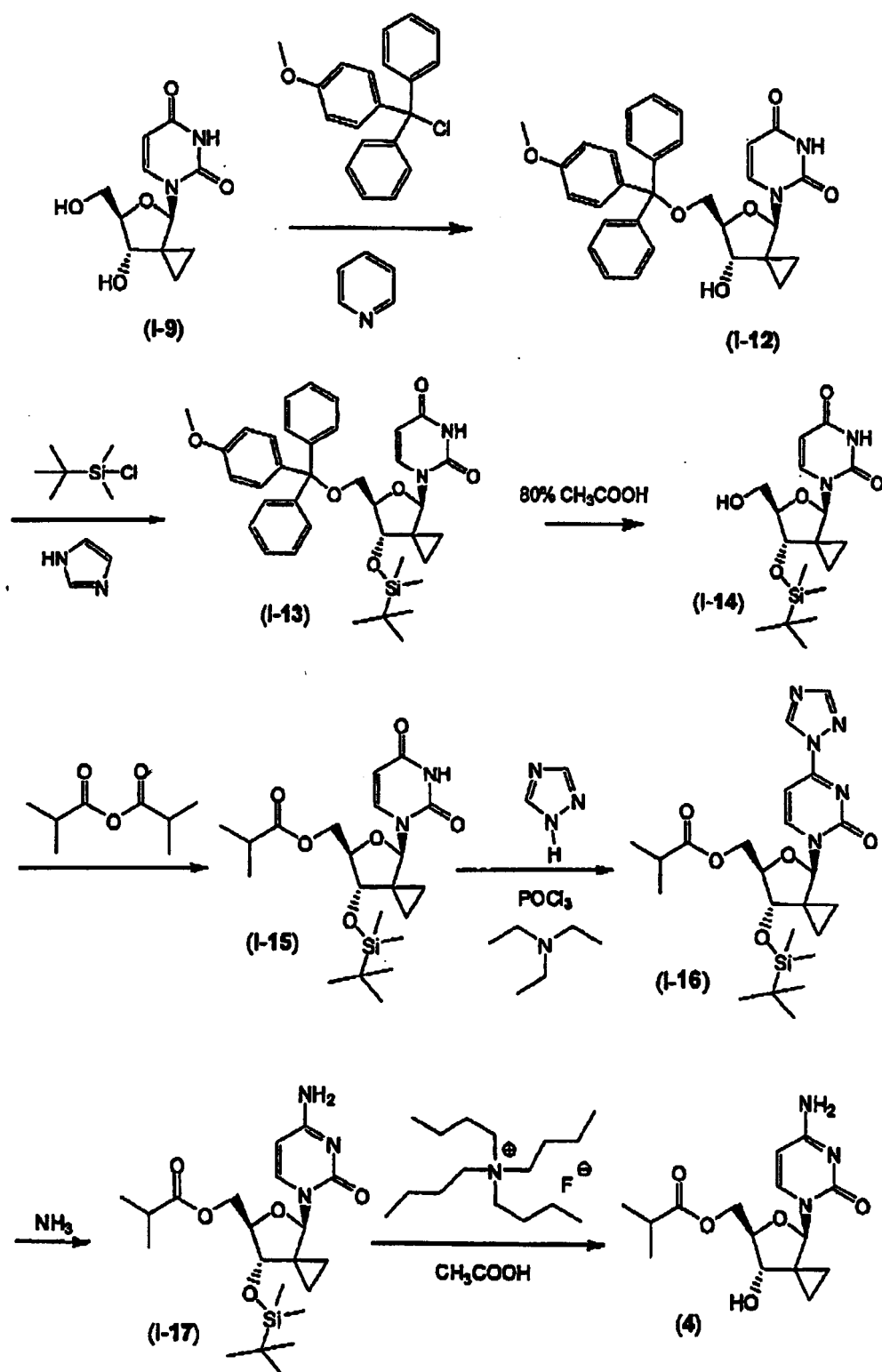
LC-MS: Rr:1,25 min m/z: 495 (M+H)⁺

5 Ejemplo 3: (4R,6R,7S)-isobutirato de 4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-6-(isobutiriloximetil)-5-oxa-espiro[2.4]-heptan-7-ilo (**3**)



- El compuesto intermedio **I-7** (11,00 g, 22,14 mmol) se disolvió en THF (280 ml) y se añadió TBAF (59,8 ml, 59,8 mmol). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una mezcla de piridina, metanol y agua (80 ml, 3:1:1) seguida por un agente intercambiador de cationes de carácter fuertemente ácido, Dowex 50 Wx4 (128 g), en una mezcla de piridina, metanol y agua (320 ml, 3:1:1). La mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos y se filtró. El residuo de Dowex se lavó dos veces con una mezcla de piridina, metanol y agua (320 ml, 3:1:1) y los materiales filtrados combinados se concentraron bajo presión reducida. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de desde 0 hasta 10 % de metanol en acetato de etilo, dando como resultado el compuesto intermedio **I-9** (5,597 g, 84 %) como una espuma de color blanco. LC-MS Rt: 2,05 min, m/z = 253 (M-H)⁻.
- El compuesto intermedio **I-9** (5,16 g, 20,30 mmol) se disolvió en piridina seca (100 ml) y la solución se enfrió externamente con agua fría. Se añadió anhídrido de ácido isobutírico (16,85 ml, 101 mmol) y se dejó que la reacción avanzase a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió externamente de nuevo con agua fría y el exceso de anhídrido de ácido isobutírico se enfrió rápidamente por adición de metanol. Después de haber agitado durante 20 minutos a la temperatura ambiente y de haber evaporado los materiales volátiles, se añadió acetato de etilo y la mezcla se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se concentró en vacío para dar el **I-10** (7,68 g, 96 %) como un material sólido de color blanco. LC-MS: Rt: 2,26 min, m/z = 393 (M-H)⁻.
- Se añadió POCl₃ (4,72 ml, 50,6 mmol) a una mezcla enfriada de **I-10** (7,68 g, 19,47 mmol), 1H-1,2,4-triazol (15,20 g, 220 mmol) y trietilamina (30,7 ml, 220 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 2,5 horas. El POCl₃ en exceso se enfrió rápidamente por adición de agua fría y la capa orgánica se separó y se concentró en vacío. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución en gradiente de mezclas desde 90:10 hasta 85:15 de CH₂Cl₂ y acetato de etilo, dando como resultado el compuesto intermedio **I-11** (7,5 g, 86 %). LC-MS: Rt: 2,38 min, m/z = 446 (M+H)⁺.
- El compuesto intermedio **I-11** (7,49 g, 16,81 mmol) se disolvió en THF (200 ml) y se trató con NH₄OH acuoso concentrado (15 ml). Después de 3,5 horas, los materiales volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de desde 0 hasta 5 % de metanol en CH₂Cl₂. El producto se disolvió en acetato de etilo y la mezcla se lavó con agua (2 x) y con salmuera (2 x). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y después de una filtración, se concentró en vacío, dando como resultado el compuesto **3** (5,597 g, 84 %) como una espuma de color blanco. LC-MS: Rt: 1.95 min, m/z = 394 (M+H)⁺.
- ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,36 - 0,46 (m, 1 H), 0,64 - 0,75 (m, 1 H), 0,77 - 0,92 (m, 2 H), 1,06 - 1,15 (m, 12 H), 2,53 - 2,66 (m, 2 H), 4,18 - 4,36 (m, 3 H), 4,98 - 5,02 (m, 1 H), 5,77 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H), 6,25 (s, 1 H), 7,25 (s ancho, 1 H), 7,29 (s ancho, 1 H), 7,55 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H)

