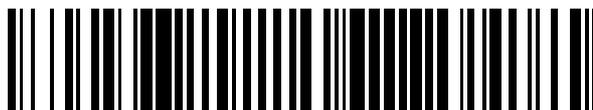


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 597**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7064 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2001 E 10175643 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 2251015**

54 Título: **Nucleósidos modificados para el tratamiento de infecciones víricas y proliferación celular anormal**

30 Prioridad:

18.10.2000 US 241488 P

06.04.2001 US 282156 P

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

07.05.2013

73 Titular/es:

GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)
c/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

STUYVER, LIEVEN y
WATANABE, KYOICHI A.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 402 597 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

Nucleósidos modificados para el tratamiento de infecciones víricas y proliferación celular anormal

Campo de la invención

La presente invención incluye compuestos para su uso en el tratamiento de infecciones por *Flaviviridae*.

5 **Antecedentes de la invención****Flavirididae**

El *Flaviviridae* es un grupo de virus de ARN monocatenarios positivos con un tamaño de genoma de unos 9 - 15 kb. Son virus encapsulados de aproximadamente 40 - 50 nm. Hay disponible un resumen de la taxonomía de los *Flaviviridae* en el International Committee for Taxonomy of Viruses. Los *Flaviviridae* constan de tres géneros.

10 1. Flavivirus. Este género incluye el grupo de virus de tipo Dengue (virus del Dengue, virus del Dengue de tipo 1, virus del Dengue de tipo 2, virus del Dengue de tipo 3, virus del Dengue de tipo 4), el grupo de virus de la encefalitis japonesa (Virus Alfuy, virus de la encefalitis japonesa, virus de Kookaburra, virus de Koutango, virus de Kunjin, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de Stratford, virus de Usutu, virus del Nilo occidental), el grupo de virus de Modoc, el grupo de virus de Rio Bravo (virus de Apoi, virus de Rio Brovo, virus de Saboya), el grupo de virus de Ntaya, el grupo de virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (virus de la encefalitis transmitida por garrapatas), el grupo de virus de Tyulenyi, el grupo de virus de Uganda S y el grupo de virus de la fiebre amarilla. Aparte de estos grupos principales, hay algunos Flavivirus adicionales no clasificados.

15 2. Hepacivirus. Este género sólo contiene una especie, el virus de la Hepatitis C (HCV), que está formado por muchas clases, tipos y subtipos.

20 3. Pestivirus. Este género incluye el Virus-2 de la diarrea vírica bovina (BVDV-2), Pestivirus de tipo 1 (incluyendo el BVDV), Pestivirus de tipo 2 (incluyendo el virus del cólera porcino) y Pestivirus de tipo 3 (incluyendo el virus de la enfermedad de Border).

25 Una de las infecciones por *Flaviviridae* más importante en seres humanos está causada por el virus de la hepatitis C (HCV). Esta es la segunda mayor causa de hepatitis vírica, con 170 millones de portadores estimados en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud; Hepatitis C: prevalencia global, Registro Epidemiológico Semanal, 1997, 72, 341), 3,9 millones de los cuales residen en los Estados Unidos (centros para el control de enfermedades; datos no publicados, <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/heptab3.htm>).

30 La organización genómica de los *Flaviviridae* comparte muchas características comunes. El genoma del virus de la hepatitis C (HCV) se usa a menudo como modelo. El HCV es un pequeño virus encapsulado con un ARN genómico monocatenario positivo de ~ 9,6 kb dentro de la nucleocápside. El genoma contiene un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una poliproteína de poco más de 3.000 aminoácidos, que es escindida para generar las proteínas víricas maduras estructurales y no estructurales. El ORF está flanqueado por regiones no traducidas en 5' y 3' (NTRs) de unos pocos cientos de nucleótidos de longitud, que son importantes para la traducción y la replicación del ARN. La poliproteína traducida contiene el núcleo estructural (C) y las proteínas de la cápsula (E1, E2, p7) en el N-terminal, seguido de las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Las proteínas estructurales maduras son generadas mediante escisión por la peptidasa de señalización del hospedador (véase: Hijikata, M. y col., Proc. Nat. Acad. Sci., EE.UU., 1991, 88, 5547; Hussy, P. y col., Virology, 1996, 224, 93; Lin, C. y col., J. Virol., 1994, 68, 5063; Mizushima, H. y col., J. Virol., 1994, 68, 2731; Mizushima, H. y col., J. Virol., 1994, 68, 6215; Santolini, E. y col., J. Virol., 1994, 68, 3631; Selby, M. J. y col., Virolog, 1994, 204, 114; y Grakoui, A. y col., Proc. Nat. Acad. Sci., EE.UU., 1993, 90, 10538). La unión entre la NS2 y la NS3 es escindida autocatalíticamente por la proteasa NS2/NS3 (véase: Hijikata, M. y col., J. Virol., 1993, 67, 4665 y Bartenschlager, R. y col., J. Virol., 1994, 68, 5045), mientras que las cuatro uniones restantes son escindidas por el dominio de la proteasa de serina N-terminal de la NS3 complejoado con la NS4A (véase: Failla, C. y col., J. Virol., 1994, 68, 3753; Lin, C. y col., J. Virol., 1994, 68, 8147; Tanji, Y. y col., J. Virol., 1995, 69, 1575 y Tai, C. L. y col., J. Virol., 1996, 70, 8477). La proteína NS3 también contiene la actividad de helicasa dependiente de NTP que desenrolla el dúplex de ARN durante la replicación. La proteína NS5B posee una actividad de polimerasa de ARN dependiente de ARN (RDRP) (véase: Behrens, S. E. y col., EMBO J., 1996, 15, 12; Lohmann, V. y col., J. Virol., 1997, 71, 8416 - 8428 y Lohmann, V. y col., Virology, 1998, 249, 108), que es esencial para la replicación vírica (Ferrari, E. y col., J. Virol., 1999, 73, 1649). Aquí es esencial enfatizar que, al contrario que el HBV o el HIV, no hay ADN implicado en la replicación del HCV. Recientemente, en experimentos *in vitro* usando NS5B, se estudió la especificidad de sustratos de la HCV-RDRP usando 5'-monofosfato de guanosina (GMP), 5'-difosfato (GDP), 5'-trifosfato (GTP) y el 5'-trifosfato de 2'-desoxi y 2',3'-didesoxi guanosina (dGTP y ddGTP, respectivamente). Los autores reivindicaron que la HCV-RDRP tiene una especificidad estricta para los 5'-trifosfatos de ribonucleósidos y se requieren los grupos 2' y 3'-OH. (Lohmann; Virology, 108). Sus experimentos sugieren que la presencia de sustituyentes en 2' y 3' sería el prerrequisito para que los 5'-trifosfatos de nucleósidos interactuaran con la HCV-RDRP y para que actúen como sustratos o inhibidores.

El documento WO 99/43691 desvela 2'-fluoronucleósidos para el tratamiento de infecciones de hepatitis B.

El documento WO 98/18324 desvela la identificación y el uso de análogos de ribonucleósidos naturales en genotecas para inducir una mutación en un virus de ARN con objeto de inhibir la replicación vírica.

5 Smee y col., (Antiviral Research, vol. 18, 1 de enero de 1992, páginas 151 - 162) desvelan 3'-fluoro-3'-desoxiadenosina y su actividad antivírica *in vitro* frente a varios virus transmitidos por artrópodos y a arenavirus.

El documento WO 02/18404 se publicó después de presentar esta solicitud y reivindica el beneficio de una fecha efectiva anterior. El documento WO 02/18404 desvela varios derivados de nucleósidos, que incluyen 3'-desoxiadenosina para el tratamiento de enfermedades mediadas por el virus de la Hepatitis C.

10 El documento WO 01/60315 se publicó después de los documentos de prioridad de la solicitud, pero reivindica el beneficio de una fecha efectiva anterior. El documento WO 01/60315 desvela 6-cloro-3'-desoxiguanosina para el tratamiento o la prevención de infecciones por *Flavivirus* en un hospedador que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de 6-cloro-3'-desoxiguanosina.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un compuesto y una composición para su uso en el tratamiento de un hospedador, incluyendo animales, y especialmente seres humanos, infectados por Flaviviridae.

15 Es un objetivo adicional proporcionar una composición para su uso en el tratamiento de un hospedador, incluyendo animales, y especialmente seres humanos, infectados de hepatitis C o por BVDV.

También se describe un procedimiento más eficaz para cuantificar la carga vírica, y en particular la carga de BVDV o de HCV, en un hospedador, incluyendo animales, y especialmente seres humanos.

Resumen de la invención

20 La presente invención proporciona compuestos, según se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de un hospedador infectado por un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*.

25 Específicamente, la invención también incluye compuestos para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo todos los miembros del género Hepacivirus (HCV), del género Pestivirus (BVDV, CSFV, BDV) o del género Flavivirus (virus del Dengue, grupo de virus de la encefalitis japonesa (incluyendo el virus del Nilo occidental) y el virus de la fiebre amarilla).

En una forma de realización, el nucleósido de la presente invención tiene una CE₅₀ (concentración eficaz para conseguir una inhibición vírica del 50%) cuando se ensaya en un ensayo celular apropiado, de menos de 15 micromolar, y más particularmente, de menos de 10 ó 5 micromolar. En una forma de realización preferida, el nucleósido está enriquecido enantioméricamente.

30 La actividad y la toxicidad de los compuestos descritos en este documento pueden evaluarse según cualquier procedimiento conocido. A continuación se proporciona un procedimiento eficiente para cuantificar la carga vírica en un hospedador usando una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real ("RT-PCR"). El procedimiento implica el uso de una molécula de sonda fluorescente amortiguada, que puede hibridar con el ADN o el ARN vírico objetivo. Después de la degradación exonucleolítica, puede monitorizarse una señal fluorescente detectable. Usando esta técnica puede detectarse en tiempo real ADN o ARN amplificado mediante RT-PCR mediante la monitorización de la presencia de señales fluorescentes.

35

Esta memoria descriptiva demuestra:

- (a) un procedimiento para cuantificar en tiempo real la carga vírica usando una RT-PCR, según se describe en este documento;
- 40 (b) un procedimiento para cuantificar en tiempo real la carga vírica de *Flaviviridae* en un hospedador, incluyendo BVDV y HCV, en un hospedador usando la RT-PCR, según se describe en este documento;
- (c) un procedimiento para cuantificar en tiempo real la carga vírica de BVDV en una línea celular MDBK o en una muestra de un hospedador usando la RT-PCR, según se describe en este documento;
- 45 (d) una molécula de sonda diseñada para emitir fluorescencia tras la degradación exonucleolítica y para que sea complementaria de la región de la NS5B de la NADL del BVDV, según se describe en este documento; y
- (e) una molécula de sonda con una secuencia de 5'-6-fam-AAATCCTCCTAACAAGCGGGTTCAGG-tamara-3' (ID. de Secuencia N° 1) y cebadores con una secuencia de sentido: 5'-AGCCTTCAGTTTCTTGCTGATGT-3' (ID. de Secuencia N° 2) y antisentido: 5'-TGTTGCGAAAGCACCAACAG-3' (ID. de Secuencia N° 3);
- 50 (f) un procedimiento para cuantificar en tiempo real la carga vírica de HCV en una muestra derivada de un hospedador o en una línea celular usando la RT-PCR, según se describe en este documento;

(g) una molécula de sonda diseñada para emitir fluorescencia tras la degradación exonucleolítica y para que sea complementaria de la región 5' no codificante del HCV, según se describe en este documento; y

(h) una molécula de sonda diseñada para emitir fluorescencia tras la degradación exonucleolítica y para que sea complementaria de la región codificante del HCV, según se describe en este documento; y

5 (i) una molécula de sonda diseñada para emitir fluorescencia tras la degradación exonucleolítica y para que sea complementaria de la región 3' no codificante del HCV, según se describe en este documento; y

(j) una molécula de sonda con una secuencia de 5'-6-fam-CCTCCAGGACCCCCCTCCC-tamara-3' (ID. de Secuencia N° 4) y cebadores con una secuencia de sentido: 5'-AGCCATGGCGTTAGTA(T/C)GAGTGT-3' (ID. de Secuencia N° 5) y antisentido: 5'-TTCCGCAGACCACTATGG-3' (ID. de Secuencia N° 6).

10 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un nucleósido de fórmula general I - b, o su enantiómero β-L, según se define en las reivindicaciones, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de un hospedador infectado por un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*.

15 También se desvela el uso de uno de los compuestos descritos en las reivindicaciones en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección vírica, según se prevé en este documento.

También se desvela una composición farmacéutica que incluye una cantidad antivíricamente eficaz de un nucleósido de la presente invención, o su sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable según la presente invención.

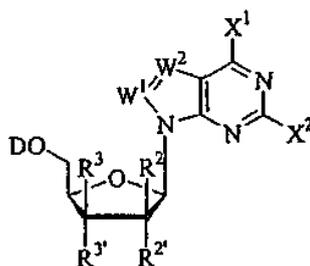
20 También se desvela una composición farmacéutica con un nucleósido de la presente invención, o su sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más de otros agentes antivíricamente o antiproliferativamente eficaces.

En otra divulgación se proporciona un procedimiento para la preparación de los nucleósidos de la presente invención, y su sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

25 En particular, la invención incluye los compuestos reivindicados para su uso en procedimientos para tratar o prevenir, o para su uso en la elaboración de un medicamento para una infección por *Flaviviridae*, incluyendo todos los miembros del género Hepacivirus (HCV), del género Pestivirus (BVDV, CSFV, BDV) o del género Flavivirus (virus del Dengue, grupo de virus de la encefalitis japonesa (incluyendo el virus del Nilo occidental) y el virus de la fiebre amarilla).

1. Compuestos de la divulgación

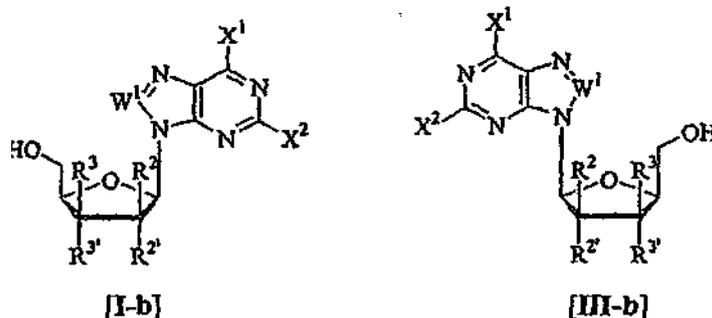
30 En una forma de realización, el nucleósido antivíricamente o antiproliferativamente eficaz es un nucleósido β-D de fórmula general [I - b], según se define en las reivindicaciones, o su enantiómero β-L:



[I - b]

35 En una forma de realización preferida de la invención, los nucleósidos β-D de fórmula general (I - b) y (III - b) están representados por los ejemplos proporcionados en la **Tabla 2**.

Tabla 2



ID	X ¹	X ²	W ¹	R ²	R ^{2'}	R ³	R ^{3'}
*DA	OH	NH ₂	N	H	OH	H	OH
DB	OH	NH ₂	CH	F	H	H	OH
DC	NH -ciclohexilo	H	CH	H	H	H	H
*DD	NH ₂	H	CH	H	OH	H	F
DE	NH ₂	H	CH	H	H	H	H
*DF	NH ₂	NH ₂	N	H	OH	H	OH
*DG	NH ₂	NH ₂	CH	H	OH	H	OH
DH	Cl	H	CH	F	H	H	H
*DI	Cl	I	CH	H	O-Ac	H	O-Ac
*DJ	Cl	H	CH	H	OH	H	OH
DK	NH ₂	H	CH	H	OH	H	H
DI	Cl	H	CH	H	OH	H	H

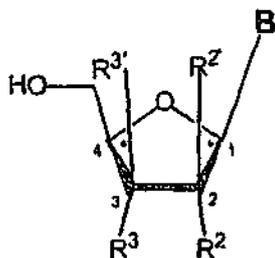
* no reivindicado

5 En una forma de realización, el nucleósido tiene una CE₅₀ (concentración eficaz para conseguir una inhibición vírica del 50%) cuando se ensaya en un ensayo celular apropiado, de menos de 15 micromolar, y más particularmente, de menos de 10 ó 5 micromolar. En una forma de realización preferida, el nucleósido está enriquecido enantioméricamente.