Ejemplo 4: ((4R,6R,7S)-isobutirato de 4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-7-hidroxi-5-oxa-espiro[2,4]heptan-6-il)metilo (4)



- 5 Una solución del compuesto intermedio I-9 (350 mg, 1,377 mmol) en piridina seca (15 ml) se enfrió en un baño de hielo y agua y se añadió (cloro(4-metoxifenil)metilen)dibenceno (900 mg, 2,91 mmol). La mezcla de reacción se dejó sobre un baño en fusión de hielo y agua y luego se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. Se añadió

metanol en exceso y, después de 30 minutos, la mezcla de reacción se concentró, se secó y se usó tal como estaba en la siguiente reacción. LC-MS: Rt: 2.48 min, m/z = 525 (M-H)⁻.

A una solución del anterior residuo en DMF seca (15 ml) se le añadieron terc.-butil-cloro-dimetil-silano (TBDMSCl; 311 mg, 2,065 mmol) e imidazol (169 mg, 2,478 mmol). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. En total se añadieron 6 equivalentes de TBDMSCl y de imidazol durante el siguiente día y se continuó la agitación adicionalmente durante una noche. La mezcla se enfrió rápidamente con metanol y los materiales volátiles fueron parcialmente eliminados, diluidos con acetato de etilo y la mezcla se lavó con agua (2 x) y con salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄ y, después de una filtración, se concentró en vacío. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de desde CH₂Cl₂ hasta una mezcla 19:1 de CH₂Cl₂ y metanol, dando como resultado el compuesto intermedio **I-13**, que se usó tal como estaba en la siguiente reacción. LC-MS: Rt: 3,70 min, m/z = 639 (M-H)⁻.

El compuesto intermedio **I-13** se disolvió en ácido acético acuoso al 80 % (10 ml) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente. Después de 8 horas, los materiales volátiles se evaporaron y la mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de desde CH₂Cl₂ hasta una mezcla de 4 % de metanol y CH₂Cl₂. La evaporación del disolvente dio como resultado el compuesto **I-14** (318 mg, 73 %). LC-MS: Rt: 2,46 min, m/z = 367 (M-H)⁻.

El compuesto intermedio **I-14** (318 mg, 0,863 mmol) se disolvió en piridina seca (8 ml) y la solución se enfrió externamente con agua fría. Se añadió anhídrido de ácido isobutírico (430 µl, 2,59 mmol) a través de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. El anhídrido de ácido isobutírico en exceso se enfrió rápidamente mediante la adición de metanol. Luego se eliminaron los materiales volátiles. Se añadió acetato de etilo y la solución se lavó con NaHCO₃ saturado, se secó con MgSO₄ y después de una filtración se concentró en vacío dando como resultado el compuesto intermedio **I-15** (307 mg, 81 %). LC-MS: Rt: 3,0 min, m/z = 437 (M-H)⁻.

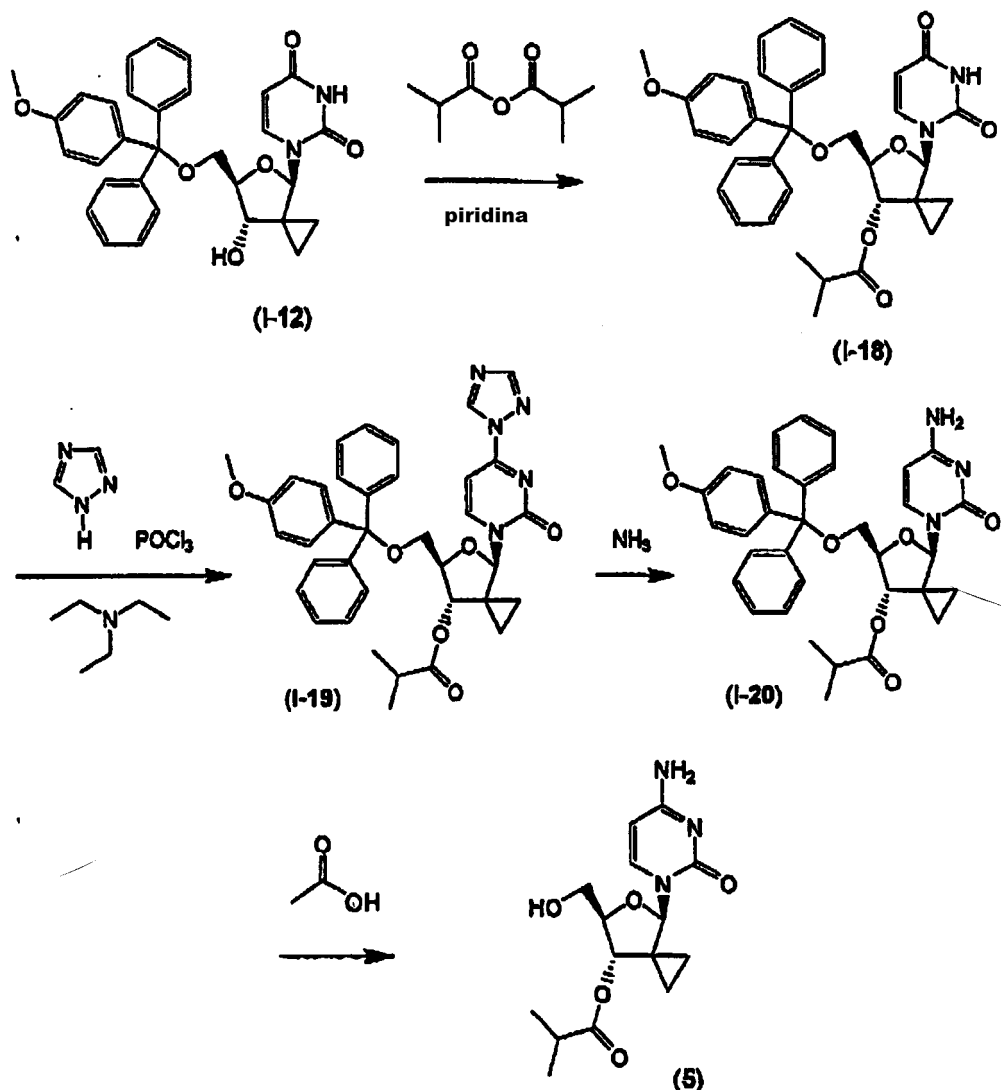
El compuesto intermedio **I-15** (307 mg, 0,700 mmol), el 1H-1,2,4-triazol (546 mg, 7,91 mmol) y la trietilamina (1,1 ml, 7,91 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (7 ml) y se enfriaron a 0°C. Se añadió POCl₃ (0,170 ml, 1,820 mmol) mientras que la temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 25°C. La mezcla se agitó durante una noche. Se añadieron 3,0 equivalentes de 1H-1,2,4-triazol y trietilamina así como CH₂Cl₂ (5 ml) y la mezcla se agitó durante otras 3 horas a la temperatura ambiente. El POCl₃ en exceso se enfrió rápidamente por cuidadosa adición de agua fría. La capa orgánica inferior se separó y se concentró por evaporación en vacío. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de desde CH₂Cl₂ hasta una mezcla de 4 % de metanol y CH₂Cl₂, dando como resultado el compuesto intermedio **I-16** (200 mg, 58 %). LC-MS: Rt: 3,09 min, m/z = 490 (M+H)⁺.

El compuesto intermedio **I-16** (200 mg, 0,408 mmol) se disolvió en THF (5 ml) y se trató con NH₄OH acuoso concentrado (0,5 ml). Después de 7 horas, los materiales volátiles se eliminaron y la mezcla se concentró bajo presión reducida. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de desde CH₂Cl₂ hasta una mezcla de 5 % de metanol y CH₂Cl₂. Después de la evaporación del disolvente, se obtuvo el compuesto intermedio **I-17** (179 mg, 100 %). LC-MS: Rt: 2,74 min, m/z = 438 (M+H)⁺.

A una solución del compuesto intermedio **I-17** (179 mg, 0,409 mmol) y de ácido acético (147 mg, 2,454 mmol) en THF (10 ml), se le añadió TBAF (1227 ml, 1,227 mmol, 1 M en THF). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente. Se continuó la agitación durante 2 horas y luego se eliminó el disolvente. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de mezclas de metanol y CH₂Cl₂ desde 4 % hasta 8 %. El producto (100 mg) se mezcló con CaCO₃ (60 mg) y con Dowex 50 Wx4 (200 mg) en THF (10 ml) y se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se filtró y después de la evaporación de los materiales volátiles, se volvió a purificar mediante una cromatografía en gel de sílice (elución de gradientes: desde 0 hasta 15 % de metanol y cloroformo), dando como resultado el compuesto **4** como un material sólido de color blanco (59 mg, 44 %). LC-MS: Rt: 1,08 min, m/z = 324 (M+H)⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,36 - 0,45 (m, 1 H), 0,46 - 0,57 (m, 2 H), 0,96 - 1,05 (m, 1 H), 1,10 (d (aparente)), J = 6,5 Hz, 6 H), 2,58 (h (aparente)), J = 6,5 Hz, 1 H), 3,86 - 3,91 (m, 1 H), 3,97 - 4,01 (m, 1 H), 4,21 (dd, J = 12,0, 5,9 Hz, 1 H), 4,33 (dd, J = 12,0, 2,3 Hz, 1 H), 5,34 (d, J = 5,7 Hz, 1 H), 5,74 (d, J = 7,4 Hz, 1 H), 6,01 (s, 1 H), 7,06 - 7,28 (m, 2 H), 7,57 (d, J = 7,4 Hz, 1 H),

Ejemplo 5: (4R,6R,7S)-isobutirato de 4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-6-(hidroximetil)-5-oxa-espiro[2.4]heptan-7-ilo (5)



El compuesto intermedio **I-12** (250 mg, 0,475 mmol) se disolvió en piridina seca (10 ml) y la solución se enfrió externamente con agua fría. A la solución se le añadió a través de una jeringa anhídrido de ácido isobutírico (236 μl , 1,424 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió más cantidad de anhídrido de ácido isobutírico (236 μl , 1,424 mmol) y la mezcla se agitó adicionalmente durante 2 horas. Se añadió más cantidad de anhídrido de ácido isobutírico (236 μl , 1,424 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche. Subsiguientemente, el anhídrido de ácido isobutírico en exceso se enfrió rápidamente mediante adición de metanol. La solución se agitó durante 20 minutos a la temperatura ambiente y luego se concentró hasta sequedad. El residuo se recogió en acetato de etilo (30 ml) y la solución se lavó con NaHCO_3 (2 x 20 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , el material sólido se separó por filtración y el disolvente se eliminó por evaporación. Dando como resultado el compuesto **I-18** como un aceite incoloro usado tal como estaba en la siguiente reacción. LC-MS: Rt: 3.07 min.