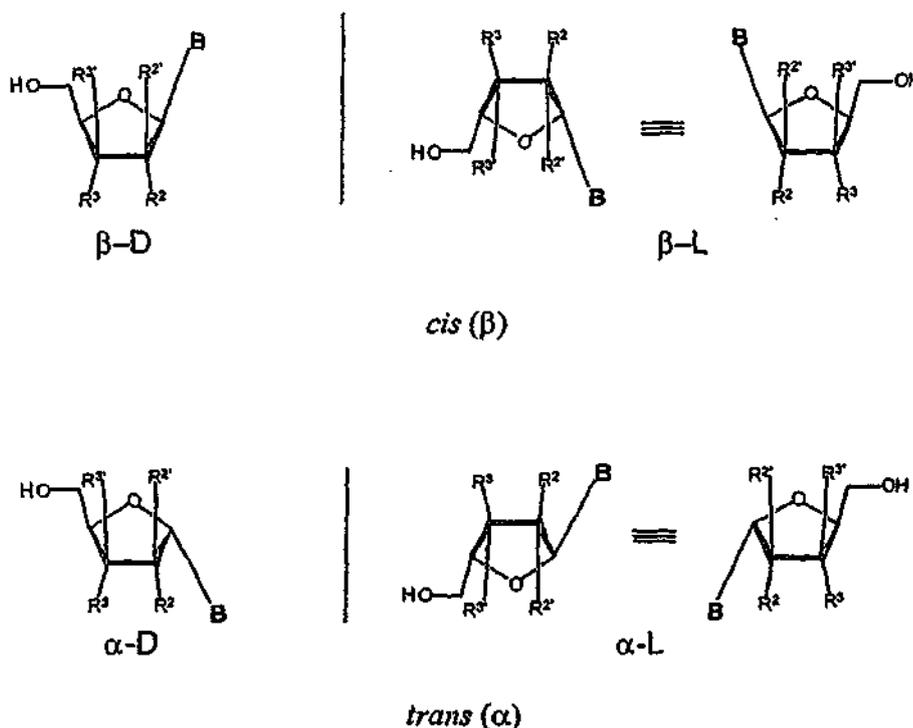
II. Estereoisomería y Polimorfismo

10 Los compuestos de la presente invención con un centro quiral pueden existir y aislarse en una forma ópticamente activa y en forma racémica. Algunos compuestos pueden mostrar polimorfismo. La presente invención engloba las formas racémicas, ópticamente activas, polimorfas o estereoisómeras, o mezclas de las mismas, de un compuesto de la invención, que posee las propiedades útiles descritas en este documento. Las formas ópticamente activas pueden prepararse, por ejemplo, mediante resolución de la forma racémica mediante técnicas de recristalización, mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral o mediante separación cromatográfica usando una fase estacionaria quiral o mediante resolución enzimática.

15 Según se muestra a continuación, un nucleósido contiene al menos dos átomos de carbono (*) quirales críticos. En general, los sustituyentes de los carbonos quirales [la base de purina o de pirimidina especificada (denominada sustituyente C1 cuando se usa la numeración del anillo de azúcar intermedio) y CH₂OH (denominado sustituyente C4)] del nucleósido puede ser *cis* (en el mismo lado) o *trans* (en lados opuestos) con respecto al sistema del anillo de azúcar. Tanto los racematos *cis* como *trans* consisten en un par de isómeros ópticos. Por lo tanto, cada compuesto tiene cuatro estereoisómeros individuales. Los cuatro estereoisómeros están representados por las siguientes configuraciones (cuando se orienta la fracción de azúcar en un plano horizontal de forma que la fracción O está en la parte de atrás): (1) *cis*, con ambos grupos "arriba", que se denomina β-D; (2) la imagen especular, es decir, *cis*, con ambos grupos "abajo", que es la imagen especular, se denomina β-L; (3) *trans*, con el sustituyente C4 "arriba" y el sustituyente C1 "abajo" (denominado α-D); y (4) *trans*, con el sustituyente C4 "abajo" y el sustituyente C1 "arriba" (denominado α-L). Los dos enantiómeros *cis* se denominan conjuntamente una mezcla racémica de enantiómeros β, y los dos enantiómeros *trans* enantiómeros se denominan una mezcla racémica de enantiómeros α.



Los cuatro posibles estereoisómeros de nucleósidos se ilustran a continuación.



5 La presente invención engloba los compuestos de fórmula I - b y sus enantiómeros β -L, según se define en las reivindicaciones.

III. Definiciones

10 El término "alquilo," según se usa en este documento, a menos que se indique de otro modo, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico, primario secundario o terciario, que incluye aquellos de C_1 a C_{16} , y específicamente incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, 1-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más restos seleccionados del grupo constituido por

15 alquilo, halo, haloalquilo, hidroxilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, derivados carboxilo, alquilamino, dialquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, azido, tiol, imina, ácido sulfónico, sulfato, sulfonilo, sulfanilo, sulfinilo, sulfamonilo, éster, ácido carboxílico, amida, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfina, tioéster, tioéter, haluro de ácido, anhídrido, oxima, hidrocina, carbamato, ácido fosfónico, fosfato, fosfonato, o cualquier otro grupo funcional viable que no inhiba la actividad farmacológica de este compuesto, ya sea desprotegido o protegido según sea necesario, como saben los expertos en la técnica, por ejemplo, según se enseña en Greene, y col., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

20 El término "alquilo inferior," según se usa en este documento, y a menos que se indique de otro modo, se refiere a un grupo alquilo de C_1 a C_4 saturado lineal, ramificado, o si fuera apropiado, cíclico (por ejemplo, ciclopropilo), incluyendo tanto formas sustituidas como no sustituidas.

25 El término "alquilenilo" o "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbodiilo saturado de configuración lineal o ramificada, incluyendo aquellos que tienen entre uno y diez átomos de carbono. Dentro del alcance de este término están incluidos metileno, 1,2-etanodiilo, 1,1-etanodiilo, 1,3-propanodiilo, 1,2-propanodiilo, 1,3-butanodiilo, 1,4-butanodiilo y similares. El grupo alquilenilo u otro resto divalente desvelado en este documento puede estar

opcionalmente sustituido con una o más o más restos seleccionados del grupo constituido por alquilo, halo, haloalquilo, hidroxilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, derivados carboxilo, alquilamino, azido, dialquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, tiol, imina, sulfonilo, sulfanilo, sulfinilo, sulfamonilo, éster, ácido carboxílico, amida, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfina, tioéster, tioéter, haluro de ácido, anhídrido, oxima, hidrozina, carbamato, ácido fosfónico, fosfonato, o cualquier otro grupo funcional viable que no inhiba la actividad farmacológica de este compuesto, ya sea desprotegido o protegido según sea necesario, como saben los expertos en la técnica, por ejemplo, según se enseña en Greene, y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley y Sons, segunda edición, 1991.

El término "arilo", según se usa en este documento, y a menos que se indique de otro modo, se refiere a fenilo, bifenilo o naftilo, y preferiblemente fenilo. El término incluye tanto restos sustituidos como no sustituidos. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más restos seleccionados del grupo constituido por bromo, cloro, flúor, yodo, hidroxilo, azido, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, ya sea desprotegido o protegido según sea necesario, como saben los expertos en la técnica, por ejemplo, según se enseña en Greene, y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley y Sons, segunda edición, 1991.

El término "aralquilo", según se usa en este documento, y a menos que se indique de otro modo, se refiere a un grupo arilo según se ha definido anteriormente unido a la molécula a través de un grupo alquilo, según se ha definido anteriormente. El término "alcarilo" o "alquilarilo", según se usa en este documento, y a menos que se indique de otro modo, se refiere a un grupo alquilo según se ha definido anteriormente unido a la molécula a través de un grupo arilo, según se ha definido anteriormente. En cada uno de estos grupos, el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido según se describió anteriormente, y el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más restos seleccionados del grupo constituido por alquilo, halo, haloalquilo, hidroxilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, azido, derivados carboxilo, alquilamino, dialquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, tiol, imina, sulfonilo, sulfanilo, sulfinilo, sulfamonilo, éster, ácido carboxílico, amida, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfina, tioéster, tioéter, haluro de ácido, anhídrido, oxima, hidrozina, carbamato, ácido fosfónico, fosfonato, o cualquier otro grupo funcional viable que no inhiba la actividad farmacológica de este compuesto, ya sea desprotegido o protegido según sea necesario, como saben los expertos en la técnica, por ejemplo, según se enseña en Greene, y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley y Sons, segunda edición, 1991. Dentro del alcance del término arilo están específicamente incluidos fenilo; naftilo; fenilmetilo; feniletilo; 3,4,5-trihidroxifenilo; 3,4,5-trimetoxifenilo; 3,4,5-trietoxifenilo; 4-clorofenilo; 4-metilfenilo; 3,5-di-terciariobutil-4-hidroxifenilo; 4-fluorofenilo; 4-cloro-1-naftilo; 2-metil-1-naftilmetilo; 2-naftilmetilo; 4-clorofenilmetilo; 4-t-butilfenilo; 4-t-butilfenilmetilo.

El término "alquilamino" o "arilamino" se refiere a un grupo amino que tiene uno o dos sustituyentes alquilo o arilo, respectivamente.

El término "halógeno", según se usa en este documento, incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "enriquecido enantioméricamente" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir un nucleósido que incluye al menos aproximadamente el 95%, preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97%, incluso más preferiblemente, al menos el 98%, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 99% o más, de un único enantiómero de ese nucleósido. Cuando se menciona un nucleósido con una configuración en particular (D o L) en esta memoria descriptiva, se supone que el nucleósido es un nucleósido enriquecido enantioméricamente, a menos que se indique de otro modo.

El término "hospedador", según se usa en este documento, se refiere a un organismo unicelular o pluricelular en el que puede replicarse el virus, incluyendo líneas celulares y animales, y preferiblemente un ser humano. Alternativamente, el hospedador puede ser portador de una parte del genoma vírico, cuya replicación o función pueden ser alteradas por los compuestos de la presente invención. El término hospedador se refiere específicamente a células infectadas, a células transfectadas con todo o parte del genoma vírico, y a animales, en particular, a primates (incluyendo chimpancés) y a seres humanos. Con respecto a la proliferación celular anormal, el término "hospedador" se refiere un organismo unicelular o pluricelular en el que puede simularse una proliferación celular. El término hospedador se refiere específicamente a células que proliferan de forma anormal, ya sea por causas naturales o no naturales (por ejemplo, por una mutación genética o mediante ingeniería genética, respectivamente), y a animales, en particular, a primates (incluyendo chimpancés) y a seres humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el hospedador es un paciente humano. Sin embargo, las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, se anticipan claramente mediante la presente invención (tales como la diarrea vírica bovina en ganado, el virus del cólera porcino en cerdos y el virus de la enfermedad de Border en ovejas).

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable de un compuesto que, tras su administración a un paciente, proporciona el compuesto activo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las obtenidas a partir de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Algunas sales adecuadas incluyen las obtenidas a partir de metales alcalinos tales como potasio y sodio, de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros

numerosos ácidos bien conocidos en el arte farmacéutico.

IV. Sales farmacéuticamente aceptables

5 En los casos en los que los compuestos son lo suficientemente básicos o ácidos como para formar sales de ácido o de base estables no tóxicas, puede ser apropiada la administración del compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Algunas sales adecuadas incluyen las obtenidas a partir de metales alcalinos tales como potasio y sodio, de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica. En particular, algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales orgánicas de adición de ácidos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metansulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También pueden formarse algunas sales inorgánicas adecuadas, incluyendo las sales sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante reacción de un compuesto lo suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido adecuado que aporte un anión fisiológicamente aceptable. También pueden elaborarse sales de ácidos carboxílicos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio).

V. Composiciones farmacéuticas

20 Las composiciones farmacéuticas basadas en un compuesto β -D de fórmula I - b o su enantiómero β -L o su sal farmacéuticamente aceptable, pueden prepararse en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar una infección vírica por *Flaviviridae*, opcionalmente junto con un aditivo, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según la infección o la dolencia que se va a tratar, su gravedad, el régimen de tratamiento que se va a emplear, la farmacocinética del agente usado, así como el paciente tratado.

25 En un aspecto según la presente divulgación, el compuesto según la presente invención se formula preferiblemente en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, es preferible administrar la composición farmacéutica en una forma administrable por vía oral, pero las formulaciones pueden administrarse por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, bucal, subcutánea, en supositorios o por otra vía. Las formulaciones por vía intravenosa e intramuscular se administran preferiblemente en disolución salina estéril. El experto habitual en la técnica puede modificar la formulación según las enseñanzas de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una vía de administración en particular sin hacer que las composiciones de la presente invención sean inestables ni comprometer su actividad terapéutica. En particular, una modificación para que un compuesto deseado sea más soluble en agua o en otro vehículo, por ejemplo, puede conseguirse fácilmente mediante una modificación rutinaria (formulación salina, esterificación, etc.).

35 En ciertas formas farmacéuticas, se prefiere la forma de profármaco del compuesto, incluyendo especialmente los derivados acilados (acetilados u otros) y éter, los ésteres de fosfato y diversas formas salinas de los presentes compuestos. El experto habitual en la técnica reconocerá cómo modificar fácilmente el presente compuesto hacia una forma de profármaco para facilitar la administración del compuesto activo en un sitio objetivo dentro del organismo hospedador o del paciente. El artesano también aprovechará los parámetros farmacocinéticos favorables de la forma de profármaco, cuando sea aplicable, para la administración del compuesto deseado en un sitio objetivo dentro del organismo hospedador o del paciente, para maximizar el efecto pretendido del compuesto en el tratamiento de una infección por *Flaviviridae* (incluyendo el HCV).

45 La cantidad de compuesto incluida en las formulaciones terapéuticamente activas, según la presente invención, es una cantidad eficaz para tratar un *Flaviviridae* (incluyendo el HCV). En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto en una forma de dosificación farmacéutica varía habitualmente entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo del compuesto usado, de la dolencia o la infección tratada y de la vía de administración. Para los fines de la presente invención, una cantidad profilácticamente o preventivamente eficaz de las composiciones según la presente invención, está en el mismo intervalo de concentración establecido anteriormente para una cantidad terapéuticamente eficaz y habitualmente es el mismo que una cantidad terapéuticamente eficaz.

50 La administración del compuesto activo puede variar desde continua (goteo intravenoso) hasta varias administraciones orales al día (por ejemplo, Q.I.D., B.I.D., etc.) y pueden incluir la vía oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que pueden incluir un agente incrementador de la penetración), bucal y con supositorios, entre otras vías de administración. También pueden usarse comprimidos orales con cubierta entérica para mejorar la biodisponibilidad y la estabilidad de los compuestos en una vía de administración oral. La forma farmacéutica más eficaz dependerá de la farmacocinética del agente en particular elegido, así como de la gravedad de la enfermedad del paciente. Las formas farmacéuticas orales son particularmente preferidas debido a la facilidad de administración y al potencial cumplimiento favorable por parte del paciente.

- Para preparar las composiciones farmacéuticas según la presente invención, se mezcla preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos según la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable, según las técnicas de combinación farmacéutica convencionales, para producir una dosis. El vehículo puede tomar una gran diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para su administración, por ejemplo, oral o parenteral. Para preparar las composiciones farmacéuticas en una forma farmacéutica oral puede usarse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. Por lo tanto, para preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, elixires y disoluciones, pueden usarse vehículos y aditivos adecuados que incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para preparaciones sólidas orales tales como polvos, comprimidos, cápsulas, y para preparaciones sólidas tales como supositorios, pueden usarse vehículos y aditivos adecuados que incluyen almidones, vehículos de azúcar tales como dextrosa, manitol, lactosa y vehículos relacionados, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Si se desea, los comprimidos o las cápsulas pueden recubrirse entéricamente para una liberación sostenida mediante técnicas estándar. El uso de estas formas de dosificación puede afectar significativamente a la biodisponibilidad de los compuestos en el paciente.
- Para formulaciones parenterales, el vehículo comprenderá habitualmente agua estéril o una disolución acuosa de cloruro sódico, aunque también pueden incluirse otros ingredientes, incluyendo aquellos que ayudan a la dispersión. Cuando va a usarse agua estéril y a mantenerse estéril, las composiciones y los vehículos también deben esterilizarse. También pueden prepararse suspensiones inyectables, en cuyo caso pueden emplearse vehículos líquidos, agentes suspensiones y similares apropiados.
- También pueden prepararse suspensiones de liposomas (incluyendo liposomas dirigidos a antígenos víricos) mediante procedimientos convencionales para producir vehículos farmacéuticamente aceptables. Esto puede ser apropiado para la administración de los compuestos nucleosídicos según la presente invención.

En formas de realización particularmente preferidas según la presente invención, los compuestos y las composiciones se usan para tratar, prevenir o retrasar la aparición de una infección por *Flaviviridae* (incluyendo el HCV). Preferiblemente, para tratar, prevenir o retrasar la aparición de una infección o dolencia, las composiciones se administrarán en una forma farmacéutica oral en unas cantidades que varían desde aproximadamente 250 microgramos hasta aproximadamente 1 gramo o más al menos una vez al día, preferiblemente, o hasta cuatro veces al día. Los presentes compuestos se administran preferiblemente por vía oral, pero pueden administrarse por vía parenteral, tópica o en forma de supositorio.

Los compuestos según la presente invención, debido a su baja toxicidad hacia las células hospedadoras, en ciertos casos pueden emplearse ventajosamente profilácticamente para prevenir una infección por *Flaviviridae* (incluyendo el HCV) o para prevenir la aparición de los síntomas clínicos asociados con dicha infección vírica o dolencia. Por lo tanto, la presente invención también incluye compuestos para su uso en procedimientos para el tratamiento profiláctico de una infección por *Flaviviridae* (incluyendo HCV). En este aspecto, según la presente invención, las presentes composiciones se usan para prevenir o retrasar la aparición de una infección por *Flaviviridae* (incluyendo el HCV). Este procedimiento profiláctico comprende la administración a un paciente en necesidad de dicho tratamiento, o que está en riesgo de desarrollar un virus o una dolencia, de una cantidad de un compuesto según la presente invención eficaz para aliviar, prevenir o retrasar la aparición de la infección vírica o la dolencia. En el tratamiento profiláctico según la presente invención, se prefiere que el compuesto antivírico o antiproliferativo utilizado sea de baja toxicidad, y preferiblemente, no tóxico para el paciente. Se prefiere particularmente en este aspecto de la presente invención que el compuesto que se use tenga una eficacia máxima frente al virus o la dolencia, y debería mostrar una toxicidad mínima para el paciente. En el caso de una infección por *Flaviviridae* (incluyendo el HCV), los compuestos según la presente invención, que pueden usarse para tratar estos estados patológicos, pueden administrarse en el mismo intervalo de dosificación para el tratamiento terapéutico (es decir, aproximadamente 250 microgramos hasta 1 gramo o más entre una y cuatro veces al día para una forma de dosificación oral) como un agente profiláctico para prevenir la proliferación de la infección por *Flaviviridae* (incluyendo el HCV), o como alternativa, para prolongar la aparición de una infección por *Flaviviridae* (incluyendo el HCV), que se manifieste con síntomas clínicos.