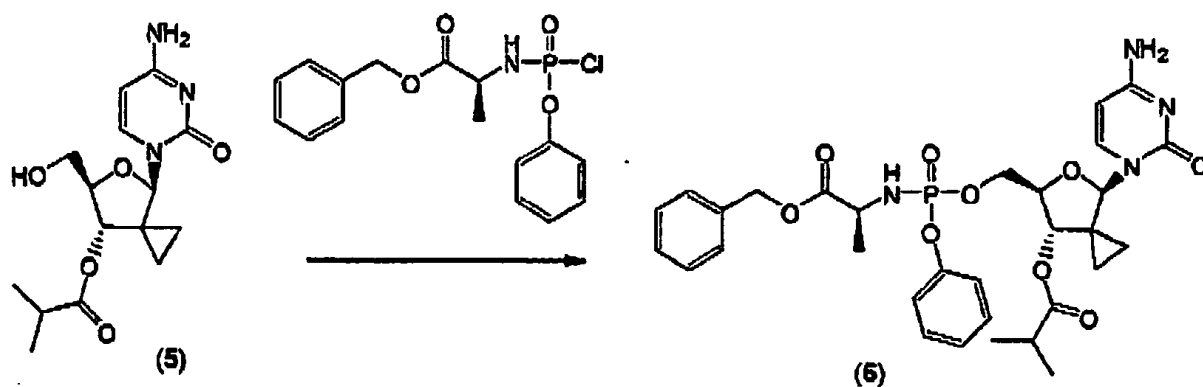
Se añadió POCl_3 (102 μl , 1,089 mmol) a una mezcla enfriada del compuesto intermedio **I-18** (250 mg, 0,419 mmol), 1H-1,2,4-triazol (327 mg, 4,73 mmol), trietilamina (661 μl , 4,73 mmol), y CH_2Cl_2 (6,0 ml) mientras que la temperatura de la reacción era mantenida por debajo de 25°C (dando como resultado un precipitado de color blanco). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 4 horas. Cuando se había completado la reacción, el POCl_3 se enfrió rápidamente por cuidadosa adición de H_2O fría. La capa orgánica se separó y se concentró por evaporación en vacío. La mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de mezclas de CH_2Cl_2 y acetato de etilo desde 90:10 hasta 85:15 dando como resultado el compuesto intermedio **I-19** en forma de un aceite (200 mg, 74 %). Rt: 3,15 min.

El compuesto intermedio **I-19** (200 mg, 0,309 mmol) se disolvió en THF (5 ml) y se trató con NH_4OH acuoso concentrado (0,6 ml). Después de 4 horas se añadió más cantidad de NH_4OH acuoso concentrado (0,3 ml) y la mezcla se agitó durante una noche. El disolvente se eliminó en vacío, el aceite se recogió en acetato de etilo y se lavó con agua y con salmuera. Después de haber secado con Na_2SO_4 , filtrado y evaporado los materiales volátiles, el residuo (**I-20**) se usó tal como estaba en la siguiente reacción. LC-MS: Rt: 2,86 min, $m/z = 594$ (M-H)⁻.

El compuesto intermedio **I-20** (180 mg, 0,302 mmol) se disolvió en ácido acético acuoso al 80 % (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente. Después de 9 horas, los materiales volátiles se eliminaron y la mezcla se purificó por una cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de desde 5 % hasta 15 % de metanol en CH_2Cl_2 . El residuo obtenido se trituroó con $i\text{Pr}_2\text{O}$ y se secó en vacío. Dando como resultado el compuesto **5** (60,8 mg, 62 %). LC-MS: Rt: 1,25 min, $m/z = 324$ (M+H)⁺.

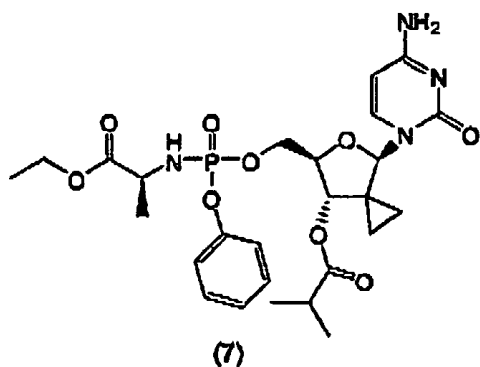
^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,33 - 0,41 (m, 1 H), 0,62 - 0,71 (m, 1 H), 0,74 - 0,82 (m, 2 H), 1,08 - 1,14 (m, 6 H), 2,55 - 2,64 (1H, m), 3,62 - 3,68 (m, 2H), 3,99 - 4,04 (m, 1 H), 4,98 - 5,03 (m, 1 H), 5,12 (t, $J = 5,2$ Hz, 1 H), 5,76 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H), 6,27 (s, 1 H), 7,14 - 7,33 (m, 2 H), 7,80 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H)

Ejemplo 6: El éster isobutírico de (2S)-2-(((4R,6R,7S)-4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-7-hidroxi-5-oxa-espiro[2.4]heptan-6-il)metoxi)(fenoxi)fosforil-amino)propanoato de bencilo (**6**)



El compuesto **5** se disuelve en una mezcla de THF y piridina conjuntamente con el (2S)-2-(cloro-(fenoxi)-fosforilamino)propanoato de bencilo (2,0 eq.). La mezcla se enfría a -78°C . Se añade N-metil-imidazol (NMI) (8 eq.) y la mezcla se agita durante 15 minutos a -78°C y luego se agita a la TA durante una noche. La mezcla se evapora hasta sequedad. Se añaden 10 ml de CH_2Cl_2 y el residuo se lava con 10 ml de HCl 0,5 N. La capa orgánica se separa y se lava con 10 ml de agua, se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y se evapora. El compuesto se purifica por una cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de mezclas de CH_2Cl_2 y MeOH como el eluyente.