Además, los compuestos según la presente invención pueden administrarse en combinación o alternancia con uno o más antivíricos, anti-HBV, anti-HCV o agentes antiherpéticos o interferón, agentes antineoplásicos o antibacterianos, incluyendo otros compuestos de la presente invención. Ciertos compuestos según la presente invención pueden ser eficaces para mejorar la actividad biológica de ciertos agentes según la presente invención mediante la reducción del metabolismo, del catabolismo o la inactivación de otros compuestos, y como tales, son coadministrados para este efecto pretendido.

Esta invención se ilustra adicionalmente en las siguientes secciones. Las secciones de Detalles Experimentales y de Ejemplos contenidas en la misma se establecen para ayudar a la comprensión de la invención.

VI. Terapias para el tratamiento de una infección por *Flaviviridae*

Se ha advertido que pueden surgir variantes de virus resistentes a fármacos tras un tratamiento prolongado con un agente antivírico. La resistencia a fármacos se produce muy típicamente por mutación de un gen que codifica para

una enzima usada en el ciclo de replicación vírico, y muy típicamente en el caso del HCV, la polimerasa de ARN dependiente de ARN. Se ha demostrado que la eficacia de un fármaco frente a una infección vírica puede prolongarse, aumentarse o recuperarse mediante la administración del compuesto en combinación o alternancia con un segundo, y quizás un tercer, compuesto antivírico que induzca una mutación diferente a la provocada por el fármaco principal. Alternativamente, puede alterarse la farmacocinética, la biodistribución u otro parámetro del fármaco mediante dicha terapia de combinación o alternancia. En general, típicamente se prefiere la terapia de combinación sobre la terapia alternante ya que induce múltiples estreses simultáneos en el virus.

Algunos ejemplos de agentes que se han identificado como activos frente al virus de la hepatitis C, y que por lo tanto pueden usarse en combinación o alternancia con uno o más nucleósidos de fórmula general I - b o su enantiómero β -L incluyen:

(a) interferón y ribavirina (Battaglia, A. M. y col., Ann. Pharmacother. 2000, 34, 487; Berenguer, M. y col., Antivir. Ther. 1998, 3 (Supl. 3), 125);

(b) inhibidores de la proteasa de NS3 basados en sustrato (Attwood y col., documento PCT WO 98/22496, 1998; Attwood y col., Antiviral Chemistry y Chemotherapy 1999, 10, 259; Attwood y col., Publicación de Patente Alemana DE 19914474; Tung y col., documento PCT WO 98/17679), incluyendo alfacetoamidas e hidracinouras, e inhibidores que terminan en un electrófilo tal como ácido borónico o fosfonato (Llinas-Brunet y col., documento PCT WO 99/07734);

(c) inhibidores no basados en sustrato tales como derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitrobenzamida (Sudo K. y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 238, 643, y Sudo K. y col., Antiviral Chemistry y Chemotherapy 1998, 9, 186), incluyendo RD3-4082 y RD3-4078, el primero sustituido en la amida con una cadena de 14 carbonos, y el último procesando un grupo para-fenoxifenilo;

(d) derivados de tiazolidina que muestren la pertinente inhibición en un ensayo de HPLC en fase inversa con una proteína de fusión NS3/4A y un sustrato NS5A/5B (Sudo K. y col., Antiviral Research 1996, 32, 9), especialmente el compuesto RD-1-6250, que posee un resto cinamoilo condensado sustituido con una cadena alquímica larga, RD4 6205 y RD4 6193;

(e) tiazolidinas y benzanilidas identificadas en Kakiuchi N. y col., J. EBS Letters 421, 217, y en Takeshita N. y col., Analytical Biochemistry 1997, 247, 242;

(f) una fenantrenoquinona que posee actividad frente a la proteasa del HCV en una SDS-PAGE y un ensayo de autorradiografía aislada partir del caldo de cultivo de fermentación de una especie de *Streptomyces*, Sch 68631, (Chu M. y col., Tetrahedron Letters 1996, 37, 7229), y Sch, 351633, aislada a partir del hongo *Penicillium griseofulvum*, que demuestre su actividad en un ensayo de centelleo por proximidad (Chu M. y col., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9, 1949);

(g) inhibidores selectivos de la NS3 basados en la macromolécula elgin c, aislada a partir de sanguijuelas (Qasim M.A. y col., Biochemistry 1997, 36,1598);

(h) inhibidores de la helicasa del HCV (Diana G. D. y col., Patente de EE.UU. Nº 5.633.358 y Diana G. D. y col., documento PCT WO 97/36554);

(i) inhibidores de la polimerasa del HCV tales como análogos de nucleótidos, gliotoxina (Ferrari R. y col., Journal of Virology 1999, 73, 1649), y el producto natural cerulenina (Lohmann V. y col., Virology 1998, 249, 108);

(j) oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido (S-ODN) complementarios de al menos una porción de una secuencia del HCV (Anderson y col., Patente de EE.UU. Nº 6,174,868), y en particular de segmentos de la secuencia en la región no codificante 5' (NCR) (Alt M. y col., Hepatology 1995, 22, 707), o los nucleótidos 326 - 348 que comprenden el extremo 3' de la NCR y los nucleótidos 371 - 388 ubicados en la región codificante del núcleo del ARN del HCV (Alt M. y col., Archives of Virology 1997, 142, 589, y Galderisi U. y col., Journal of Cellular Physiology 1999, 81:2151);

(k) inhibidores de la traducción dependiente de IRES (Ikeda N y col., Publicación de Patente Japonesa JP-08268890; Kai Y. y col., Publicación de Patente Japonesa JP-10101591);

(l) ribozimas resistentes a nucleasa (Maccjak D.J. y col., Hepatology 1999, 30, resumen 995);

(m) amantadina, tal como rimantadina (Smith, resumen del Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and AASLD, 1996);

(n) quinolonas, tales como ofloxacino, ciprofloxacino y levofloxacino (AASLD Abstracts, Hepatology, octubre de 1994, edición del programa 20 (4), p. 2, resumen nº 293);

(o) análogos de nucleósidos (Ismaili y col., documento WO 01/60315; Storer, documento WO 01/32153), incluyendo 2'-desoxi-L-nucleósidos (Watanabe y col., documento WO 01/34618), y 1-(β -L-ribofuranosil)-1,2,4-

triazol-3-carboxamida (Levovirin™) (Tam, documento WO 01/46212); y

(p) otros compuestos diversos incluyendo 1-amino-alkilciclohexanos (Gold y col., Patente de EE.UU. N° 6.034.134), alquil-lípidos (Chojkier y col., Patente de EE.UU. N° 5.922.757), vitamina E y otros antioxidantes (Chojkier y col., Patente de EE.UU. N° 5.922.757), escualeno, ácidos biliares (Ozeki y col., Patente de EE.UU. N° 5.846.964), N-(fosfonoacetil)-L-ácido aspártico, (Diana y col., Patente de EE.UU. N° 5.830.905), bencenodioxamidas (Diana y col., Patente de EE.UU. N° 5.633.388), derivados del ácido poliadenílico (Wang y col., Patente de EE.UU. N° 5.496.546), 2',3'-didesoxiinosina (Yarchoan y col., Patente de EE.UU. N° 5.026.687), benzoimidazoles (Colacino y col., Patente de EE.UU. N° 5.891.874), glucaminas (Mueller y col., documento WO 01/08672), compuestos de 1,5-imino-D-glucitol sustituidos (Mueller y col., documento WO 00/47198).

VII Protocolo sintético

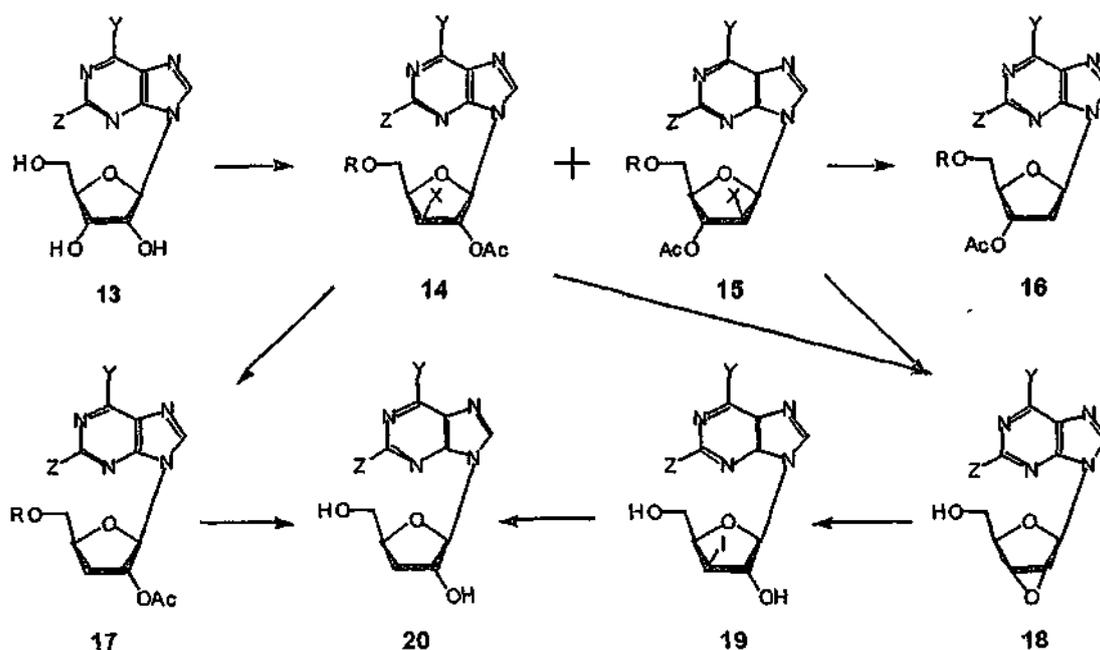
Los compuestos de fórmula [I - b] o su enantiómero β -L pueden sintetizarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. En particular, los compuestos pueden elaborarse mediante tres rutas distintas: (a) a partir de un nucleósido preformado, (b) condensación de un azúcar modificado o de una ribosa no modificada con purina o pirimidina, y (c) combinación las dos rutas. Dado que la estructura de la 3-desoxi-D-eritropentofuranosa se encuentra en el antibiótico nucleósido cordicepina, se informado de varias síntesis totales de este antibiótico durante los años 60 (véase: Lee, W. W. y col., J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 1906; Walton, E. y col., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 2952; Suhadolnik, R. J. y col., Carbohidr. Res., 1968, 61, 545; Ikehara, M. y col., Chem. Pharm. Bull., 1967, 15, 94; Kaneko, M. y col., Chem. Pharm. Bull. 1972, 20, 63). En una forma de realización preferida de la invención, la preparación de 3'-desoxinucleósidos a partir de nucleósidos preformados se realiza las siguientes formas;

A. Compuestos de los tipos I - b

(i) Un ejemplo para la preparación del compuesto de tipo I - b, nucleósido de purina, es la síntesis de nucleósidos de 3'-desoxipurina (**Esquema 3**). El ribonucleósido **13** se trata con un haluro de 2-metoxiisobutirilo (X = Cl o Br) para dar una mezcla de derivados de 3'-halogeno-xilofuranosilo y 2'-halogeno-arabinofuranosilo (**14** y **15**). La hidrogenolisis, seguida de una separación cromatográfica, proporciona el correspondiente 3'-desoxinucleósido **17** junto con el 2'-desoxinucleósido **16**. La saponificación de **17** da el deseado 3'-desoxinucleósido **20**. El tratamiento de la mezcla de reacción de **14** y **15** con una base da el epóxido individual **18** con rendimiento cuantitativo, que, tras un tratamiento con amonio o yoduro sódico proporciona exclusivamente el 3'-xilo-yoduro **19**. La hidrogenolisis de **19** proporciona **20**. La reducción de **18** con un agente reductor tal como níquel-Raney, hidruro de litio y aluminio o borhidruro sódico también produce **20**.

De una forma similar, partiendo de un L-ribonucleósido de purina puede sintetizarse el homólogo del L-nucleósido de **20**.

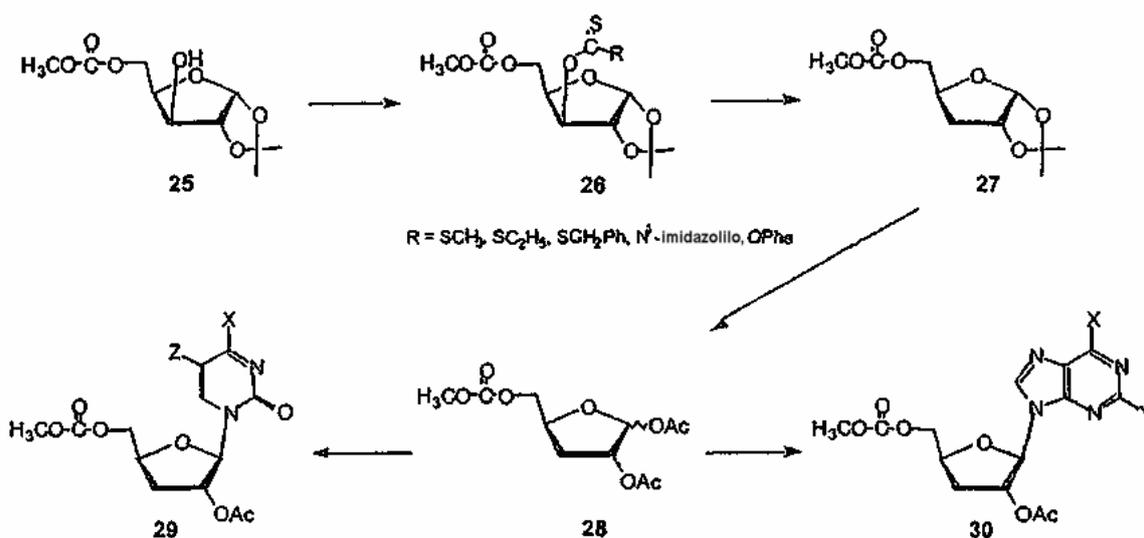
Esquema 3



(ii) Síntesis mediante condensación de un azúcar apropiado con una base.

Los derivados de azúcar apropiados deben prepararse mediante condensación con la base seleccionada. Aunque existen varios procedimientos para la síntesis de derivados de 3-desoxi-D-eritropentofuranosa (3-desoxi-D-ribofuranosa) (véase: Lee, W. W. y col., J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 1906; Walton, E. y col., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 2952; Lin, T. - S. y col., J. Med. Chem., 1991, 34, 693; Ozols, A. M. y col., Synthesis, 1980, 557), se desarrollaron nuevos procedimientos para la presente invención según se muestra en el **Esquema 5**.

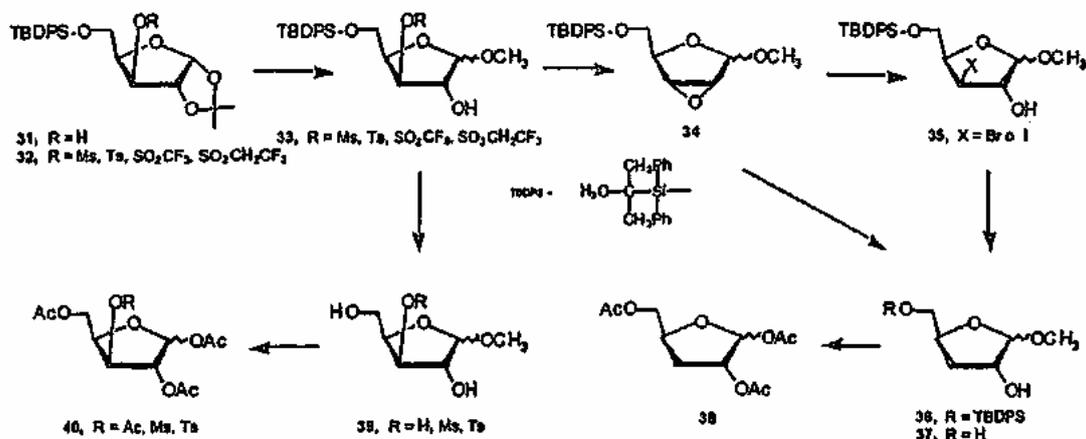
Esquema 5



Se convierte 1,2-O-isopropiliden-5-O-metoxycarbonil- α -D-xilo-furanosa (**25**) en el correspondiente derivado 3-tiocarbonilo **26**, seguido de una desoxigenación con radicales libres usando hidruro de trialquilestaño en presencia de un iniciador radicalico, tal como 2,2'-azobisisobutironitrilo. El producto desoxigenado **27** se acila con una mezcla de ácido acético, anhídrido acético y ácido sulfúrico para dar **28**, que se condensa entonces con una base sililada usando el procedimiento de Vorbruggen (véase: Niedballa, U. y col., J. Org. Chem., 1976, 41, 2084; Vorbruggen, H. y col., Chem. Ber., 1981, 114, 1234; Kazinierczuk, Z. y col., J. Am. Chem. Soc., 1984, 106, 6379) para obtener el nucleósido de pirimidina **29** o un nucleósido de purina relacionado (de tipo I - b). El grupo 5-OH puede protegerse alternativamente con otros grupos acilo, tales como benzoílos, *p*-nitrobenzoílos, *p*-clorobenzoílos o *p*-metoxibenzoílos, así como con otros grupos sililo, tales como grupos *t*-butildimetilsililo o *t*-butildifenilo. De forma análoga, la L-xilosa puede convertirse en el L-azúcar homólogo de **25**, que puede derivatizarse adicionalmente para conseguir el L-nucleósido de **30**.

Alternativamente, según se muestra en el Esquema 6, puede sulfonilarse 1,2-O-isopropiliden-5-O-(*t*-butildifenilsililo)- α -D-xilofuranosa (**31**) con cloruro de mesilo, cloruro de tosilo o cloruro de tresilo en piridina para obtener **32**. Después de una metanolisis de **32**, el metil xilósido **33** puede tratarse con una base, tal como metóxido sódico en metanol, para proporcionar el ribo-epóxido **34**. La apertura del epóxido **34** con hidruro de litio y aluminio estereoselectivamente produce 3-desoxi azúcar **36**. El tratamiento de **34** con bromuro de litio o yoduro sódico en acetona o 2-butanona da el 3-halogeno-3-desoxi xilósido **35**. La deshalogenación reductora de **35** proporciona **36**. La eliminación del grupo protector 5'-sililo con una fuente de ión fluoruro, tal como fluoruro de tri-*n*-butilamonio en tetrahydrofurano o hidrogenofluoruro de trietilamonio, da **37**. La acilación de **37** con anhídrido acético y ácido acético en presencia de ácido sulfúrico da tri-O-acetil-3-desoxi-D-ribofuranosa **38**. También, el tratamiento con fluoruro convierte **33** en **39**, que tras una acetilación, proporciona **40**. Estos azúcares acetilados **38** y **40** pueden condensarse con bases de purina o de pirimidina pertrimetilsililadas usando el procedimiento de Vorbruggen, para dar el nucleósido modificado en 3'. El grupo protector *t*-butildifenilsililo puede ser sustituido por el grupo *t*-butildimetilsililo.

Esquema 6



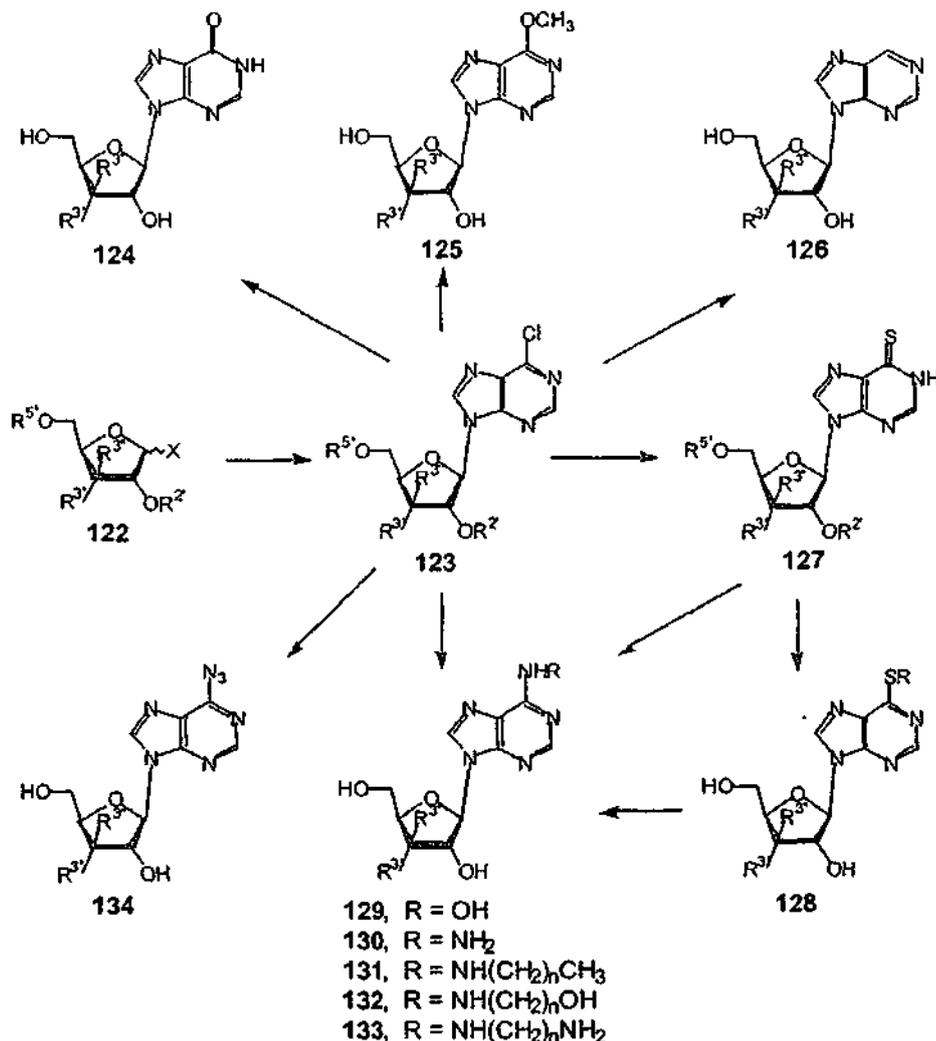
(a) Modificación en el C-6 de nucleósidos de purina (I - b y III - b)

5 El compuesto **28** o **38** se convierte en halogenada **122** (Esquema 18) mediante tratamiento con cloruro de hidrógeno o bromuro de hidrógeno en ácido acético o bromuro de hidrógeno en diclorometano, y condensando con 6-cloropurina mediante el procedimiento de sodio en acetonitrilo, proporciona el 3'-desoxinucleósido **123**. El tratamiento con sodio acuoso o hidróxido potásico de **123** da la 3'-desoxiinosina (**124**). El tratamiento de **123** con metóxido sódico en metanol proporciona la 6-O-metil-3'-desoxiinosina (**125**). Una leve saponificación, seguida de una hidrogenolisis catalítica de **123** da como resultado la producción de 3'-desoxinebularina (**126**). La tiourea reacciona con **123** para dar un nucleósido de 6-tiopurina **127**, que es S-alkilado hasta **128**. Los compuestos **123**, **127** y **128** reaccionan fácilmente con diversas aminas, hidroxilamina, hidrazina y aminoalcoholes para dar los análogos de 3'-desoxiadenosina **129** - **133**. El tratamiento de **123** con azida sódica da el nucleósido de 6-azidopurina **134**.

Puede aplicarse la misma secuencia de reacciones a los correspondientes L-nucleósidos III - b.

15

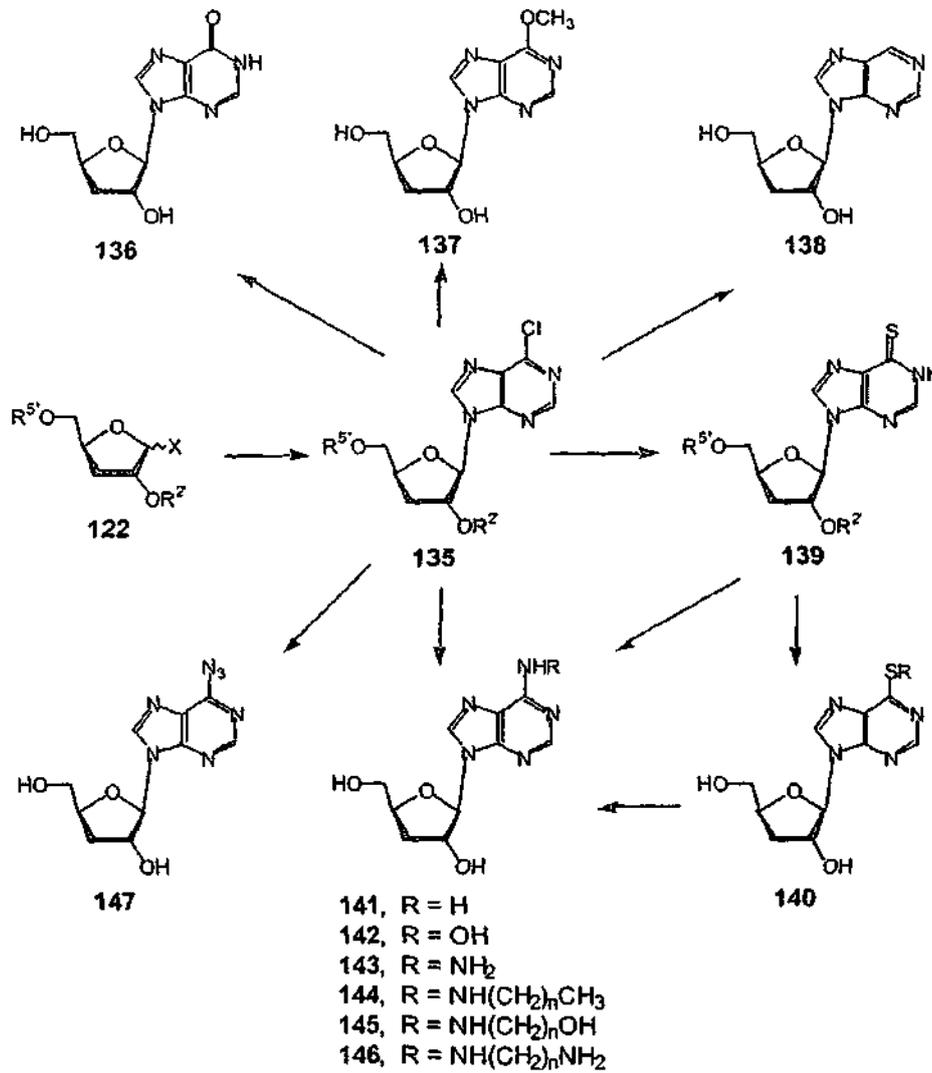
Esquema 18



Estos compuestos también pueden sintetizarse mediante un tratamiento con ácido nitroso del nucleósido de 6-hidrazidopurina **130**. La reducción de **129**, **130** ó **134** da la 3'-desoxiadenosina (es decir, cordicepina). Se espera que el compuesto **125** o la cordicepina sean convertidos *in vivo* en **124** mediante acción de la desaminasa de adenosina. El nucleósido de purina no sustituido en 6 **126** puede oxidarse *in vivo* a **124**.

La condensación de **122** con 6-cloropurina sustituida en 2 da el análogo sustituido en 2 de **123**. La funcionalidad 6-cloro puede convertirse en varios grupos funcionales mediante reacciones de sustitución nucleófila. Por lo tanto, la 2-amino-6-cloropurina se convierte en **135** (Esquema 19), que puede convertirse en varios nucleósidos de 2-aminopurina (**136** - **147**). Debería mencionarse que los nucleósidos 2,6-diamino (**141**) y 2-aminopurina (**138**) son potenciales precursores de la 3'-desoxiguanosina (**136**). De una forma similar, pero partiendo de los análogos L-nucleósido, se preparan los correspondientes nucleósidos III - b.

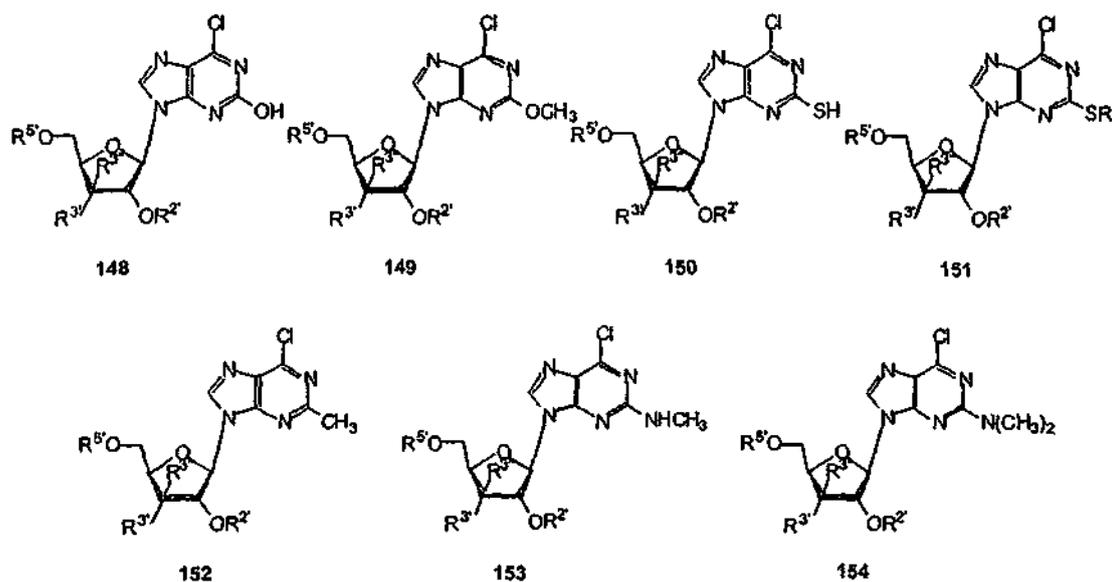
Esquema 19



De una forma similar se sintetizan nucleósidos de 2-oxo, 2-metoxi, 2-tio, 2-alkilmercapto, 2-metil, 2-metilamino o 2-dimetilaminopurina (**148 - 154**) (**Esquema 20**). También, de una manera similar pero usando los correspondientes L-nucleósidos, se preparan los compuestos de tipo III - b.

5

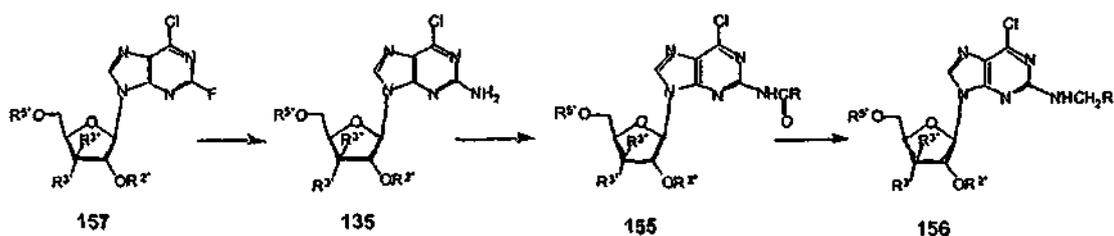
Esquema 20



(b) Modificación en el C-2 de nucleósidos de purina (I - b y III - b.)

El grupo 2-amino de **135 - 147** puede modificarse para obtener **155** (Esquema 21) mediante acilación con diversos haluros de alcanoilo o de aroilo. Entonces, **155** puede derivatizarse adicionalmente en el correspondiente derivado 2-alkilamino o 2-aryl amino **156** mediante reducción con un complejo de borano-amina (Sergueeva, Z. A. y col., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2000, 19, 275). Alternativamente, el grupo 2-amino del compuesto **135** puede ser sustituido experimentando una reacción de Schiemann, diazotizando en presencia de fluoroborato, seguido de una descomposición térmica, para dar el nucleósido de 2-fluoro-6-cloropurina **157**. Adicionalmente, el sustituyente 6-cloro de estos nucleósidos puede ser desplazado con diversos reactivos nucleófilos según se ha descrito anteriormente. Debería mencionarse que la presencia del sustituyente 2-fluoro protege al grupo 6-amino del ataque de la desaminasa de adenosina.

Esquema 21

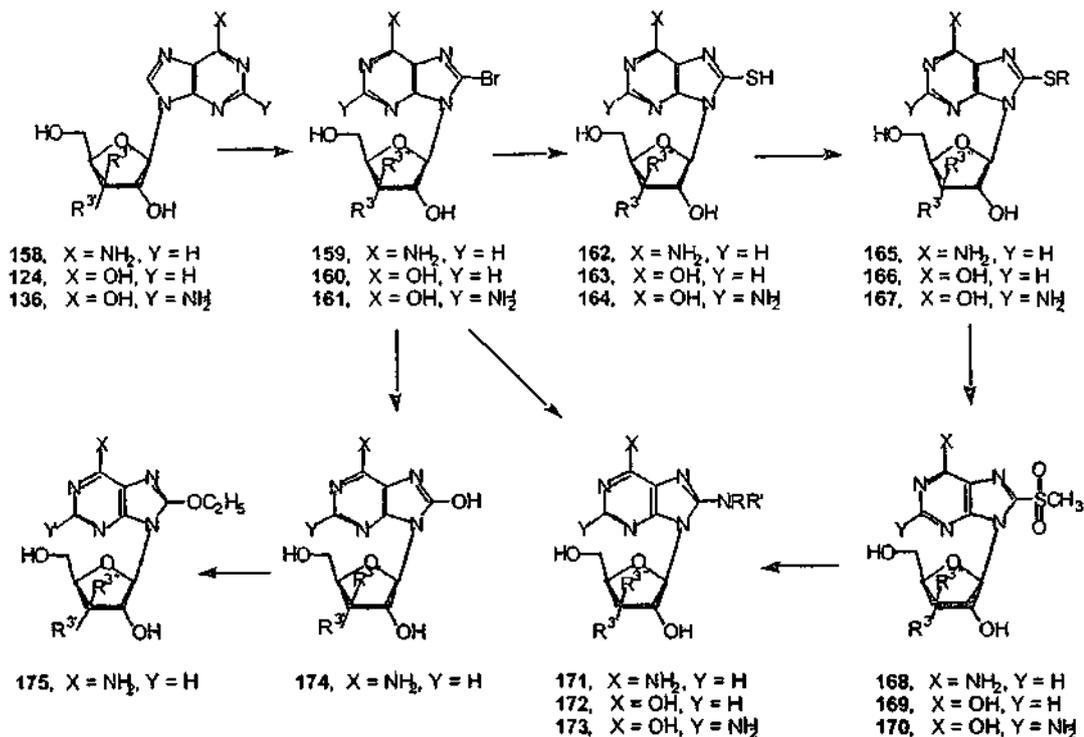


(c) Modificación en el C-8 de nucleósidos de purina (I - b)

Debería mencionarse que la modificación de la posición 8 de los nucleósidos de purina es importante, ya que la sustitución en esta posición altera la conformación preferida de los nucleósidos hacia *sin*.