Siguiendo los mismos procedimientos, pero partiendo de (2S)-2-(cloro-(fenoxi)fosforilamino)propanoato de etilo, se prepara también el éster isobutírico de (2S)-2-(((4R,6R,7S)-4-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1(2H)-il)-7-hidroxi-5-oxa-espiro[2.4]-heptan-6-il)metoxi)(fenoxi)fosforil-amino)propanoato de etilo (**7**):



Ejemplos biológicos**Ensayo de replicones**

Los compuestos de fórmula I se examinaron en cuanto a la actividad en la inhibición de la replicación de ARN de VHC en un ensayo celular destinado a identificar unos compuestos que inhiban a un linaje de células en replicación celular funcional de VHC, también conocidas como replicones de VHC. El ensayo celular se basó en una construcción artificial de expresión bicistrónica, como ha sido descrita por Lohmann y colaboradores (1999), Science vol. 285 páginas 110-113 con unas modificaciones descritas por Krieger y colaboradores (2001), Journal of Virology 75: 4614-4624, en una estrategia de cribado de múltiples dianas.

El ensayo utilizó el linaje de células transfectadas establemente Huh-7 luc/neo (citado en lo sucesivo como Huh-Luc). Este linaje de células alberga un ARN que codifica una construcción artificial de expresión bicistrónica que comprende las regiones NS3-NS5B de tipo salvaje de VHC del tipo 1b traducido a partir de un Internal Ribosome Entry Site (acrónimo IRES = sitio de entrada en ribosomas internos) procedente de un virus de encefalomiocarditis (EMCV), precedido por una porción de reportero (FfL-luciferasa), y una porción de marcador seleccionable (neo^R, neomicina fosfotransferasa). La construcción artificial es bordeada por regiones por 5' y 3' NTRs (regiones no traducidas) de VHC del tipo 1b. Un cultivo continuado de las células de replicones en la presencia de G418 (neo®) es dependiente de la replicación del ARN de VHC. Las células de replicones transfectados establemente, que expresan un ARN de VHC, que se replica autónomamente y en altos niveles, que codifica, entre otras cosas, una luciferasa, se usaron para cribar los compuestos antivíricos.

Las células de replicones se sembraron en unas placas de 384 pocillos en la presencia de los compuestos de ensayo y testigos, que se añadieron en diversas concentraciones. A continuación de una incubación durante tres días, la replicación del VHC se midió por ensayo de la actividad de luciferasa (usando sustratos y reactivos para el ensayo clásico de luciferasa y un reproductor en imágenes de microplacas ultra-HTS Perkin Elmer ViewLux®). Las células de replicones en los cultivos testigos tienen una alta expresión de luciferasa en la ausencia de cualquier agente inhibidor. La actividad inhibidora del compuesto sobre la actividad de luciferasa se vigiló en las células Huh-Luc, habilitando una curva de dosis y respuesta para cada compuesto de ensayo. Se calcularon luego los valores de CE50 (concentración eficaz de 50 %), cuyo valor representa la cantidad del compuesto que se requiere para disminuir en un 50 % el nivel de la actividad de luciferasa detectada, o más específicamente, la capacidad para replicarse del ARN de replicones de VHC engarzados genéticamente.

Toxicidad celular

La toxicidad celular se determinó en el ensayo de replicones de Huh7-CMV-Luc. Las células de replicones (2.500 células/pocillo), transformadas de una manera estable con un gen reportero de luciferasa bajo el control del promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV), fueron cultivadas en la presencia o ausencia de concentraciones del compuesto de ensayo. Después de una incubación durante tres días a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada, la proliferación celular se cuantificó midiendo la actividad de Luc, y se expresó como valores de CC₅₀ (citotoxicidad, concentración inhibitoria de 50 % del crecimiento de células). Los ensayos fueron realizados en placas de 384 pocillos.

Ensayo de VIH

Los compuestos del invento fueron ensayados en cuanto a su potencia contra los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La actividad antivírica fue evaluada usando un ensayo celular realizado de acuerdo con el siguiente procedimiento. El linaje de células T humanas MT4 fue tratado con la Green Fluorescent Protein (acrónimo de GFP = proteína fluorescente verde) y un promotor específico para los VIH, la repetición terminal larga (LTR acrónimo de Long Terminal Repeat) de VIH-1. Este linaje de células, denominado MT4 LTR-EGFP, se puede usar para la evaluación *in vitro* de una actividad anti-VIH de los compuestos investigados. En células infectadas con los VIH-1, se produce la proteína Tat que regula en sentido ascendente al promotor de LTR y eventualmente conduce a una estimulación del reportero de GFP, permitiendo medir por fluorometría una infección por VIH en desarrollo. Los valores de la concentración efectiva tales como la concentración efectiva de 50 % (CE50) se pueden determinar y se expresan usualmente en µM. Un valor de CE50 es definido como la concentración de un compuesto de ensayo que reduce en un 50 % la fluorescencia de células infectadas con los VIH. La vigilancia de la infección con los VIH-1 se hizo usando un microscopio de barrido. El análisis de las imágenes permite una detección muy sensible de una infección causada por los virus. Las mediciones se hicieron antes de una necrosis celular, que usualmente tiene lugar alrededor de cinco días después de una infección, en particular las mediciones se realizaron tres días después de una infección. La columna IIIB en la tabla da una lista de los valores de CE50 contra la cepa IIIB de tipo salvaje.