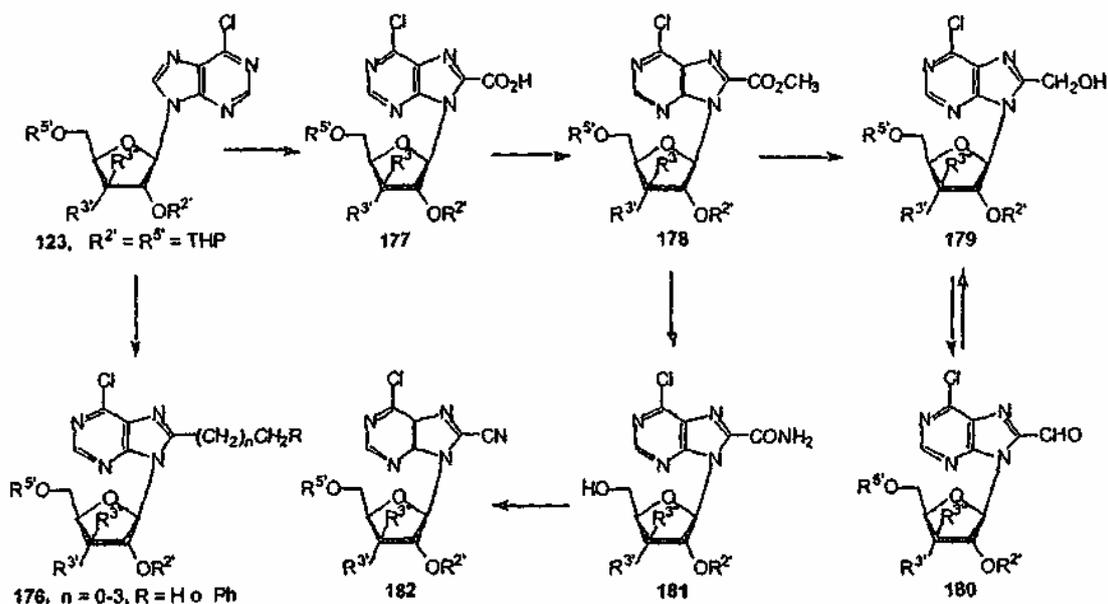
La cordicepina (**158**, $R^3 = R^{3'} = H$), la 3'-desoxiinosina (**124**, $R^3 = R^{3'} = H$) y la 3'-desoxiguanosina (**136**, $R^3 = R^{3'} = H$) pueden bromarse en la posición C-8 mediante tratamiento con bromo en ácido acético en presencia de acetato sódico a **159 - 161** (Esquema 22). El sustituyente bromo en C-8 en **159 - 161** puede ser sustituido por azufre mediante la acción de tiourea para obtener **162 - 164**, que puede ser alquilado o aralquilado con haluro de alquilo o aralquilo en un disolvente polar, tal como agua, alcohol o dimetilformamida, en presencia de base, tal como carbonato sódico o potásico, para dar **165 - 167**. El derivado metilmercapto **165 - 167** ($R = \text{metilo}$) puede ser oxidado a la correspondiente sulfona **168 - 170**. Tras el tratamiento de estas sulfonas con diversas aminas se obtienen los correspondientes derivados 8-amino **171 - 173**. Muchos de los derivados 8-amino pueden obtenerse directamente a partir de **159 - 161** mediante tratamiento con aminas. También, **159** puede convertirse en el derivado 8-oxo **174** mediante tratamiento con acetato sódico en anhídrido acético, seguido de una hidrólisis. La O-alkilación de **174** con fluoroborato de trietiloxonio da la 8-etoxicordicepina **175**.

Esquema 22



Los derivados 8-alkilo **176** (Esquema 23) se preparan a partir de **123** ($R^5 = R^2 = \text{THP}$) mediante tratamiento con diisopropilamida de litio en tetrahidrofurano por debajo de -70°C , seguido de tratamiento con un haluro de alquilo. Este procedimiento se utilizó con éxito en otros ribonucleósidos (Tanaka, H. y col., Chem. Pharm. Bull., 1983, 31, 787) pero no se había aplicado nunca a 3'-desoxinucleósidos. Cuando se usa dióxido de carbono en lugar de haluro de alquilo se obtiene el ácido 8-carboxílico del nucleósido de purina **177**. La esterificación de **178**, seguido de una amoniolisis da la amida **181**, que se deshidrata al nucleósido de 8-cianopurina **182**. La reducción de **178** con borano-dimetilsulfuro proporciona el alcohol **179**. Una oxidación leve con dimetilsulfóxido y cloruro de oxalilo proporciona el aldehído **180**. Los compuestos **179** y **180** son intermedios versátiles para diversas modificaciones.

Esquema 23



Los siguientes ejemplos de trabajo proporcionan una comprensión adicional del alcance de la presente invención. Estos ejemplos tienen fines ilustrativos. Los disolventes equivalentes, similares o adecuados, los reactivos o las condiciones de reacción, pueden sustituirse por aquellos disolventes, reactivos o condiciones de reacción particulares descritos sin desviarse del alcance general del procedimiento.

5 Ejemplos

Se determinaron los puntos de fusión en tubos capilares abiertos con un aparato digital de punto de fusión electrotrémico y no se corrigieron. Se registraron los espectros de absorción UV con un espectrofotómetro Uvikon 931 (KONTRÓN) en etanol. Los espectros de RMN-¹H se realizaron a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Varian Unity Plus 400. Los desplazamientos químicos se proporcionan en ppm campo abajo de la referencia interna de tetrametilsilano. Se realizaron experimentos de intercambio de deuterio, de desacoplamiento o 2D-COSY con objeto de confirmar las asignaciones de protón. La multiplicidad de la señal está representada por s (singlete), d (doblete), dd (doblete of dobletes), t (triplete), q (cuadruplete), br (ancho), m (múltiplete). Todos los valores de J están en Hz. Los espectros de masas de FAB se registraron en un modo iónico positivo (FAB > 0) o negativo (FAB < 0) con un espectrómetro de masas JEOL DX 300. La matriz era alcohol 3-nitrobenílico (NBA) o una mezcla (50:50, v/v) de glicerol y tioglicerol (GT). Las rotaciones específicas se midieron con un espectropolarímetro Perkin-Elmer 241 (longitud de la trayectoria de 1 cm) y se proporcionan en unidades de 10⁻¹ deg cm² g⁻¹. Los análisis elementales fueron realizados por Atlantic Microlab Inc. (Norcross, GA). Los análisis indicados por los símbolos de los elementos o las funciones estaban dentro del ± 0,4% de los valores teóricos. Se realizó una cromatografía en capa fina en placas de gel de sílice Whatman PK5F, realizándose la visualización de los productos mediante absorbancia UV seguida de una carbonización con ácido etanolsulfúrico al 10% y calentando. La cromatografía en columna se realizó en gel de sílice (Fisher, S733-1) a presión atmosférica.

Ejemplo (de Referencia) 14

9-(2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-β-D-xilofuranosil) adenina (14, R = H, X = Br, Y = NH₂, Z = H).

El compuesto **14** (R = 2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-ilo, X = Br, Y = NH₂, Z = H, 500 mg, 1 mmol) se disolvió en cloruro de hidrogeno metanólico preparado mediante la adición de 3 gotas de cloruro de acetilo en 10 ml de metanol. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 3 ml de una disolución saturada de bicarbonato sódico, y la mezcla se concentró a vacío a sequedad. El residuo se trituró con etanol hasta que el sobrenadante mostró una absorción significativa de UV a 260 nm. Los extractos en etanol se concentraron, y el residuo se cristalizó en metanol para dar el deseado **14** (R = H, X = Br, Y = NH₂, Z = H), 325 g (87%). RMN-¹H (D₆-DMSO) δ: 8,16, 8,32 (2s, H-2 y H-8), 6,10 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 3,9 Hz), 5,91 (dd, 1H, H-2', J_{1',2'} = 3,9, J_{2',3'} = 4,1 Hz), 5,85 (dd, 1H, H-3', J_{2',3'} = 4,1, J_{3',4'} = 5,1 Hz), 4,38 (dt, 1H, H-4', J_{3',4'} = 5,1, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 5,0 Hz), 3,79 (dd, 2H, H-5',5''), 2,09 (s, 3H, Ac).

De una forma similar pero usando los correspondientes nucleósidos de purina, se prepararon los siguientes nucleósidos de 2'-O-acetil-3'-bromo-3'-desoxi-D-xilo (**14**) y sus análogos L:

- 35 9-(2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-β-D-xilofuranosil) guanina,
- 9-(2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-β-D-xilofuranosil)-6-cloropurina,
- 9-(2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-β-D-xilofuranosil)-2,6-dicloropurina,
- 9-(2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-β-D-xilofuranosil)-2-amino-6-cloropurina,
- 9-(2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-β-D-xilofuranosil)-6-metiltiopurina y
- 40 9-(2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-β-D-xilofuranosil)-6-metoxipurina.

Ejemplo (de Referencia) 15

9-[2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilo-furanosil] adenina (14, R = 2,5,5-trimetil-1,3-dioxalan-2-ona-2-ilo, X = Br, Y = NH₂, Z = H).

Se agitó una mezcla de adenosina (**13**, Y = NH₂, Z = H, 10 g, 0,037 mol) y bromuro de α-aoetoxi-isobutirilo (24 g, 0,117 mol) en acetonitrilo (120 ml) a temperatura ambiente durante 45 minutos. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con una disolución de bicarbonato sódico y agua, se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a vacío. El residuo se cristalizó en metanol dando 6,5 g (35%) de **14** (X = Br, Y = NH₂, Z = H), p. f. 169 - 170°C. RMN-¹H (D₆-DMSO) δ 8,17, 8,26 (2s, 1H cada uno, H-2 y H-6), 6,16 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 3,5 Hz), 5,94 (dd, 1H, H-2', J_{1',2'} = 3,5 Hz, J_{2',3'} = 3,0 Hz), 4,92 (dd, 1H, H-3', J_{2',3'} = 3,0 Hz, J_{3',4'} = 4,8 Hz), 4,54 (m, 1H, H-4'), 3,94 (m, 2H, H-5',5''), 2,10 (s, 3H, Ac), 1,73, 1,58, 1,47 (3s, 3H cada uno, grupos CH₃ en 5'). Las aguas madres de la cristalización de **14** contenían una mezcla de isómeros de 2'-bromo-2'-desoxi-D-arabinosilo **15**, según se valora mediante RMN-¹H.

De una forma similar pero usando los correspondientes nucleósidos de purina, se prepararon los siguientes derivados 3'-bromo-3'-desoxi (**14**) y sus análogos L:

- 9-[2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilofuranosil]-guanina,
 9-[2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilo-furanosil]-6-cloropurina,
 5 9-[2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilo-furanosil]-2,6-dicloropurina,
 9-[2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilo-furanosil]-2-amino-6-cloropurina,
 9-[2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilo-furanosil]-6-metiltiopurina,
 9-[2-O-Acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilo-furanosil]-6-metoxipurina,
 10 9-[3-O-Acetil-2-bromo-2-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-arabino-furanosil] guanina,
 9-[3-O-Acetil-2-bromo-2-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-arabino-furanosil]-6-cloropurina,
 9-[3-O-Acetil-2-bromo-2-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-arabino-furanosil]-2,6-dicloropurina,
 15 9-[3-O-Acetil-2-bromo-2-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-arabino-furanosil]-2-amino-6-cloropurina,
 9-[3-O-Acetil-2-bromo-2-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-arabino-furanosil]-6-metiltiopurina y
 9-[3-O-Acetil-2-bromo-2-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-arabino-furanosil]-6-metoxipurina.

Ejemplo 16

- 20 2',3'-Anhidroadenosina (**18**, Y = NH₂, Z = H).

Se trató 9-[2-O-acetil-3-bromo-3-desoxi-5-O-(2,5,5-trimetil-1,3-dioxolan-4-on-2-il)-β-D-xilo-fuanosil] adenina **14** (5,0 g, 0,01 mol) con metóxido sódico 1 M en metanol (20 ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó con ácido acético glacial, y se mantuvo en refrigeración durante una noche. El cristalino **18** depositado se recogió mediante filtración, 2,1 g (84%). El espectro de RMN-¹H de esta muestra es idéntico al preparado mediante un procedimiento alternativo de Méndez, E. y col., J. Virol. 1998, 72, 4737.

De una forma similar pero usando los correspondientes nucleósidos de purina, se prepararon los siguientes derivados 2',3'-anhidro-D-ribo (**18**) y sus análogos L: 2',3'-anhidroguanosina, 9-(2,3-anhidro-β-D-ribofuanosil)-6-metil-mercaptapurina y 9-(2,3-anhidro-β-D-ribofuranosil)-2-amino-6-metoxipurina.

Ejemplo 17

- 30 9-(3-Desoxi-3-yodo-β-D-xilofuranosil) adenina (**19**, X = I, Y = NH₂, Z = H).

Se puso suavemente a reflujo una mezcla de **18** (Y = NH₂, Z = H, 1 g, 4 mmol), yoduro sódico (1,5 g, 10 mmol), acetato sódico (100 mg) y ácido acético (5 ml) en butanona (30 ml) durante 3 horas. La evaporación del disolvente a vacío, y la trituración del residuo con agua proporcionaron **19** (X = I, Y = NH₂, Z = H), 1,2 g (80%). RMN-¹H (D₆-DMSO) δ: 8,24, 8,34 (2s, 1H cada uno, H-2 y H-8), 5,90 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 4,7 Hz), 4,96 (dd, 1H, H-2', J_{1',2'} = 4,7, J_{2',3'} = 4,9 Hz), 4,60 (dd, 1H, H-3', J_{2',3'} = 4,9, J_{3',4'} = 4,7 Hz), 4,80 (d, 2H, H-5',5"), 4,40 (m, 1H, H-4').

De una forma similar pero usando los correspondientes nucleósidos de 2',3'-anhidro-D-ribo (**14**), se prepararon los siguientes nucleósidos derivados 3'-desoxi-3'-yodo-D-xilo y sus análogos L:

- referencia 9-(3-Desoxi-3-yodo-β-D-xilofuranosil) guanina,
 referencia 9-(3-Desoxi-3-yodo-β-D-xilofuranosil)-6-metilmercaptapurina,
 40 referencia 9-(3-Desoxi-3-yodo-β-D-xilofuranosil)-6-metoxipurina,
 referencia 9-(3-Desoxi-3-yodo-β-D-xilofuranosil)-2-amino-6-metilmercaptapurina y
 referencia 9-(3-Desoxi-3-yodo-β-D-xilofuranosil)-2-amino-6-metoxipurina.

Ejemplo 18

3'-Desoxiadenosina (**20**, Y = NH₂, Z = H).

- 45 Se agitó una disolución de **19** (Y = NH₂, Z = H, 380 mg, 1 mmol) en metanol (75 ml) en una atmósfera de hidrógeno en presencia de catalizador de PdBaSO₄ al 5% (100 mg) y trietilamina (1 ml) a la presión inicial de 3 atm durante una

noche. Después de eliminar el catalizador, el disolvente se evaporó a vacío, y el residuo se cristalizó en metanol para dar la 3'-desoxiadenosina 20 ($Y = NH_2$, $Z = H$), 200 mg (80%). El espectro de RMN- 1H es idéntico al de la cordicepina.

- 5 De una forma similar pero usando los correspondientes nucleósidos de 3'-yodo-D-xilo purina(19), se prepararon los siguientes 3'-desoxinucleósidos y sus derivados L: 9-(3-Desoxi- β -D-eritropentofuranosil) guanina, 9-(3-desoxi- β -D-eritropentofuranosil)-purina, 9-(3-desoxi- β -D-eritropentofuranosil)-6-metoxipurina, 9-(3-desoxi- β -D-eritropentofuranosil)-2-aminopurina y 9-(3-desoxi- β -D-eritropentofuranosil)-2-amino-6-metoxipurina.

Ejemplo (de Referencia) 19

3-(β -D-Ribofuranosil)-8-azaxantina (24, X = OH, Y = N).

- 10 A una disolución de 5-nitrouridina (300 mg) en DMF (60 ml) se añadió azida sódica (100 mg), y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se disolvió en una cantidad mínima de agua caliente, y el pH se ajustó a 3 - 4 con ácido clorhídrico diluido. Los precipitados se recrystalizaron en agua, p. f. 164 - 166°C (desc.). Análisis calculado para $C_9H_{11}N_5O_6H_2O$: C, 35,64; H, 4,29; N, 23,1. Encontrado: C, 35,96; H, 4,01; N, 23,43.

15 Ejemplo (de Referencia) 20

1,2-O-Isopropiliden-5-O-metoxicarbonil-3-O-fenoxitiocarbonil- α -D-xilofuranosa (26, R = Ph).

- 20 A una disolución de 1,2-O-isopropiliden-5-O-metoxicarbonil- α -D-xilofuranosa (25, 25,0 g, 0,1 mol) y 4-dimetilaminopiridina (25 g, 0,2 mol) en piridina seca (250 ml) se añadió gota a gota una disolución de clorotioformiato de fenilo (50 g, 0,3 mol) en acetonitrilo (100 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 50 - 60°C durante 24 horas. La disolución se concentró a vacío, y el residuo se repartió entre cloruro de metileno y agua. La capa orgánica se lavó sucesivamente con agua, hidróxido sódico 0,1 N, agua, ácido clorhídrico 0,1 N y agua, y se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a vacío dando 26 (R = Ph) como un jarabe con un rendimiento cuantitativo (38,2 g). Este jarabe se usó directamente en la siguiente etapa.

Ejemplo (de Referencia) 21

- 25 *3-Desoxi-1,2-O-isopropiliden-5-O-metoxicarbonil- α -D-eritropentofuranosa (27).*

- 30 Se añadió una disolución de hidruro de tri-*n*-butilestaño (58 g, 0,2 mol) en tolueno (300 ml) durante un periodo de 3 horas a una disolución en reflujo del compuesto 26 (R = Ph) anterior (19,2 g, 50 mmol) y 2,2'-azobisisobutironitrilo (2,5 g, 15 mmol) en tolueno (400 ml). La mezcla se concentró a vacío, y el residuo se disolvió en acetonitrilo (300 ml), y la disolución se extrajo con éter de petróleo (4 x 100 ml) para eliminar los derivados de tri-*n*-butilestaño. La capa de acetonitrilo se concentró. La cromatografía en capa fina del residuo mostró una mancha principal, y el espectro de RMN- 1H indicó la presencia de tres grupos metilo y ningún protón aromático, pero una contaminación con una pequeña cantidad de derivados de butilestaño. Sin purificación adicional, este producto se usó en la siguiente etapa.

Ejemplo (de Referencia) 22

- 35 *1,2-Di-O-acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-D-eritropentofuranosa (28).*

- 40 A una disolución agitada de 23 (2,32 g, 0,01 mol) en una mezcla de ácido acético (60 ml) y anhídrido acético (6 ml) se añadió gota a gota ácido sulfúrico concentrado (3 ml) con enfriamiento en hielo a una tasa tal que la temperatura se mantuvo a 15 - 25°C. Después de dejar reposar durante una noche a temperatura ambiente, se añadió hielo (250 g) a la disolución, y después la mezcla se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 ml). Los extractos combinados se lavaron con una disolución saturada de bicarbonato sódico (3 x 30 ml), se secaron sobre sulfato sódico, y se concentraron a vacío dando 28 (2,8 g, 100%) como una mezcla anomérica. Este compuesto es lo suficientemente puro como para ser usado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo (de Referencia) 23

1-(2-O-acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil- β -D-eritropentofuranosil)-5-fluorouracilo (29, X = OH, Z = F).

- 45 Se calentó a reflujo una mezcla de 5-fluorouracilo (2,6 g, 0,02 mol), sulfato amónico (aprox. 30 mg) en hexametildisilazano (15 ml) hasta que se obtuvo una disolución transparente. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se disolvió en 1,2-dicloroetano (20 ml), y se añadió 1,2-di-O-acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-D-eritropentofuranosa (28, 5,5 g, 0,02 mol) en 1,2-dicloroetano (20 ml). A la disolución se añadió tetracloruro de estaño (5,2 g, 0,02 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente, después se calentó durante 3 horas a 40 - 50°C durante 3 horas. Se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (40 ml) y se agitó hasta que cesó la evolución de dióxido de carbono. La mezcla se filtró a través de una capa de celita. La capa orgánica se separó, se lavó cuidadosamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico (20 ml x 2) y agua (20 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se cristalizó en etanol dando 29 (4,3 g,

62%).

De una forma similar pero usando las correspondientes bases de purina, se prepararon los siguientes 2',5'-di-O-acetil 3'-desoxinucleósidos y sus homólogos L:

- 5 1-(2,5-Di-O-acetil-3-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-N⁶-benzoadenina,
 1-(2,5-Di-O-acetil-3-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-6-cloropurina,
 1-(2,5-Di-O-acetil-3-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-2,6-dicloropurina,
 1-(2,5-Di-O-acetil-3-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-2-acetamido-6-cloropurina,
 1-(2,5-Di-O-acetil-3-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-2-acetamido-6-metoxipurina,
 10 1-(2,5-Di-O-acetil-3-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-6-metoxipurina y
 1-(2,5-Di-O-acetil-3-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-6-metilmercaptapurina.

Ejemplo (de Referencia) 24

1-(2-O-acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-6-cloropurina (30, X = Cl, Y = H).

15 Se calentó a reflujo una mezcla de 6-cloropurina (3,1 g, 0,02 mol), sulfato amónico (aprox. 30 mg) en hexametildisilazano (25 ml) hasta que se obtuvo una disolución transparente. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se disolvió en 1,2-dicloroetano (30 ml), y se añadió 1,2-di-O-acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-D-eritropentofuranosa (**28**, 5,5 g, 0,02 mol) en 1,2-dicloroetano (20 ml). A la disolución se añadió tetracloruro de estaño (5,2 g, 0,02 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente, después se calentó durante 3 horas a 40 - 50°C durante 3 horas. Se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (50 ml) y se agitó hasta que cesó la evolución de dióxido de carbono. La mezcla se filtró a través de una capa de celita. La capa orgánica se separó, se lavó cuidadosamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico (30 ml x 2) y agua (30 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se cristalizó en etanol dando **30** (4,3 g, 62%).

20

De una forma similar pero usando las correspondientes bases de purina, se prepararon los siguientes 3'-desoxinucleósidos protegidos en 2',5' y sus homólogos L:

- 25 1-(2-O-Acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-N⁶-benzoadenina,
 1-(2-O-Acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-6-cloropurina,
 1-(2-O-Acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-2,6-dicloropurina,
 1-(2-O-Acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-2-acetamido-6-cloropurina,
 1-(2-O-Acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-2-acetamido-6-metoxipurina,
 30 1-(2-O-Acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-6-metoxipurina y
 1-(2-O-Acetil-3-desoxi-5-O-metoxicarbonil-β-D-eritropentofuranosil)-6-metilmercaptapurina.

Ejemplo (de Referencia) 25

1,2-O-Isopropiliden-5-O-t-bulidifenilsilil-α-D-xilofuranosa (31).

35 Se agitó una mezcla de 1,2-O-isopropiliden-α-D-xilofuranosa (38,0 g, 0,2 mol), t-butil-difenilclorosilano (70 g, 0,25 mol) e imidazol (21,5 g, 0,4 mol) en *N,N*-dimetilformamida (50 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se disolvió en acetato de etilo (1 l), y se extrajo con agua (300 ml x 2) y salmuera (300 ml), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a sequedad a vacío dando **31** en bruto (86 g, 100%), que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo (de Referencia) 26

40 *1,2-O-Isopropiliden-3-O-metil-5-O-t-butildifenilsilil-α-D-xilofuranosa (32, R = Ms).*

Se añadió gota a gota cloruro de mesilo (17 g, 0,15 mol) a una disolución de **31** en bruto (43 g, 0,1 mol) en piridina (100 ml), y la mezcla se dejó reposar durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió hielo picado (1 l) a la mezcla, y el producto se extrajo con cloruro de metileno (300 ml x 3). Los extractos se combinaron, se lavaron con agua (300 ml x 2) y salmuera (300 ml), se secaron sobre sulfato sódico, y se concentraron a vacío a sequedad. Los restos de piridina se eliminaron mediante una destilación azeotrópica repetida con tolueno. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (500 ml) y se lavó con ácido clorhídrico 0,1 N (250 ml x 2) y agua, se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a sequedad dando **32** en bruto (R = Ms), 50,1 g (99%). El espectro de RMN-¹H de este material es lo suficientemente puro como para ser usado directamente en la siguiente etapa.

45

Ejemplo (de Referencia) 27

Metil 3-O-metil-5-O-t-butildifenilsilil-D-xilofuranósido (33, R = Ms).

5 Una disolución de **32** en bruto (50 g, 0,1 mol) en cloruro de hidrógeno metanólico anhidro al 1% (1 l) se mantuvo durante una noche a temperatura ambiente, y después se evaporó a vacío hasta un jarabe que se repartió entre agua (100 ml) y cloruro de metileno (150 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con agua (100 ml), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a vacío, dando **33** en bruto, un jarabe, que pesó 48 g (100%). Este material no se purificó adicionalmente sino que se usó directamente en la siguiente etapa.

Ejemplo (de Referencia) 28

Metil 2,3-anhidro-5-O-t-butildifenilsilil-D-ribofuranósido (34).

10 Se disolvió **33** en bruto (48 g, 0,1 mol) en cloruro de metileno (100 ml) y se trató con metóxido sódico metanólico 2 M (60 ml), y se puso a reflujo durante 2 horas. La sal insoluble se eliminó mediante filtración, y el filtrado se concentró a vacío a sequedad. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (150 ml), se lavó con agua (100 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a sequedad dando **30** en bruto (38 g, 100%), que puede usarse directamente en la siguiente etapa sin purificación.

Ejemplo (de Referencia) 29

Metil 3-desoxi-3-yodo-5-O-t-butildifenilsilil-D-ribofuranósido (35, X = I).

20 Se calentó una mezcla de **34** (38 g, 0,1 mol), yoduro sódico (60 g, 0,4 mol), acetato sódico (0,6 g) y ácido acético (70 ml) en acetona (500 ml) a reflujo durante 8 horas. La acetona se retiró a vacío, y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (500 ml) y agua (250 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con 250 ml cada uno de agua, una disolución de tiosulfato sódico 0,1 M, agua y se secó sobre sulfato sódico. Después de la eliminación del disolvente a vacío, el residuo se cristalizó en etanol proporcionando 31 g (60,5%) de **35** (X = I).

Ejemplo (de Referencia) 30

Metil 3-desoxi-5-O-t-butildifenilsilil-D-eritropentofuranósido (37, a partir de 35).

25 Se hidrogenó el compuesto **35** (X = I, 25,6 g, 0,05 mol) en acetato de etilo (250 ml) con paladio al 5% sobre carbón vegetal (2 g). Después de que cesara el consumo de hidrógeno, la mezcla se filtró, y el filtrado se lavó con agua (150 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró a sequedad dando **37** en bruto (19 g, rendimiento cuantitativo) que es lo suficientemente puro como para ser usado directamente en la siguiente etapa.

Ejemplo (de Referencia) 31

Metil 3-desoxi-5-O-t-butildifenilsilil-D-eritropentofuranósido (36, a partir de 34).

30 Se agitó una suspensión de hidruro de litio y aluminio (8,4 g, 0,2 mol) en éter etílico seco (220 ml) en una atmósfera de nitrógeno y se enfrió en un baño de hielo. A esta suspensión se añadió gota a gota una disolución de **34** (19 g, 0,05 mol) en tetrahidrofurano seco (250 ml) a una tasa tal que la temperatura permaneció por debajo de 25°C. Después de 2 horas, se cargó otro 1 g de hidruro de litio y aluminio, y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla agitada se enfrió en un baño de hielo, y se añadió gota a gota isopropanol (100 ml), seguido de acetona (50 ml). La mezcla se concentró a vacío, y el residuo se repartió entre éter etílico (250 ml) y agua (150 ml). Los materiales insolubles se filtraron a través de unlecho corto de celita que se lavó con éter. La capa de éter se separó, se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico 0,2 N (150 ml x 2) y agua (150 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad dando **36** en bruto (16,5 g, 87%).

Ejemplo (de Referencia) 32

40 *Metil 3-desoxi-D-eritropentofuranósido (38).*

45 A una disolución de **36** en bruto (13 g, 0,03 mol) en tetrahidrofurano (320 ml) se añadió gota a gota una disolución 1 M de hidrogenofluoruro de trietilamonio (100 ml), y la mezcla se agitó durante 24 horas. La mezcla se concentró a vacío, y el residuo se disolvió en agua (200 ml). Se añadió carbonato de calcio en polvo (20 g), y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente, y después se filtró. El filtrado se concentró a vacío hasta un jarabe que se disolvió en cloroformo (200 ml), se filtró y se evaporó a vacío proporcionando **38** en bruto (4,5 g, 100%).

Ejemplo (de Referencia) 33

1,2,5-Tri-O-acetil-3-desoxi-D-eritropentofuranosa (38).

50 A una mezcla agitada vigorosamente de metil 3-desoxi-D-eritropentofuranósido **37** en bruto (4,5 g, 0,03 mol) y ácido acético (80 ml) se añadió anhídrido acético (40 ml), seguido de ácido sulfúrico (4 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se repartió entre cloruro de metileno (150 ml) y agua

helada (400 ml). La capa de agua se extrajo con cloruro de metileno (100 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con volúmenes iguales de una disolución saturada de bicarbonato sódico, una vez con agua, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad a vacío. Los restos de ácido acético se eliminaron mediante varias destilaciones azeotrópicas con tolueno dando **38** en bruto (5,1 g, 66%). El espectro de RMN-¹H muestra que el principal constituyente de este producto contiene 3 grupos acetilo y es el anómero β.

Ejemplo (de Referencia) 34

1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-5-fluorouracil (3'-desoxi-5-fluorouridina, 6b, X = OH, R = F).

Se agitó una mezcla de un derivado de acetilo de **39** (X = OH, Z = F, 3,3 g, 0,01 mol) y trietilamina (3 ml) en metanol (100 ml) durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a vacío a sequedad, y el residuo se cristalizó en etanol dando 3'-desoxi-5-fluorouridina (2,0 g, 83%), p. f. 169 - 171°C. RMN-¹H (D₆-DMSO) δ: 11,7 (s a, 1H, N³-H, intercambiable), 8,44 (d, 1H, H-6, J_{6,F} = 7,1 Hz), 5,7 (d, 1H, 2'-OH, intercambiable), 5,5 (estrecho m, 1H, H-1'), 5,3 (t, 1H, 5'-OH, intercambiable), 4,1 - 4,5 (m, 2H, H-2' y H-4'), 3,5 - 3,9 (m, 2H, H-5', 5"), 1,6 - 2,2 (m, 2H, H-3', 3").

De una forma similar pero usando el correspondiente nucleósido de 2',5'-di-O-acetil purina, se prepararon los siguientes 3'-desoxinucleósidos y sus homólogos L:

- 1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-2-cloroadenina,
- 1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-6-cloropurina,
- 1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-2,6-dicloropurina,
- 1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-2-acetamido-6-cloropurina,
- 1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-2-acetamido-6-metoxipurina,
- 1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-6-metoxipurina y
- 1-(3-Desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-6-metilmercaptapurina.

Ejemplo (de Referencia) 35

1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-mesil-β-D-xilofuranosil)-5-fluorouracilo.

Se calentó a reflujo una mezcla de 5-fluorouracilo (0,02 mol), sulfato amónico (aprox. 30 mg) en hexametildisilazano (15 ml) hasta que se obtuvo una disolución transparente. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se disolvió en 1,2-dicloroetano (20 ml), y se añadió 1,2,5-tri-O-acetil-3-O-mesil-D-xilofuranosa (5,5 g, 0,02 mol) en 1,2-dicloroetano (20 ml). A la disolución se añadió tetracloruro de estaño (5,2 g, 0,02 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente, después se calentó durante 3 horas a 40 - 50°C durante 3 horas. Se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (40 ml) y se agitó hasta que cesó el desprendimiento de dióxido de carbono. La mezcla se filtró a través de una capa de celita. La capa orgánica se separó, se lavó cuidadosamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico (20 ml x 2) y agua (20 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se cristalizó en etanol dando el producto del título (62%). El espectro de RMN-¹H de esta muestra es compatible con la estructura indicada.

De una forma similar pero usando las correspondientes bases de purina, se prepararon los siguientes xilonucleósidos de 2',5'-di-O-acetilo sustituidos en 3' y sus homólogos L:

- 1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-tosil-β-D-xilofuranosil)-N⁶-benzoadenina,
- 1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-tosil-β-D-xilofuranosil)-6-cloropurina,
- 1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-tosil-β-D-xilofuranosil)-2,6-dicloropurina,
- 1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-tosil-β-D-xilofuranosil)-2-acetamido-6-cloropurina,
- 1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-tosil-β-D-xilofuranosil)-2-acetamido-6-metoxipurina,
- 1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-tosil-β-D-xilofuranosil)-6-metoxipurina y
- 1-(2,5-Di-O-acetil-3-O-tosil-β-D-xilofuranosil)-6-metilmercaptapurina.