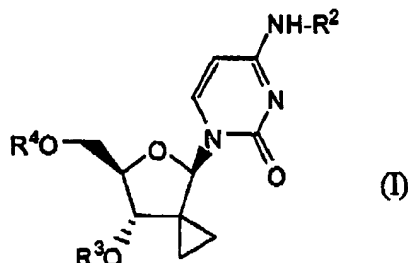
Los resultados dados en la siguiente tabla ilustran que los compuestos del presente invento muestran una actividad contra los VHC, mientras que carecen de actividad contra los VIH. Ellos muestran unos favorables resultados en términos de toxicidad y tienen un aceptable índice de selectividad (relación entre CE₅₀ y CC₅₀).

Tabla: Resultados de los ensayos

Compuesto número	CE ₅₀ (replicón) µM	CC ₅₀ (Huh7) µM	EC ₅₀ (IIIB) µM
1	8,4	>98	>98
2a	15,3	>98	>98
2b	26,3	>98	>98
2c	98	>98	>98
2d	63,1	>98	>98
3	27,2	>98	>98
4	9,2	>98	>98
5	42,5	>98	>98

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



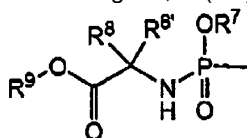
5 incluyendo cualesquiera posibles estereoisómeros del mismo, en donde:

R^2 es hidrógeno o alquilo de C_1-C_4 ;

R^3 y R^4 se seleccionan independientemente entre el conjunto que consiste en hidrógeno, $-C(=O)R^5$,
y $-C(=O)CHR^6-NH_2$; o

R^3 es hidrógeno y R^4 es un éster monofosfato, difosfato o trifosfato; o

10 R^3 es hidrógeno, $-C(=O)CHR^5$, o $-C(=O)CHR^6-NH_2$ y R^4 es un grupo de fórmula



cada R^5 se selecciona independientemente entre el conjunto que consiste en hidrógeno, alquilo de C_1-C_6
y cicloalquilo de C_3-C_7 ;

R^6 es hidrógeno o alquilo de C_1-C_6 ;

15 R^7 es fenilo, opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes que están seleccionados, cada uno de ellos
Independientemente, entre halo, alquilo de C_1-C_6 , alqueno de C_3-C_6 , alcoxi de C_1-C_6 , hidroxilo, y amino, o
 R^7 es naftilo; o R^7 es indolilo;

R^8 es hidrógeno, alquilo de C_1-C_6 o bencilo;

$R^{8'}$ es hidrógeno, alquilo de C_1-C_6 o bencilo; o

20 R^8 y $R^{8'}$, conjuntamente con el átomo de carbono al que ellos están unidos, forman un cicloalquilo de C_3-C_7 ;

R^9 es alquilo de C_1-C_6 , bencilo o fenilo, en donde dicho fenilo puede estar opcionalmente sustituido con
1, 2 o 3 sustituyentes, cada uno de los cuales está seleccionado independientemente entre hidroxilo,
alcoxi de C_1-C_6 , amino, mono- y di-alquil de C_1-C_6 -amino;

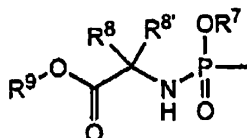
con la condición de que R^2 , R^3 y R^4 no han de ser todos ellos hidrógeno;

25 o las sales o los solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R^2 es hidrógeno.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R^3 y R^4 son hidrógeno.

4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en donde R^3 es hidrógeno y R^4 es un
grupo de fórmula



30

5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o la reivindicación 4, en donde
 R^7 es fenilo, opcionalmente sustituido con halo, o alquilo de C_1-C_6 , o R^7 es naftilo.

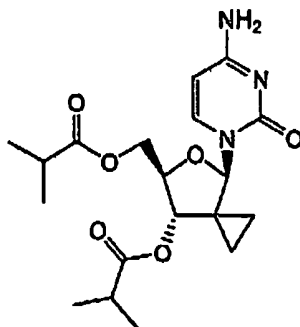
6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o las reivindicaciones 4 ó 5, en donde
 R^8 es hidrógeno y $R^{8'}$ es hidrógeno o alquilo de C_1-C_6 .

7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o las reivindicaciones 4 ó 5, en donde uno de los R^3 y R^4 es $-C(=O)R^5$; y el otro de los R^3 y R^4 es hidrógeno; o en donde ambos R^3 y R^4 son $-C(=O)R^5$; y en donde R^5 es alquilo de C_1-C_6 .

8. El compuesto de la reivindicación 7, en donde R^5 es isopropilo.

5 9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o las reivindicaciones 4 – 8, en donde R^9 es alquilo de C_1-C_6 o bencilo.

10. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la fórmula:



11. El compuesto de la reivindicación 10, en donde el compuesto está en forma libre.

10 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz anti-víricamente de un compuesto de fórmula I como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Un compuesto de fórmula I, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, así como el compuesto de fórmula I, en la que R^2 , R^3 y R^4 son todos ellos hidrógeno, para usarse como un agente inhibidor de los VHC.

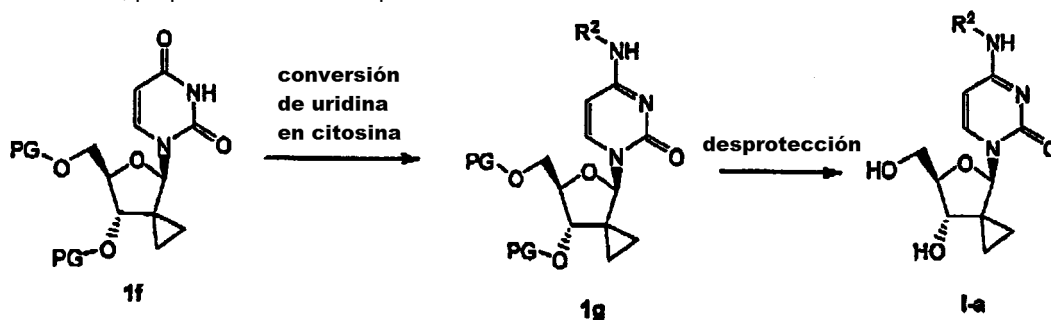
15 14. Un compuesto de fórmula I, para usarse como un agente inhibidor de los VHC, de acuerdo con la reivindicación 13, en donde en el compuesto de fórmula I R^2 , R^3 y R^4 son todos ellos hidrógeno.