Ejemplo (de Referencia) 36

1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilofuranosil) timina.

Se calentó a reflujo una mezcla de timina (0,02 mol), sulfato amónico (aprox. 30 mg) en hexametildisilazano (15 ml) hasta que se tuvo una disolución transparente. El disolvente se a vacío, y el residuo se disolvió en 1,2-dicloroetano (20 ml), y se añadió 1,2,3,5-tri-O-acetil-D-xilofuranosa (5,5 g, 0,02 mol) en 1,2-dicloroetano (20 ml). A la disolución se añadió tetracloruro de estaño (5,2 g, 0,02 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente, después se calentó durante 3 horas a 40 - 50°C durante 3 horas. Se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (40 ml) y se agitó hasta que cesó la evolución de dióxido de carbono. La mezcla se filtró a través de una capa de celita. La capa orgánica se separó, se lavó cuidadosamente con una disolución saturada de bicarbonato sódico (20 ml x 2) y agua (20 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se cristalizó en etanol dando el producto (4,3 g, 62%). El espectro de RMN-¹H de esta muestra es compatible con la estructura indicada.

De una forma similar pero usando las correspondientes bases de purina, se prepararon los siguientes xilonucleósidos de 2',5'-di-O-acetilo sustituidos en 3' y sus homólogos L:

- 5
1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilofuranosil)-N⁶-benzoadenina,
1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilofuranosil)-6-cloropurina,
1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilofuranosil)-2,6-dicloropurina,
1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilofuranosil)-2-acetamido-6-cloropurina,
1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilopentofuranosil)-2-acetamido-6-metoxipurina,
1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilopentofuranosil)-6-metoxipurina y
1-(2,3,5-Tri-O-acetil-β-D-xilofiranosil)-6-metilmercaptapurina.

10 **Ejemplo (de Referencia) 37**

1-(3-Desoxi-3-O-mesil-β-D-xilofuranosil)-5-fluorouracilo.

15 Se agitó una mezcla de 1-(2,5-di-O-acetil-3-O-mesil-β-D-xilofuranosil)-5-fluorouracilo (4,24 g, 0,01 mol) en amoniaco metanólico (100 ml) durante 30 minutos a 0°C, y se concentró a vacío a sequedad, y el residuo se cristalizó en etanol dando 1-(3-desoxi-3-O-mesil-β-D-xilofuranosil)-5-fluorouracilo (2,82 g, 83%). La RMN-¹H (D₆-DMSO) demostró que no hay ningún grupo acetilo, pero hay un grupo mesilo en la molécula.

De una forma similar pero usando los correspondientes nucleósidos de 2',5'-di-O-acetil purina, se prepararon los siguientes 3'-O-mesil-nucleósidos y sus homólogos L:

- 20
1-(3-O-Mesil-β-D-xilofuranosil)-2-cloroadenina,
1-(3-O-Mesil-β-D-xilofuranosil)-6-cloropurina,
1-(3-O-Mesil-β-D-xilofuranosil)-2,6-dicloropurina,
1-(3-O-Mesil-β-D-xilofuranosil)-2-acetamido-6-cloropurina,
1-(3-O-Mesil-β-D-xilofuranosil)-2-acetamido-6-metoxipurina,
1-(3-O-Mesil-β-D-xilofuranosil)-6-metoxipurina y
1-(3-O-Mesil-β-D-xilofuranosil)-6-metilmercaptapurina.

25 **Ejemplo (de Referencia) 38**

1-(β-D-Xilofuranosil)-5-fluorouracilo

30 Se agitó una mezcla de 1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-xilofuranosil)-5-fluorouracilo (3,88 g, 0,01 mol) y trietilamina (3 ml) en metanol (100 ml) durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a vacío a sequedad, y el residuo se cristalizó en etanol dando 1-(β-D-xilofuranosil)-5-fluorouracilo (2,0 g, 76%). Los espectros de UV y RMN-¹H (Me₂SO-d₆) de esta muestra son coherentes con la estructura del producto.

De una forma similar pero usando las correspondientes bases de 2',5'-di-O-acetil purina, se prepararon los siguientes xilonucleósidos y sus homólogos L:

- 35
1-(β-D-Xilofuranosil)-2-cloroadenina,
1-(β-D-Xilofuranosil)-6-cloropurina,
1-(β-D-Xilofuranosil)-2,6-dicloropurina,
1-(β-D-Xilofuranosil)-2-acetamido-6-cloropurina,
1-(β-D-Xilofuranosil)-2-acetamido-6-metoxipurina,
1-(β-D-Xilofuranosil)-6-metoxipurina y
1-(β-D-Xilofuranosil)-6-metilmercaptapurina.

40 VIII Procedimientos biológicos

Esta divulgación también proporciona un procedimiento eficiente para cuantificar la carga vírica en un hospedador usando una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real ("Q-RT-PCR"). El procedimiento implica el uso de una molécula de sonda fluorescente amortiguada que puede hibridar con un ADN o un ARN vírico objetivo. Por lo tanto, tras la degradación exonucleolítica, puede detectarse una señal fluorescente detectable. Por lo tanto, el ADN o el ARN amplificado mediante la RT-PCR pueden ser detectados en tiempo real detectando la presencia de señales fluorescentes.

En una forma de realización específica de la divulgación, se proporciona el uso de la RT-PCR para cuantificar la carga vírica de un virus *Flaviviridae*.

50 En una forma de realización más específica, se proporciona el uso de la RT-PCR para cuantificar la carga vírica del BVDV en una línea celular MDBK o en una muestra de un hospedador.

En una forma de realización adicional de la divulgación, se proporciona una molécula de sonda diseñada para emitir fluorescencia tras la degradación exonucleolítica y para que sea complementaria de la región de la NS5B de la NADL del BVDV.

En una forma de realización más específica de la divulgación, se proporciona una molécula de sonda con una secuencia de 5' 6-fam-AAATCCTC-CTAACAAGCGGGTTCCAGG-tamara 3' (ID. de Secuencia N° 1) y cebadores con una secuencia de sentido: 5'-AGCCTTCAGTT-TCTTGCTGATGT-3' (ID. de Secuencia N° 2) y antisentido: 5'-TGTTGCGAAAGCACCAACAG-3' (ID. de Secuencia N° 3).

- 5 En una forma de realización específica de la divulgación, se proporciona el uso de la RT-PCR para cuantificar en tiempo real la carga vírica de HCV en una muestra derivada de un hospedador o en una línea celular.

En una forma de realización más específica de la divulgación, se proporciona el uso de la RT-PCR, una molécula de sonda diseñada para emitir fluorescencia tras la degradación exonucleolítica y para que sea complementaria del genoma del HCV.

- 10 En una forma de realización más específica de la divulgación, se proporciona el uso de la RT-PCR, una molécula de sonda diseñada para emitir fluorescencia tras la degradación exonucleolítica y para que sea complementaria de la región 5' no traducida del HCV.

- 15 En una forma de realización más específica de la divulgación, se proporciona una molécula de sonda con una secuencia de 5' 6-fam-CCTCCAG-GACCCCCCTCCC-tamara 3' (ID. de Secuencia N° 4) y cebadores con una secuencia de sentido: 5'-AGCCATGGCGTTAGTA(T/C)GAGTGT-3' (ID. de Secuencia N° 5) y antisentido: 5'-TTCCGCAGACCACTATGG-3' (ID. de Secuencia N° 6).

A. Aislamiento del ARN y análisis cuantitativo mediante RT-PCR

- 20 Se desvela un procedimiento eficaz para cuantificar la carga vírica en un hospedador, denominado reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real ("RT-PCR"). El procedimiento implica el uso de una molécula de sonda fluorescente amortiguada que puede hibridar con el ADN o el ARN vírico. Por lo tanto, tras la degradación exonucleolítica, puede seguirse una señal fluorescente detectable. Por lo tanto, el ADN o el ARN amplificado mediante la RT-PCR se detectan en tiempo real siguiendo la presencia de señales fluorescentes.

- 25 Como una ilustración de este procedimiento, en el caso del BVDV en células MDBK, en una primera etapa se aísla el ARN vírico a partir de 140 µl del sobrenadante del cultivo celular mediante una columna disponible comercialmente (kit de extracción de ARN vírico, QiaGen, CA). Entonces el ARN vírico se eluye desde la columna para producir un volumen total de 60 µl, y subsiguientemente se amplifica con un protocolo de RT-PCR cuantitativa usando un cebador adecuado para la cepa NADL del BVDV. Se hibrida una molécula de sonda fluorescente amortiguada con el ADN del BVDV, que experimenta entonces una degradación exonucleolítica que da como resultado una señal fluorescente detectable. Por lo tanto, el ADN amplificado mediante la RT-PCR se detectó en tiempo real monitorizando la presencia de señales fluorescentes. La molécula de sonda TaqMan (5'-6-fam-AAATCCTCCTAACAAGCGGGTTCCAGG-tamara 3' [ID. de Secuencia N° 1] y los cebadores (sentido: 5'-AGCCTTCAGTTTCTTGCTGATGT-3' [ID. de Secuencia N° 2]; y antisentido: 5'-TGTTGCGAAAG-CACCAACAG-3' [ID. de Secuencia N° 3]) se diseñaron con la ayuda del programa informático Primer Express (PE-Applied Biosystems) para que fueran complementarios de la región de la NS5B de la NADL del BVDV. Se analizaron un total de 10 µl de ARN en una mezcla de 50 µl de RT-PCR. Los reactivos y las condiciones usadas en la PCR cuantitativa se adquirieron en PE-Applied Biosystems. La curva estándar se creó usando el inóculo del virus no diluido que variaba desde 6.000 unidades formadoras de placa (UFP) hasta 0,6 UFP por mezcla de RT-PCR. Se obtuvo rutinariamente un intervalo lineal de más de 4-logs.

- 40 Puede tomarse un enfoque comparable para medir la cantidad de otros Flaviviridae (más importantemente HCV, YFV, Dengue, virus del Nilo occidental y otros) en una muestra clínica o en una muestra de tejido cultivado. Por ejemplo, la combinación de la purificación del ARN del HCV con una RT-PCR en tiempo real usando los siguientes cebadores (5'-TTCCGCAGACCACTATGG-3' [ID. de Secuencia N°. 4] y 5'-AGCCATGGCGTTAGTATGAGTGT-3' [ID. de Secuencia N°. 5]) y la sonda (5'-6-fam-CCTCCAGGAC-CCCCCTCCC-tamara-3' [ID. de Secuencia N°. 6]) dio como resultado un intervalo lineal de detección de la carga vírica de 7-log.

45 B. Célula / materiales víricos

Uno de los miembros mejor caracterizados del género Pestivirus es el BVDV. El BVDV y el HCV comparten al menos tres características comunes, que son las siguientes: (1) ambos experimentan una traducción mediada por IRES; (2) el cofactor NS4A es requerido por su proteasa de serina NS3; y (3) experimentan un procesamiento de poliproteína similar dentro de la región no estructural, especialmente en el sitio de unión de NS5A y NS5B.

- 50 Se usó el sistema de replicación del BVDV para el descubrimiento de los compuestos anti-*Flaviviridae*. Los compuestos descritos en este documento son activos frente a Pestivirus, Hepacivirus y/o Flavivirus.

Se hicieron crecer células de riñón bovino Maldin-Darby (MDBK) y se mantuvieron en un medio de eagle modificado (DMEM/F12; GibcoBRL), complementado con un 10% de suero de caballo termoinactivado a 37°C en una estufa de incubación humidificada con un 5% de CO₂.

El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), cepa NADL, provoca un efecto citopatógeno (CPE) tras la infección de estas células.

C. Ensayo antivírico

5 Se aislaron células MDBK, crecidas en medio DMEM/F12 - 10% de suero de caballo (HS), con técnicas convencionales usando tripsina-EDTA. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 5×10^4 células/pocillo, con compuesto de prueba (concentración 20 micromolar (μM)) para dar un volumen total de 100 microlitros (μl). Después de una hora se retiró el medio y las células se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,02 o de 0,002 en un volumen total de 50 μl durante 45 minutos. A continuación, se retiró el virus y las células se lavaron dos veces con 100 μl de medio de ensayo. Finalmente, las células infectadas se incubaron en un volumen total de 100 ml que contenía el compuesto de prueba a una concentración de 10, 40 ó 100 μM . Después de 10 22 horas, se recogió el sobrenadante celular retirando los desechos celulares mediante una centrifugación a baja velocidad, y subsiguientemente se ensayó la presencia del virus de una forma cuantitativa.

D. Ensayo de citotoxicidad de compuestos candidatos anti-*Flaviviridae*

15 El ensayo de citotóxicos ya se realizó aquí como una técnica estándar. En resumen, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a diversas concentraciones (dependiendo del tipo celular, de la duración del ensayo), típicamente a 5×10^3 células por pocillo, en presencia de concentraciones crecientes del compuesto de prueba (0, 1, 3, 10, 33 y 100 μM). Después de una incubación de tres días se midió la viabilidad celular y la actividad mitocondrial añadiendo el colorante MTS (Promega), seguido de a 3 horas de incubación. A continuación, las placas que contienen al pigmento se leyeron a 490 nm. Dichas metodologías están bien descritas y disponibles en el fabricante (Promega). 20

Ejemplo 53

La curva estándar de cuantificación de la RT-PCR del BVDV

25 La disolución madre estándar de BVDV contenía 2×10^6 UFP/ml, según se determinó mediante un ensayo rutinario en placa (Mendez, E. y col., J. Virol. 1998, 72, 4737). El ARN vírico se extrajo a partir de 140 μl de este material de inóculo y se eluyó desde una columna usando 60 μl de un tampón de elución. Este material de ARN purificado se diluyó entonces poco a poco desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Usando la técnica de amplificación mediante RT-PCR en tiempo real se ensayaron 10 μl de cada dilución. A partir de este experimento, está claro que esta tecnología permite una cuantificación fiable de más de 4-logs del virus (desde 6.000 hasta 0,6 UFP/ de entrada en la mezcla de amplificación). El límite inferior de detección en este experimento es de 0,6 UFP o -0.22 log UFP. Por lo tanto, los valores de la cuantificación mediante RT-PCR en tiempo real de las muestras de prueba por debajo de este límite 30 detección fueron considerados no fiables.

Ejemplo 54

El ciclo de replicación del BVDV en células MDBK

35 Con objeto de medir la producción del BVDV en células MDBK y determinar el tiempo óptimo de recogida a lo largo de un cierto periodo de tiempo, las células se sembraron a 5×10^4 células/pocillo y se infectaron con una MOI = 0,02 o con una MOI = 0,002. Después de la infección, se retiró el inóculo y las células se lavaron dos veces con medio de cultivo. En diferentes puntos temporales se recogió el sobrenadante celular y se midió la cantidad de virus y se comparó con el inóculo original y el lavado celular. Se necesitaron al menos 2 etapas de lavado para eliminar el inóculo del virus. La cantidad de virus producido 22 horas después de la infección iguala aproximadamente a la cantidad de virus usado para inocular las células. Basándonos en estos resultados, el tiempo requerido para un ciclo de replicación del BVDV en células MDBK era de 22 horas. Nótese que el nivel de detección establecido en estos experimentos se basó en el límite inferior de detección determinado mediante la curva estándar. 40

Ejemplo 55

Evaluación de compuestos antivíricos candidatos usando una RT-PCR

45 Se sembraron células MDBK a 5×10^4 células/pocillo y se infectaron con BVDV a una multiplicidad de infección (MOI) igual a 0,02 y se hicieron crecer durante 22 horas en presencia de un compuesto de prueba. Las células que no se trataron con un compuesto de prueba se consideraron un control negativo, mientras que la ribavirina sirvió como control positivo. El ARN vírico se extrajo y se analizó mediante una RT-PCR en tiempo real. Un experimento típico demuestra que el control negativo y la mayoría de las células tratadas produjeron unas cantidades comparables de virus (entre 1,5 y 2 log UFP/entrada), demostrando efectivamente que los compuestos de prueba no son activos. Sin embargo, las células tratadas con el control positivo, ribavirina (RIB) o con 5-hidroxiundina ($\beta\text{-D-CL}$) no reivindicadas mostraron una ausencia prácticamente completa de ARN vírico. Las RIB y $\beta\text{-D-CL}$ no reivindicadas reducen la producción vírica en aproximadamente 2 log UFP, o el 99%, en el periodo de reproducción de 22 horas. La potencia exacta de estos compuestos no puede ser deducida a partir de este tipo de experimento, dado que el límite de detección en este experimento se establece en -0,22 log UFP, y sólo se produce un ciclo de replicación 55

vírica en las condiciones experimentales establecidas.

Las potencias, o el efecto de la concentración de los compuestos que inhibe la producción del virus en un 50% o en un 90% (valores de CE_{50} o de CE_{90} , respectivamente), de los compuestos anti-BVDV, se determinaron en un conjunto similar de experimentos, pero en un intervalo más amplio de concentraciones de compuesto de prueba (0, 1, 3, 10, 33, 100 μM). El valor de la CE_{90} se refiere a la concentración necesaria para obtener una reducción de 1-log en la producción vírica en un periodo de 22 horas. Los compuestos que mostraron una potente actividad antivírica se enumeran en la Tabla 21. Esta tabla proporciona la máxima reducción en la carga vírica observada a una concentración dada 22 horas después de la infección.