15. Un compuesto de fórmula I, para usarse como un agente inhibidor de los VHC, de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el compuesto está en forma libre.

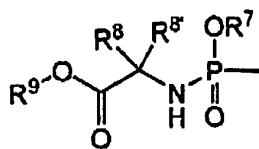
20 16. Una combinación que comprende un compuesto de fórmula I, así como el compuesto de fórmula I en la que R^2 , R^3 y R^4 son todos ellos hidrógeno, con otro agente inhibidor de los VHC.

17. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula I, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que

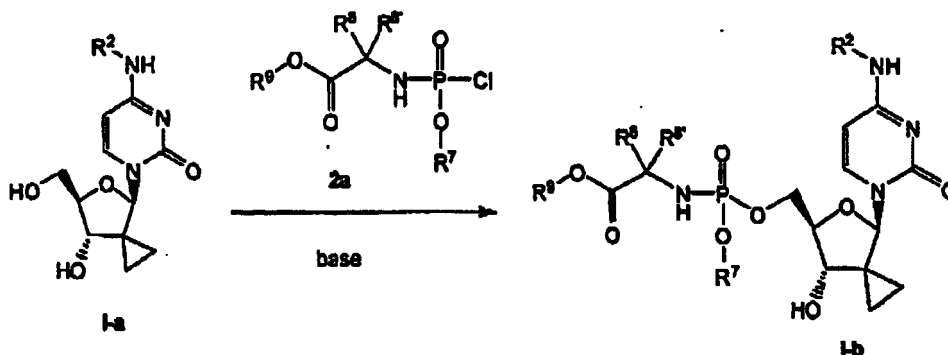
(a) se prepara un compuesto de fórmula I en la que R^3 y R^4 son ambos hidrógeno, aquí representado por la fórmula I-a, por una reacción de conversión de uracilo en citosina a partir de una 2'-desoxi-2'-espirociclopropil uridina **1f** para dar la correspondiente 2'-desoxi-2'-espirociclopropil citidina **1g**, seguida por una eliminación de los grupos protectores PG, proporcionando el compuesto I-a:



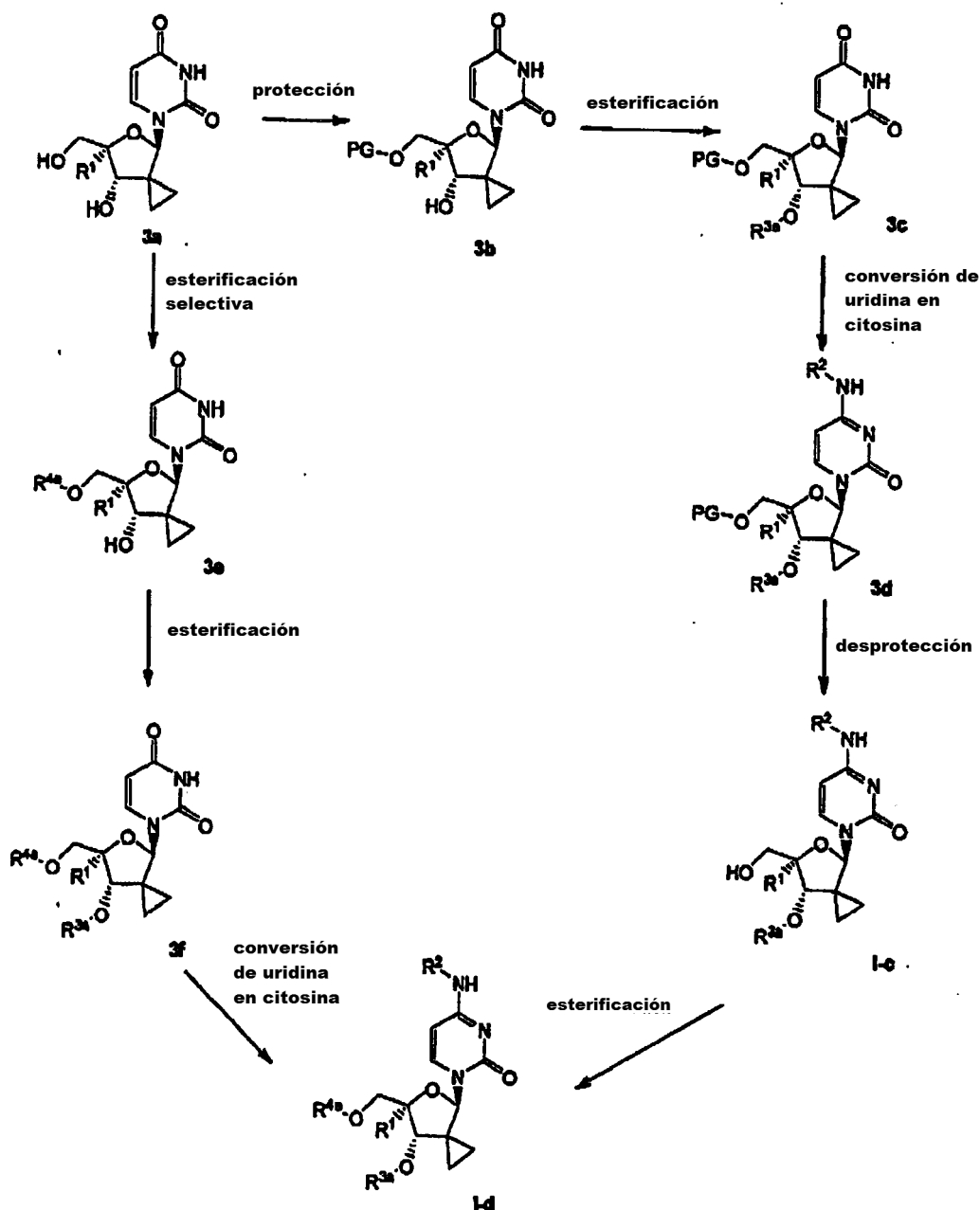
(b) se prepara un compuesto de fórmula I en la que R^3 es hidrógeno y R^4 es