Tabla 21: carga vírica del BVDV 22 horas después de la infección

ID	n	conc. (μM)	Reducción Log media
# β -D-DJ	1	40	1,58
β -D-DK	2	100	2,17
β -D-DL	2	100	1,33
# no reivindicado			

10 Ejemplo 56

Sistemas de cultivo celular alternativos para la determinación de las actividades antivíricas

El ensayo descrito anteriormente puede adaptarse a los otros miembros de los *Flaviviridae* cambiando el sistema celular y el patógeno vírico. Las metodologías para determinar la eficacia de estos compuestos antivíricos incluyen modificaciones de las técnicas convencionales según se describen en Holbrook, MR y col., *Virus Res.* 2000, 69 (1), 31; Markland, W y col., *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2000, 44 (4), 859; Diamond, MS y col., *J. Virol.* 2000, 74 (17), 7814; Jordan, I. y col., *J. Infect. Dis.* 2000, 182, 1214; Sreenivasan, V. y col., *J. Virol. Methods* 1993, 45 (1), 1; o Baginski, SG y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2000, 97 (14), 7981 o la tecnología de la RT-PCR en tiempo real. Específicamente, puede usarse un sistema de replicón del HCV en células HuH7 (Lohmann, V y col., *Science*, 1999, 285 (5424), 110) o modificaciones del mismo (Rice y col., 2000, resumen del Xth International Symposium for Viral Hepatitis and Liver Disease, Atlanta, GA).

Ejemplo 58

Ensayo antivírico de compuestos candidatos para virus respiratorios

Durante el transcurso de estos experimentos se han ensayado compuestos a partir de la fórmula general (I) para comprobar sus actividades antivíricas frente a un conjunto de virus que infectan el tracto respiratorio superior. Las metodologías usadas para estos fines están bien descritas. Los siguientes protocolos son procedimientos operativos estándar tomados de Virology Branch, Division of Microbiology and Infectious Diseases, MAID, NIH.

A. Virus y líneas celulares usados en el cribado primario

(i) *Gripe A y B*

Cepas víricas: A/Beijing/262/95 (H1N1) (fuente CDC); A/Sydney/05/97 (H3N2) (fuente CDC); B/Beijing/184/93 (fuente: CDC).

Línea celular: riñón canino Maldin Darby (MDCK)

(ii) *Virus Respiratorio Sincitial (RSV)*

Cepa vírica A2 (fuente: ATCC).

Línea celular: células de riñón de mono verde africano (MA-104)

(iii) *Virus paragripal de tipo 3*

Cepa vírica: 14702 (fuente: cepa clínica 5/95 Boivin, Montreal, Canadá)

Línea celular: células de riñón de mono verde africano (MA-104)

B. Procedimientos de actividad antivírica

(i) *Inhibición del efecto citopático vírico (CPE)*

Esta prueba se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos. En esta prueba de inhibición del CPE se añadirán cuatro diluciones de \log_{10} de cada compuesto de prueba a 3 copas que contienen la monocapa celular; entonces se

añade el virus a los 5 min y la placa se precinta, se incuba a 37°C y se lee microscópicamente la CPE cuando los controles infectados sin tratar desarrollan una CPE de 3 a 4+ (aproximadamente entre 72 y 120 horas). Se evalúa un fármaco de control positivo conocido en paralelo con el fármaco de prueba en cada prueba. Este fármaco es Ribavirina para la gripe, el sarampión, el RSV y la paragrape.

5 (ii) Aumento en la captación de colorante rojo neutro (NR).

Esta prueba se realiza para validar la inhibición de la CPE observada en la prueba inicial, y utiliza la misma placa de microtitulación de 96 pocillos después de que se haya leído la CPE. Se añade rojo neutro al medio; las células no dañadas por el virus captan una mayor cantidad de colorante, que se lee en un lector de microplacas informatizado. Se usa el procedimiento descrito por McManus (Appl. Environment. Microbiol. 31: 35 - 38, 1976). A partir de esta captación de colorante se determina una CE₅₀.

10 (iii) Prueba de confirmación: CPE visual y ensayo sobre el rendimiento del virus

Los compuestos considerados activos por la inhibición de la CPE y por la captación de tinte NR se volverán a probar usando tanto la inhibición de la CPE como el efecto sobre la reducción en el rendimiento del virus. Los eluidos recogidos de la prueba inicial se ensayan para comprobar el título de virus mediante dilución sucesiva en monocapas de células susceptibles. El desarrollo de una CPE en estas células es indicativo de la presencia de virus infecciosos. La CE₉₀, que es el fármaco que inhibe la producción de virus en 1-log, se determinó a partir de estos datos.

La Tabla 23 resume los resultados de parte de la prueba antivírica.

20 El compuesto **β-D-CL** es un potente compuesto anti-RSV *in vitro* con un índice de selectividad de 150. No reivindicado.

Tabla 23: efecto antivírico en virus respiratorios

Prueba inicial, cribado antivírico con virus respiratorios mediante inhibición de la CPE (Visual)			
		β-D-CL#	β-D-DJ#
Gripe A (H1N1)	CE ₅₀ (μM)	> 5	> 500
	IS**	0	0
Gripe A (H3N2)	CE ₅₀ (μM)	> 5	> 500
	IS**	0	0
Gripe B	CE ₅₀ (μM)	> 5	50
	IS**	0	> 10
RSV*	CE ₅₀ (μM)	0,5	500
	IS**	150	0
Virus de paragrape de tipo 3	CE ₅₀ (μM)	90	> 500
	IS**	0	0
Prueba inicial, cribado antivírico con virus respiratorios mediante rojo neutro			
		β-D-CL#	β-D-DJ#
<u>Gripe A (H1N1)</u>	CE ₅₀ (μM)	8	> 500
	IS**	1,1	0
<u>Gripe A (H3N2)</u>	CE ₅₀ (μM)	> 5	> 500
	IS**	0	0
<u>Gripe B</u>	CE ₅₀ (μM)	> 5	110
	IS**	0	> 4,5
<u>RSV*</u>	CE ₅₀ (μM)	< 0,5	> 500
	IS**	> 170	0
<u>Virus de paragrape de tipo 3</u>	CE ₅₀ (μM)	40	500
	IS**	1	> 1

*RSV: virus respiratorio sincitial A

**IS: índice de selectividad (CI₅₀/CE₉₀)

Ejemplo 59

Pruebas antivíricas de compuestos candidatos para Flaviviridae

25 A. El sistema de replicón del HCV en células Huh7.

Pueden cultivarse células Huh7 portadoras del replicón del HCV en medio DMEM (elevada glucosa, sin piruvato) que contiene un 10% de suero bovino fetal, 1X de aminoácidos no esenciales, Pen-Strep-Glu (100 unidades/litro,

100 microgramos/litro y 2,92 mg/litro, respectivamente) y entre 500 y 1.000 microgramos/mililitro de G418. Pueden realizarse ensayos de cribado antivíricos en el mismo medio sin G418 como sigue: con objeto de mantener las células en una fase de crecimiento logarítmico, se siembran células en una placa de 96 pocillos a una densidad baja de, por ejemplo, 1000 células por pocillo. Se añade el compuesto de prueba inmediatamente después de sembrar las células y se incuban durante un periodo de 3 a 7 días a 37°C en una estufa de incubación. Entonces se elimina el medio y las células se preparan para una extracción total de ácidos nucleicos (incluyendo el replicón de ARN y el ARN del hospedador). Entonces puede amplificarse el replicón de ARN en un protocolo de Q-RT-PCR, y consecuentemente cuantificarse. Las diferencias observadas en la cuantificación del replicón de ARN es una forma de expresar la potencia antivírica del compuesto de prueba. Un experimento típico demuestra que en el control negativo y en la configuración de los compuestos activos se produce una cantidad comparable de replicón. Esto puede concluirse porque el ciclo umbral medido para la RT-PCR del HCV en ambas configuraciones están cercanos entre sí. En dichos experimentos, una forma de expresar la eficacia antivírica de un compuesto es restar el ciclo umbral de RT-PCR del compuesto de prueba del ciclo umbral medio de RT-PCR de control negativo. Este valor se denomina DeltaCt (ΔCt o DCt). Una ΔCt de 3,3 significa una reducción de 1-log (significa CE_{90}) en la producción del replicón. Es compuestos que dan como resultado una reducción en los niveles de replicón de ARN del HCV de más de 2 valores de ΔCt (reducción del 75% del replicón de ARN) son compuestos candidatos para la terapia antivírica. Dichos compuestos candidatos pertenecen a estructuras con una fórmula general I - b o su enantiómero β -L. La **Tabla 24** proporciona los valores medios de ΔCt (N = número de veces probado) que puede obtenerse si se incuban los compuestos objetivo de la forma descrita durante 96 horas. Como control positivo se toma conjuntamente el interferón alfa-2a recombinante (Roferon-A, Hoffmann-Roche, Nueva Jersey, EE.UU.) como control positivo.

Sin embargo, este valor de ΔCt del HCV no incluye ningún parámetro de especificidad para la polimerasa de ARN dependiente de ARN vírico codificada por el replicón. En una configuración típica, un compuesto podría reducir tanto la actividad de la polimerasa de ARN del hospedador como la actividad de la polimerasa codificada por el replicón. Por lo tanto, la cuantificación del ARNr (o de cualquier otro producto de la polimerasa I de ARN del hospedador) o del ARNm de la beta-actina (o de cualquier otra polimerasa II de ARN del hospedador) y la comparación con los niveles de ARN de control sin fármaco, es una medida relativa del efecto de los compuestos de prueba sobre las polimerasas de ARN del hospedador. La **Tabla 24** también ilustra los valores de ΔCt para el ARNr de los compuestos de prueba.

Con la disponibilidad de ambos datos de la ΔCt del HCV y de la ΔCt del ARNr, puede introducirse otro parámetro de especificidad. Este parámetro se obtiene restando ambos valores de ΔCt entre sí. Esto da como resultado unos valores de Delta-DeltaCT ($\Delta\Delta Ct$ o $DDCt$); un valor por encima de 0 significa que hay un mayor efecto inhibitor en la polimerasa codificada por el replicón, un valor de $\Delta\Delta Ct$ por debajo de 0 significa los niveles de ARNr del hospedador están más afectados que los niveles de replicón. La actividad antivírica de los compuestos probados, expresada como valores de $\Delta\Delta Ct$, se proporciona en la **Tabla 24**. Como norma general, los valores de $\Delta\Delta Ct$ por encima de 2 se consideran significativamente diferentes del control de tratamiento sin fármaco, y por lo tanto, muestran una actividad antivírica apreciable. Sin embargo, los compuestos con un valor de $\Delta\Delta Ct$ menor de 2, pero que muestran unos datos de citotoxicidad molecular limitados (ΔCt del ARNr entre 0 y 2), también son posibles compuestos activos.

En otra configuración típica, un compuesto podría reducir la actividad de polimerasa de ARN del hospedador, pero no la actividad de polimerasa de ADN del hospedador. Por lo tanto, la cuantificación del ADNr o del ADN de la beta-actina (o de cualquier otro fragmento de ADN del hospedador) y la comparación con los niveles de ADN del control sin fármaco, es una medida relativa del efecto inhibitor del compuesto de prueba sobre las polimerasas de ADN celulares. La **Tabla 25** ilustra los valores de ΔCt para el ADNr de los compuestos de prueba.

Con la disponibilidad de ambos datos de la ΔCt del HCV y de la ΔCt del ADNr, puede introducirse otro parámetro de especificidad. Este parámetro se obtiene restando ambos valores de ΔCt entre sí. Esto da como resultado unos valores de $\Delta\Delta Ct$; un valor por encima de 0 significa que hay un mayor efecto inhibitor en la polimerasa codificada por el replicón, un valor de $\Delta\Delta Ct$ por debajo de 0 significa los niveles de ARNr del hospedador están más afectados que los niveles de replicón. La actividad antivírica de los compuestos probados, expresada como valores de $\Delta\Delta Ct$, se proporciona en la **Tabla 25**. Como norma general, los valores de $\Delta\Delta Ct$ por encima de 2 se consideran significativamente diferentes del control de tratamiento sin fármaco, y por lo tanto, es un compuesto interesante para una evaluación adicional. Sin embargo, los compuestos con un valor de $\Delta\Delta Ct$ menor de 2, pero con una citotoxicidad molecular limitada (ΔCt del ADNr entre 0 y 2) pueden ser deseables.

Los compuestos que dan como resultado una reducción específica de los niveles de replicón de ARN del HCV, pero con unas reducciones limitadas en los niveles celulares de ARN y/o ADN son compuestos candidatos para la terapia antivírica. Se detectaron compuestos candidatos por su capacidad específica para reducir el ARN de Flaviviridae (incluyendo BVDV y HCV), y compuestos potentes (**Tablas 21, 24 y 25**).

Tabla 24

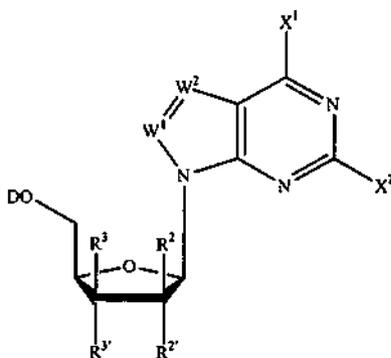
ID	n	Δ Ct media del ARN del HCV	Δ Ct media del ARNr	$\Delta\Delta$ Ct media
# β -D-DD	1	6,60	4,99	1,61
β -D-DH	3	4,13	2,91	1,21
# β -D-DJ	5	3,51	3,62	-0,11
IFN	4	5,21	0,69	4,52
ribavirina	2	3,13	2,35	0,78
# no reivindicado				

Tabla 25

ID	n	Δ Ct media del ARN del HCV	Δ Ct media del ARNr	$\Delta\Delta$ Ct media
# β -D-DD	1	6,60	3,30	3,30
β -D-DH	1	4,14	0,89	3,25
# β -D-DJ	1	4,84	2,70	2,14
# no reivindicado				

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula [I - b]:



[I-b]

o su enantiómero β-L o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- 5 D es hidrógeno;
 W¹ es CH;
 W² es N
 cada X¹ y X² es independientemente hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br o I), NH₂, NHR⁴ o NR⁴R^{4'};
 R² es hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br o I) u OH;
 10 R^{2'} es hidrógeno, Cl, Br, I u OH,
 R³ es hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br o I) u OH;
 R^{3'} es hidrógeno, Cl, Br o I;
 cada R⁴ y R^{4'} es independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior, arilo, o arilalquilo; de forma
 que para el nucleósido de fórmula general (I - b) al menos uno de R² y R^{2'} es hidrógeno y al menos uno de R³ y
 15 R^{3'} es hidrógeno;

en donde "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo saturado lineal, ramificado o cíclico de C₁ a C₄;
 para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una infección vírica por *Flaviviridae*, siempre que:

- 20 el compuesto de fórmula I - b no sea 3'-desoxiadenosina cuando dicho uso es el tratamiento de enfermedades
 mediadas por el virus de la hepatitis C, y
 el compuesto de fórmula I - b no sea 6-cloro-3'-desoxiguanosina cuando dicho uso es un procedimiento para el
 tratamiento o la prevención de infecciones por *Flavivirus* en un hospedador que comprende administrar una
 cantidad terapéuticamente eficaz de 6-cloro-3'-desoxiguanosina.

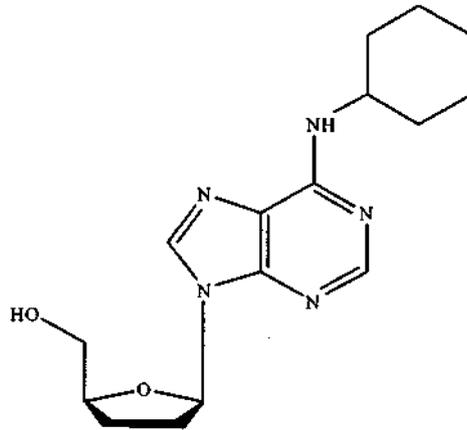
2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que el nucleósido β-D de la fórmula (I - b) se selecciona de
 entre uno de los siguientes:

X ¹	X ²	W ¹	R ²	R ^{2'}	R ³	R ^{3'}
NH ₂	H	CH	H	H	H	H
Cl	H	CH	F	H	H	H
NH ₂	H	CH	H	OH	H	H
Cl	H	CH	H	OH	H	H

25

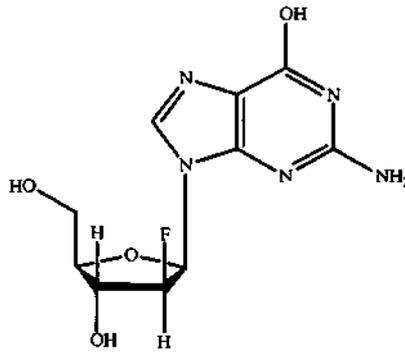
o su enantiómero β-L o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto de fórmula:



o su enantiómero β -L o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una infección vírica por *Flaviviridae*.

4. Un compuesto de fórmula:



5

o su enantiómero β -L o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una infección vírica por *Flaviviridae*.

5. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en el que cada R^4 y R^4 es independientemente fenilo o bencilo sustituido o no sustituido.

10 6. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la infección vírica por *Flaviviridae* es una infección por el virus de la hepatitis C.

7. El compuesto para el uso según la reivindicación 6, en el que la infección vírica por *Flaviviridae* es una infección por el virus de la hepatitis C y en el que el compuesto está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.