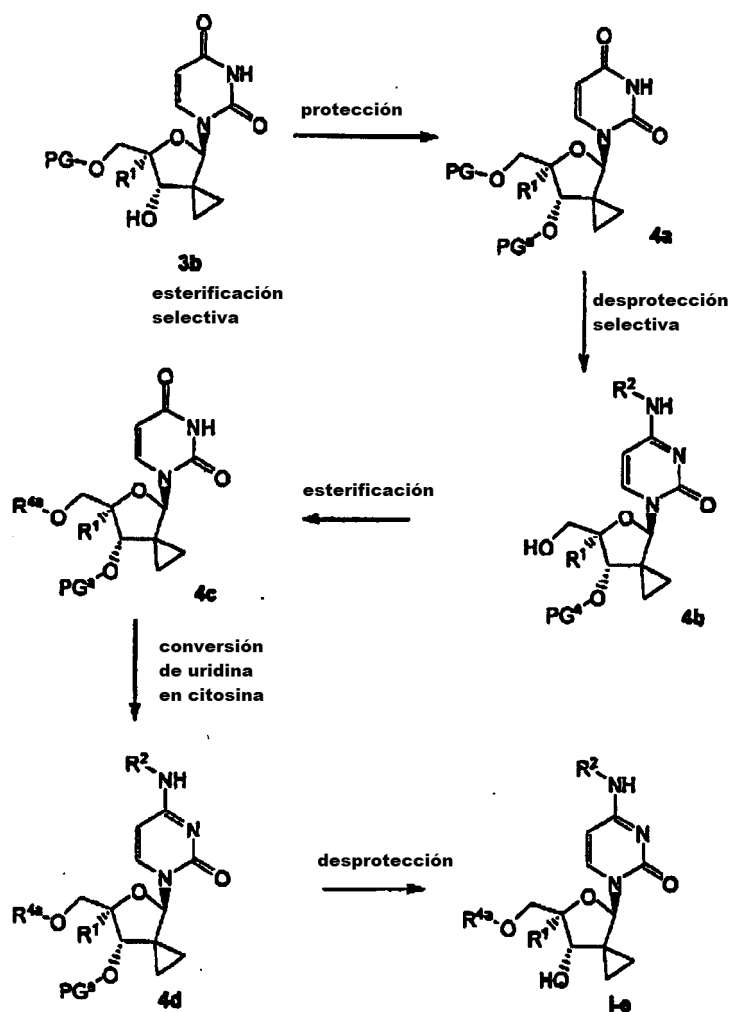
haciendo reaccionar un compuesto **1a** con un fósforo-cloridato **2a** en la presencia de una base, proporcionando un fósforo-amidato **1-b**:



- 5 (c) se prepara un compuesto de fórmula I, en la que R^3 es hidrógeno y R^4 es $-C(=O)R^5$ o $-C(=O)CHR^6-NH_2$, aquí representado por R^{4a} y dicho compuesto representado por la fórmula **I-c**; o R^3 y R^4 independientemente uno de otro son $-C(=O)R^5$ o $-C(=O)CHR^6-NH_2$, seguidamente representado por R^{3a} y respectivamente R^{4a} y dicho compuesto representado por la fórmula **I-d**; y en donde el grupo amino es $-C(=O)CHR^6-NH_2$ puede ser protegido con un grupo protector de amino que se puede eliminar posteriormente:
- 10 protegiendo selectivamente el grupo 5'-hidroxi en un compuesto intermedio **3a** proporcionando un compuesto intermedio **3b**, el cual a su vez es esterificado para dar un compuesto intermedio **3c**, seguido por una conversión de uracilo en citosina para dar un compuesto intermedio **3d**; desprotegiendo a este último para dar el 3'-monoéster **I-c**; o esterificando el 5'-hidroxi en **I-c** para dar un compuesto **I-d**; o
- 15 esterificando selectivamente el grupo 5'-hidroxi en un compuesto intermedio **3a** introduciendo de esta manera un grupo R^{4a} , dando como resultado un compuesto intermedio **3e**, y esterificando el compuesto intermedio **3e** subsiguientemente con un ácido diferente, introduciendo de esta manera un grupo R^{3a} , proporcionando un compuesto intermedio di-éster **3f**, que es sometido a una conversión de uracilo en citidina, para proporcionar un compuesto **I-d**:



(d) se prepara un compuesto de fórmula I en la que R^3 es hidrógeno y R^4 es R^{4a} como más arriba se ha especificado, siendo representado dicho compuesto por la fórmula I-e, protegiendo el hidroxilo libre en un compuesto intermedio **3b** con un grupo protector de hidroxilo que es dissociable selectivamente hacia el otro grupo protector de hidroxilo dando como resultado un compuesto intermedio **4a**; eliminando el grupo protector de 5'-hidroxilo proporcionando un compuesto intermedio **4b**; esterificando a este último para dar un compuesto intermedio **4c**, sometiendo a este último a una conversión de uracilo en citosina obteniendo de esta manera un derivado de citidina protegido en 4'-hidroxilo **4d**, que es desprotegido para proporcionar un compuesto I-e; como se representa en el siguiente esquema, en donde el grupo PG^a tiene los mismos significados que PG, pero se selecciona de manera tal que es dissociable selectivamente hacia el grupo PG:



Esquema 4: Síntesis de monoésteres

(e) se prepara un compuesto de fórmula I en la que R^{3a} y R^{4a} son iguales y son como más arriba se ha especificado, siendo representado dicho compuesto por la fórmula I-f, por esterificación de ambos grupos hidroxilo en un compuesto intermedio 3a:

