

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 404**

51 Int. Cl.:

C07H 19/073 (2006.01)

A61K 31/7064 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

C07H 19/067 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2006 E 06790781 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1931691**

54 Título: **Inhibidores ODCasa para el tratamiento de malaria**

30 Prioridad:

03.10.2005 US 596537 P

12.11.2005 US 597142 P

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

30.12.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY HEALTH NETWORK (100.0%)
R. FRASER ELLIOTT BUILDING, ROOM 1S-417
190 ELIZABETH STREET
TORONTO, ON M5G 2C4, CA**

72 Inventor/es:

**KOTRA, LAKSHMI, P.;
PAI, EMIL, F.;
BELLO, ANGELICA, M. y
FUJIHASHI, MASAHIRO**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 436 404 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

Inhibidores ODCasa para el tratamiento de malaria

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a ciertos compuestos de uridina sustituidos en 6 para su uso en el tratamiento y la prevención de malaria. La invención también se refiere a novedosos compuestos de uridina que tienen actividad inhibitoria de ODCasa y a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La ODCasa (EC 4.1.1.23) desempeña una función central en la síntesis *de novo* de uridina-5'-O-monofosfato (UMP). La UMP es un bloque estructural, sintetizado *de novo* a partir de ácido aspártico, para la síntesis de otros nucleótidos de pirimidina tales como uridina-5'-O-trifosfato (UTP), citidina-5'-O-trifosfato (CTP), timidina-5'-O-trifosfato (TMP) y 2'-desoxicitidina-5'-O-trifosfato (dCTP) (Figura 1). Los nucleótidos de pirimidina son los elementos estructurales para la síntesis de ARN y ADN, las moléculas esenciales para la replicación y supervivencia celular. Debido a su importante función en la síntesis de ácidos nucleicos *de novo* de células, la ODCasa está presente en bacterias, *archaea*, parásitos y en seres humanos, es decir, casi en cualquier especie, excepto en virus. Esta enzima cataliza la descarboxilación de orotidina monofosfato (OMP) a uridina monofosfato (UMP) (compuestos **1** y **2** en la etapa final en la Figura 1). Esta enzima es particularmente interesante para los enzimólogos debido a que presenta un nivel extraordinario de potenciamiento de la tasa catalítica de más de 17 órdenes de magnitud en comparación con la reacción de descarboxilación sin catalizar en agua a pH neutro de 7,0, 25 °C.^{i,ii} Una descarboxilación sin catalizar de OMP dura aproximadamente 78 millones de años, y la descarboxilación enzimática en una escala de tiempo de milisegundos. Así, la ODCasa es uno de los miembros más capaces del mundo enzimático.^{ii,iii,iv,v}

De forma interesante, las descarboxilasas encontradas en la naturaleza usan tanto un cofactor como productos intermedios covalentes durante la catálisis de reacciones de descarboxilación.^{vi,vii} Por ejemplo, la indol piruvato descarboxilasa (IPDC) dependiente de tiamina difosfato usa tiamina como cofactor y se forman productos intermedios covalentes con el cofactor durante el procedimiento de descarboxilación. Se cree que la ODCasa es bastante inusual en catalizar la descarboxilación con tal capacidad sin la ayuda ningún co-factor, metal o producto intermedio covalente.^{i,ii,iii} Una diferencia interesante cuando se mira esta enzima a través de las especies es que en ciertos organismos de nivel superior tales como el ser humano o ratón, la ODCasa es una parte de la enzima bifuncional, UMP sintasa.^{viii} En organismos patógenos tales como bacterias, hongos y parásitos, la ODCasa es una enzima monofuncional.^{ix,x} En todas las especies, la ODCasa (tanto si es monofuncional como bifuncional) es activa como una unidad dimérica.

En general, las investigaciones que eligen ODCasa como diana se basaron en la malaria, cáncer y algunas investigaciones antivirales. En las últimas dos décadas se investigaron ampliamente varios análogos de OMP para entender el mecanismo catalítico de ODCasa.^{iii,xi} Entre estos análogos, 6-aza-UMP (**3**) y 6-hidroxi-UMP (o BMP, **4**), pirazofurina, xantosina-5'-monofosfato (XMP, **12**) y 6-tiocarboxamido-UMP (**13**) son algunos de los potentes inhibidores que se estudiaron contra ODCasa (Figura 2).^{xii,xiii,xiv} Sin embargo, el desarrollo de candidatos a inhibidores se ha limitado debido a sus toxicidades y falta de especificidad.^{xii} También hay investigaciones de relación estructura-actividad muy limitadas o inexistentes y diseño de inhibidores contra ODCasa. Así, la ODCasa no ha ganado mucha adherencia en los 80 y los 90 como diana de fármaco.

Aparte de su obvio interés farmacológico, la ODCasa ha sido una enzima favorita para bioquímicos y biólogos estructurales debido a sus inusuales propiedades catalíticas. Se propusieron varios mecanismos antes de y después de la disponibilidad de las estructuras cristalinas de rayos X para varias ODCasas en 2000.^{xv,xvi,xvii,xviii} Aunque se trataron ideas de catálisis covalente, ninguno de los mecanismos presentado incluyó una formación de especies covalentes como etapa clave durante la descarboxilación por ODCasa. Un análisis del sitio catalítico de ODCasa de *Metanobacterium thermoautotrophicum* (*Mt*) reveló dos residuos aspartato (Asp70 y Asp75B, el último contribuido por la segunda subunidad de la ODCasa dimérica) y dos residuos de lisina (Lys42 y Lys72) que se mantienen mediante una fuerte red de enlaces de hidrógeno (Figura 3). Los análisis de varias estructuras de co-cristales de ODCasa con una variedad de ligandos confirman que estos residuos se mantienen estrechamente en sus posiciones respectivas en el sitio activo y hay menos de 0,5 Å de movimiento en las posiciones de las cadenas laterales de estos residuos. La prueba existente no soporta ningún residuo de sitio activo que forme un enlace covalente tanto con el sustrato durante la catálisis como con cualquier inhibidor conocido.^{iii,xvi,xix,xx,xxi} Los cuatro residuos anteriores se proponen para ejercer tensión estérica y electrostática fuerte sobre el grupo carboxilato C-6 de OMP y eliminar el grupo carboxilo.^{xvi}

Hoy en día se conocen las estructuras cristalinas de rayos X de ODCasa de diez especies diferentes. En 2000, cuatro estructuras cristalinas de rayos X de ODCasa incluyeron el mecanismo catalítico de esta enzima. Basándose en la estructura de ODCasa de *S. cerevisiae* complejada con el análogo de estado de transición BMP (**4**), se propuso un mecanismo de estabilización del estado de transición de descarboxilación de OMP.^{xviii} También se sugirió una propuesta similar por Appleby y col. basándose en la estructura cristalina de ODCasa (*Bacillus subtilis*) complejada con el producto, UMP.^{xvii} Estos autores sugirieron que la reacción de descarboxilación avanza mediante una sustitución electrófila en la que C-6 está protonado por Lys62 a medida que se libera la molécula de dióxido de carbono.^{xvii} La estructura de la

enzima ODCasa de *E. coli* co-cristalizada con BMP era la base de la propuesta presentada por Harris y col.^{xxii} Basándose en la proximidad del resto carboxilato sobre OMP (1) y el residuo Asp71 en el sitio activo de ODCasa, se propuso que la descarboxilación de OMP depende de la existencia de un protón compartido entre Asp71 y el grupo carboxilo del sustrato.^{xxii} Se postuló un mecanismo similar que implica repulsión electrostática por Wu y col.^{xvi} Este mecanismo de

5 descarboxilación de OMP se basa en los principios del efecto de Circe descrito por Jencks en 1975.^{xxiii} El efecto de Circe establece que sólo el grupo reactivo del sustrato necesita estar desestabilizado. La fuerte interacción entre la parte no reactiva del sustrato y el sitio activo de la enzima proporciona la energía para desestabilizar directamente el grupo reactivo del sustrato.^{xxiii} El mecanismo de repulsión electrostática señala al residuo de aspartato de sitio activo. En cuatro especies diferentes la localización y función de este residuo está altamente conservada. Los residuos catalíticos Asp70 y

10 Lys72 se localizan próximos al centro de reacción C-6 del anillo de pirimidina del sustrato OMP y se postuló que Asp70 (*M. thermoautotrophicum*) proporcionaba la desestabilización electrostática del complejo enzima-sustrato. Lys72 en el sitio activo provee el protón para neutralizar el carbanión desarrollado después de la salida del carboxilato.^{xvi} A pesar de varias estructuras de rayos X y enzimología en profundidad en las dos últimas décadas, la ODCasa continúa retando a los bioquímicos con mecanismo todavía sin resolver y nuevos giros (véase más adelante).

15 En el sitio activo de ODCasa se propone que el grupo monofosfato de OMP se une primero y este grupo contribuye a la mayor energía requerida para la unión del sustrato a ODCasa.^{xxiv} La eliminación de fosfato de la molécula de sustrato produjo una eficiencia catalítica significativamente menor medida como la constante de segundo orden (k_{cat}/K_M) para la catálisis de sustrato a producto.^{xxiv} En un interesante experimento, la unión del dianión fosfito (HPO_3^{2-}) a ODCasa (de *S. cerevisiae*) produjo un aumento de 80.000 veces en la constante de segundo orden para la descarboxilación del sustrato truncado que carece de un resto fosfato.^{xxv} Así, el grupo fosfato es un componente importante para la unión de ODCasa. Así, con el fin de que los fármacos de nucleósido (la correcta terminología es profármacos) sean activos contra ODCasa *in vivo*, el compuesto de nucleósido tiene que convertirse en su forma de monofosfato dentro de la célula por cualquier nucleósido cinasa y luego inhibir la ODCasa (tanto en una célula de patógeno como humana). Esto es muy similar a

20 otros fármacos de nucleósido tales como AZT, 3TC, gemcitabina, entre varios fármacos de nucleósido que se usan clínicamente, así hay una buena posibilidad para que las "forma de nucleósido" de inhibidores de ODCasa sirvan de fármacos.

30 Si se analiza cuidadosamente la base bioquímica y farmacológica, la ODCasa es una de las enzimas más fascinantes como diana para fármaco. Por ejemplo, especies de *Plasmodia* tales como *P. falciparum* y *P. vivax* dependen de su propia síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina debido a la ausencia de la ruta salvaje en estos parásitos.^{xxvi} En el ser humano, sin embargo, los nucleótidos de pirimidina se sintetizan mediante tanto las rutas *de novo* como las salvajes.^{xxvii} Así, la inhibición de ODCasa de plasmodio se ha propuesto como una estrategia para diseñar compuestos dirigidos contra la malaria y se investigó un número limitado de análogos de orotato como posibles fármacos contra el

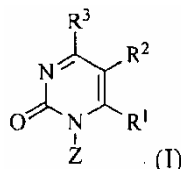
35 parásito palúdico.^{xii,xxviii,xxix} La mayoría de estos compuestos son muy polares con escasos problemas farmacocinéticos.

Sigue existiendo la necesidad de nuevos inhibidores de ODCasa como agentes terapéuticos, por ejemplo, para la prevención y el tratamiento de malaria.

40 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se prepararon varios derivados de C6 de uridina y se encontró que eran inhibidores no covalentes (competitivos) y covalentes (irreversibles) contra ODCasa. Estos compuestos también presentaron potente actividad antiplasmodial.

45 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, tautómeros del mismo y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables, en el que los profármacos están seleccionados de ésteres fenílicos, ésteres de alquilo C₈-C₂₄, ésteres alcoximetilicos, carbamatos y ésteres de aminoácidos, de cualquier grupo hidroxilo, tiol, amino o carboxilo disponible en el compuesto de fórmula I para el mismo:



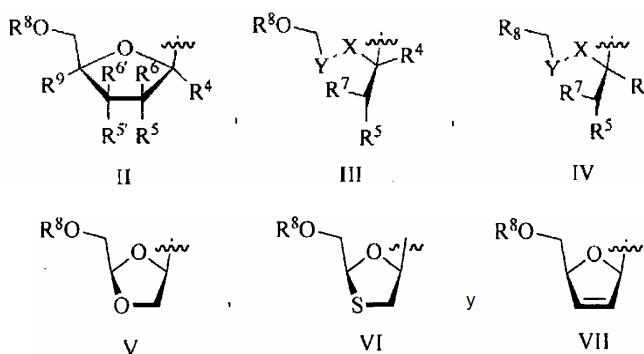
en la que

55 R¹ se selecciona de CN, N₃, I, Br, NH₂, NO₂, C(O)alquilo C₁₋₆, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, NHC(O)alquilo C₁₋₆ y NHC(O)O-alquilo C₁₋₆;

R² se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, fluoro-alquilo C₁₋₆ sustituido, fluoro-alcoxi C₁₋₆ sustituido, N₃, NH₂ y CN;

R³ se selecciona de OH, NH₂, H y NHC(O)alquilo C₁₋₆;

Z se selecciona de:



5 en las que

R^4 se selecciona de H, alquilo C_1-C_6 e hidroxi-alquilo C_1-C_6 sustituido;
 uno de R^5 y R^6 es hidrógeno y el otro se selecciona de H, OH y F; o
 R^5 y R^6 o R^5 y R^6 juntos pueden ser $=O$ o $=CH_2$;
 R^7 se selecciona de H, F y OH;
 R^8 se selecciona de H, $C(O)$ alquilo C_1-C_6 , $P(O)(OH)_2$, $P(O)(O$ -alquilo $C_1-C_6)_2$ y $P(O)(O$ -alquilo $C_1-C_6)OH$;
 R^9 se selecciona de H, N_3 , CN, alquilo C_1-C_6 ; y
 X-Y se selecciona de $-CH_2-O-$, $-O-CH_2-$ y $-S-CH_2-$;

15 para su uso en el tratamiento o prevención de malaria en un sujeto.

En otras realizaciones, la presente invención incluye un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo, como se ha descrito anteriormente, para la

También se incluye en la presente invención un procedimiento para inhibir ODCasa en una muestra de plasma o de sangre aislada de un sujeto que comprende añadir a dicha muestra de plasma o de sangre una cantidad eficaz inhibidora

La presente invención también incluye un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente, para su uso en prevenir o tratar una infección de un parásito palúdico en un sujeto, además de un uso de

Según otro aspecto de la presente invención se incluye una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de malaria que comprende una cantidad eficaz antipalúdica de un compuesto seleccionado de un compuesto

Los presentes inventores han mostrado que ciertos derivados de uridina sustituidos en 6 son útiles como inhibidores de ODCasa, en particular para el tratamiento y la prevención de malaria. Por consiguiente, la presente invención incluye

- 50 6-(dimetilamino)uridina;
- 5-fluoro-6-aminouridina;
- 5-bromo-6-aminouridina;
- 55 5-fluoro-6-azidouridina;

- 1'-hidroximetil-6-yodo-uridina;
6-(dimetilamino)-2'-desoxiuridina;
5 5-fluoro-6-amino-2'-desoxiuridina;
5-bromo-6-amino-2'-desoxiuridina;
10 5-fluoro-6-azido-2'-desoxiuridina;
5-cloro-6-yodo-2'-desoxiuridina;
5-cloro-6-azido-2'-desoxiuridina;
15 5-metoxi-6-yodo-2'-desoxiuridina;
5-metoxi-6-azido-2'-desoxiuridina;
20 5-metoxi-6-amino-2'-desoxiuridina;
5-bromo-6-yodo-2'-desoxiuridina;
5-bromo-6-azido-2'-desoxiuridina;
25 6-(dimetilamino)uridina-5'-monofosfato;
5-fluoro-6-aminouridina-5'-monofosfato;
5-bromo-6-aminouridina-5'-monofosfato;
30 5-fluoro-6-azidouridina-5'-monofosfato;
1'-hidroximetil-6-yodo-uridina-5'-monofosfato
35 6-(dimetilamino)-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
5-fluoro-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
5-bromo-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
40 5-fluoro-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
5-cloro-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
45 5-cloro-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
5-metoxi-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
5-metoxi-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
50 5-metoxi-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
5-bromo-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
55 5-bromo-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
5-fluoro-6-yodo-uridina-5'-monofosfato;
60 6-yodo-uridina-5'-acetato;
6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-acetato, y

sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos como se ha descrito anteriormente,

- 65 La presente invención incluye adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de:

- 6-(dimetilamino)uridina;
- 5 5-fluoro-6-aminouridina;
- 5-bromo-6-aminouridina;
- 5-fluoro-6-azidouridina;
- 10 1'-hidroximetil-6-yodo-uridina;
- 6-(dimetilamino)-2'-desoksiuridina;
- 15 5-fluoro-6-amino-2'-desoksiuridina;
- 5-bromo-6-amino-2'-desoksiuridina;
- 5-fluoro-6-azido-2'-desoksiuridina;
- 20 5-cloro-6-yodo-2'-desoksiuridina;
- 5-cloro-6-azido-2'-desoksiuridina;
- 5-metoxi-6-yodo-2'-desoksiuridina;
- 25 5-metoxi-6-azido-2'-desoksiuridina;
- 5-metoxi-6-amino-2'-desoksiuridina;
- 30 5-bromo-6-yodo-2'-desoksiuridina;
- 5-bromo-6-azido-2'-desoksiuridina;
- 35 6-(dimetilamino)uridina-5'-monofosfato;
- 5-fluoro-6-aminouridina-5'-monofosfato;
- 5-bromo-6-aminouridina-5'-monofosfato;
- 40 5-fluoro-6-azidouridina-5'-monofosfato;
- 1'-hidroximetil-6-yodo-uridina-5'-monofosfato
- 45 6-(dimetilamino)-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 5-fluoro-6-amino-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 5-bromo-6-amino-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 50 5-fluoro-6-azido-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 5-cloro-6-yodo-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 5-cloro-6-azido-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 55 5-metoxi-6-yodo-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 5-metoxi-6-azido-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 60 5-metoxi-6-amino-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 5-bromo-6-yodo-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 5-bromo-6-azido-2'-desoksiuridina-5'-monofosfato;
- 65 5-fluoro-6-yodo-uridina-5'-monofosfato;

6-yodo-uridina-5'-acetato;

6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-acetato, y

5 sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos como se ha descrito anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, sólo se facilitan a modo de ilustración.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La Figura 1 es un esquema que muestra la síntesis *de novo* de uridina monofosfato a partir de ácido aspártico (técnica anterior).

La Figura 2 es un esquema que muestra las estructuras químicas de análogos de orotidina monofosfato (OMP) que se conocen como inhibidores de ODCasa.

20 La Figura 3 muestra la estructura de rayos X del sitio catalítico de ODCasa de *Metanobacterium thermoautotrophicum*.

La Figura 4 muestra curvas de inhibición cuando *P. falciparum* se trató con el compuesto li, contra cepas aisladas de 3D7 y ItG, además de contra líneas celulares CHO.

La Figura 5 muestra imágenes de parasitemia en la sangre de ratones durante estudios de eficacia *in vivo* en ratones usando el compuesto li. Las flechas indican glóbulos sanguíneos infectados con parásitos de los ratones.

30 La Figura 6 muestra tasas de supervivencia en ratones infectados por *P. burghei* y cuando se trata con el compuesto li.

La Figura 7 muestra los resultados de un estudio de eficacia de ratón con dosificación múltiple usando tratamiento con compuestos li.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

40 El término "alquilo C_{1-n}" como se usa en el presente documento significa radicales alquilo saturados de cadena lineal y/o ramificada que contienen de uno a "n" átomos de carbono e incluye (dependiendo de la identidad de n) metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, isobutilo, t-butilo, 2,2-dimetilbutilo, n-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, n-hexilo y similares, siendo la variable n un número entero que representa el mayor número de átomos de carbono en el radical alquilo.

45 El término "fluoro-alquilo C_{1-n} sustituido" como se usa en el presente documento significa radicales alquilo saturados de cadena lineal y/o ramificada que contienen de uno a n átomos de carbono en los que uno o todos los átomos de hidrógeno han sido sustituidos con un flúor, e incluye (dependiendo de la identidad de "n") trifluorometilo, pentafluoroetilo, fluorometilo y similares, siendo la variable n un número entero que representa el mayor número de átomos de carbono en el radical alquilo.

50 El término "hidroxi-alquilo C_{1-n} sustituido" como se usa en el presente documento significa radicales alquilo saturados de cadena lineal y/o ramificada que contienen de uno a n átomos de carbono en los que uno o dos de los átomos de hidrógeno han sido sustituidos con un grupo hidroxilo, e incluye (dependiendo de la identidad de "n") CH₂OH, CHOHCH₂CH₃, CH₂CHOHCH₂CH₂OH y similares, siendo la variable n un número entero que representa el mayor número de átomos de carbono en el radical alquilo.

El término "halo" como se usa en el presente documento significa halógeno e incluye cloro, fluoro, bromo y yodo.

60 El término "tautómero" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que son interconvertibles por una migración formal de un átomo de hidrógeno o protón, acompañado de un cambio de un enlace sencillo y un doble enlace adyacente. En disoluciones en las que es posible la tautomerización se alcanzará un equilibrio químico de los tautómeros. La relación exacta de los tautómeros depende de varios factores, que incluyen temperatura, disolvente y pH.

65 El término "solvato" como se usa en el presente documento significa un compuesto de fórmula I, o una sal de un compuesto de fórmula I, en el que las moléculas de un disolvente adecuado se incorporan en la red cristalina. Un

disolvente adecuado es fisiológicamente tolerable a la dosificación administrada. Ejemplos de disolventes adecuados son etanol, agua y similares. Si el agua es el disolvente, la molécula se denomina un "hidrato".

5 El término "compuesto(s) de la invención" como se usa en el presente documento significa compuesto(s) de fórmula I, y sales, solvatos y profármacos de los mismos.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de adición de ácido o una sal de adición de base que es adecuada para o compatible con el tratamiento de pacientes.

10 El término "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa cualquier sal orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto de base de la invención, o cualquiera de sus productos intermedios. Los compuestos básicos de la invención que pueden formar una sal de adición de ácido incluyen, por ejemplo, en los que R¹, R² y/o R³ es NH₂ y NH-alquilo C₁₋₆. Ácidos inorgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, además de sales metálicas tales como monohidrogenoortofosfato de sodio e hidrogenosulfato de potasio. Ácidos orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos mono-, di- y tricarbónicos tales como ácido glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, benzoico, fenilacético, cinámico y salicílico, además de ácidos sulfónicos tales como ácidos p-toluenosulfónico y metanosulfónico. Pueden formarse tanto sales de mono como de di-ácido, y tales sales pueden existir en tanto una forma hidratada, solvatada como sustancialmente anhidra. En general, las sales de adición de ácido de los compuestos de la invención son más solubles en agua y diversos disolventes orgánicos hidrófilos, y generalmente demuestran mayores puntos de fusión en comparación con sus formas de base libre. La selección de la sal apropiada será conocida para un experto en la materia. Pueden usarse otras sales de adición de ácido farmacéuticamente no aceptables, por ejemplo oxalatos, por ejemplo, en el aislamiento de los compuestos de la invención, para uso de laboratorio, o para la posterior conversión en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

15

20

25

El término "sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa cualquier sal de adición de base orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto ácido de la invención, o cualquiera de sus productos intermedios. Los compuestos ácidos de la invención que pueden formar una sal de adición de base incluyen, por ejemplo, en los que R⁸ es un fosfato. Bases inorgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen hidróxido de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o bario. Bases orgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas tales como metilamina, trimetilamina y picolina, alquilamoniacos o amoniaco. La selección de la sal apropiada será conocida para un experto en la materia. Pueden usarse otras sales de adición de base farmacéuticamente no aceptables, por ejemplo, en el aislamiento de los compuestos de la invención, para uso de laboratorio, o para la posterior conversión en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

30

35

El término "malaria" como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad infecciosa, también conocida como fiebre palúdica recurrente o paludismo, normalmente producida por un parásito protista del género *Plasmodium*, adecuadamente, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*. Este parásito se transmite principalmente por los mosquitos Anopheles hembra. El *Plasmodium* invade y consume los glóbulos rojos de sus huéspedes, conduciendo a síntomas que incluyen fiebre, anemia, y en casos graves, a coma que posiblemente conduce a muerte.

40

El término una "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad eficaz" o una "cantidad suficiente" de un compuesto de la presente invención es una cantidad suficiente para, cuando se administra al sujeto, que incluye un mamífero, por ejemplo un ser humano, efectuar resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos y, como tal, una "cantidad eficaz" o sinónimo de la misma depende del contexto en que se esté aplicando. Por ejemplo, en el contexto para inhibir ODCasa, por ejemplo, es una cantidad del compuesto suficiente para lograr una inhibición tal en la actividad de ODCasa con respecto a la respuesta obtenida sin administración del compuesto. En el contexto de enfermedad, cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos de la presente invención se usan para tratar, modular, atenuar, invertir o afectar la malaria en un mamífero. Una "cantidad eficaz" pretende significar la cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir la malaria o una enfermedad asociada a la malaria. En algunas realizaciones adecuadas, la malaria o la enfermedad o trastorno asociado a la malaria se produce por un parásito de *Plasmodium*, adecuadamente, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*, así, es la cantidad suficiente para, cuando se administra al sujeto, que incluye un mamífero, por ejemplo, un ser humano, para tratar, prevenir o inhibir la malaria o una enfermedad o un trastorno asociado a la malaria o un parásito palúdico, por ejemplo, parásito de *Plasmodium*. La cantidad de un compuesto dado de la presente invención que se corresponderá con una cantidad tal variará dependiendo de diversos factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto o huésped que está tratándose, y similares, pero puede sin embargo determinarse rutinariamente por un experto en la materia. Por tanto, como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la presente invención es una cantidad que previene, inhibe, suprime o reduce la malaria (por ejemplo, como se ha determinado por síntomas clínicos o la cantidad de parásitos palúdicos, por ejemplo, organismos de *Plasmodium*) en un sujeto con respecto a un control. Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención puede determinarse fácilmente por un experto habitual por procedimientos rutinarios conocidos en la técnica.

45

50

55

60

65

En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 7 mg/kg de peso corporal, adecuadamente aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, y más adecuadamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar eficazmente un sujeto, o prevenir que un sujeto sea afectado por la malaria, y estos factores incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes.

Además, una pauta de "tratamiento" o "prevención" de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención puede consistir en una única administración, o comprender alternativamente una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención puede administrarse al menos una vez a la semana. Sin embargo, en otra realización, el compuesto puede administrarse al paciente de aproximadamente una vez por semana a aproximadamente una vez al día durante un tratamiento dado. La duración del periodo de tratamiento depende de una variedad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración y la actividad de los compuestos de la presente invención, o una combinación de los mismos. También se apreciará que la dosificación eficaz del compuesto usado para el tratamiento o la profilaxis puede aumentar o disminuir durante el transcurso de una pauta de tratamiento o de profilaxis particular. Pueden resultar cambios en la dosificación y ser evidentes por ensayos de diagnóstico convencionales conocidos en la técnica. En algunos casos puede requerirse administración crónica. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse antes, durante o después de la exposición a la malaria o parásito antipalúdico, por ejemplo, parásito de *Plasmodium*.

Como se usa en el presente documento, "administrado contemporáneamente" significa que dos sustancias se administran a un sujeto de forma que ambas sean biológicamente activas en el sujeto al mismo tiempo. Los detalles exactos de la administración dependerán de la farmacocinética de las dos sustancias la una en presencia de la otra, y puede incluir administrar una sustancia en el plazo de 24 horas desde la administración de la otra, si las farmacocinéticas son adecuadas. El diseño de pautas de dosificación adecuadas es rutina para un experto en la materia. En realizaciones particulares, dos sustancias se administrarán sustancialmente simultáneamente, es decir, en el plazo de minutos la una con respecto a la otra, o en una única composición que comprende ambas sustancias.

Como se usa en el presente documento, y como es bien entendido en la materia, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluye resultados clínicos. Resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o condiciones, disminución del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), prevención de la propagación de la enfermedad, retraso a ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como completa), tanto detectable como no detectable.

"Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia con respecto a la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

"Paliar" una enfermedad o trastorno significa que el grado y/o manifestaciones clínicas no deseables de un trastorno o un estado de enfermedad se reducen y/o el transcurso de tiempo de la progresión se ralentiza o prolonga, con respecto a no tratar el trastorno.

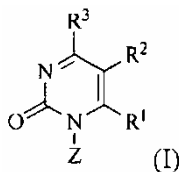
El término "prevención" o "profilaxis", o sinónimo del mismo, como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción en el riesgo o probabilidad de que un paciente sea aquejado de malaria o que manifieste un síntoma asociado a la malaria.

"Inhibir" o "suprimir" o "reducir" una función o actividad, tal como actividad de ODCasa, es reducir la función o actividad cuando se compara con de otro modo las mismas condiciones, excepto por una condición o parámetro de interés, o alternativamente, con respecto a otras condiciones.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento incluye todos los miembros del reino animal que incluyen al ser humano. El sujeto es adecuadamente un ser humano.

II. Procedimientos de la invención

La presente invención incluye un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I, tautómeros del mismo y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente:



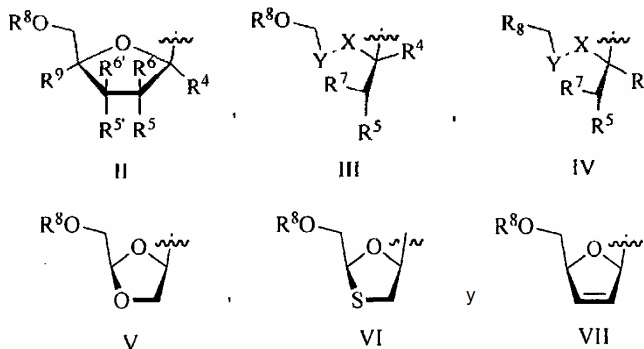
en la que

R¹ se selecciona de CN, N₃, I, Br, NH₂, NO₂, C(O)alquilo C₁₋₆, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, NHC(O)alquilo C₁₋₆ y NHC(O)O-alquilo C₁₋₆;

5 R² se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, fluoro-alquilo C₁₋₆ sustituido, fluoro-alcoxi C₁₋₆ sustituido, N₃, NH₂ y CN;

R³ se selecciona de OH, NN₂, H y NHC(O)alquilo C₁₋₆;

Z se selecciona de:



10

en las que

15

R⁴ se selecciona de H, alquilo C₁₋₆ e hidroxialquilo C₁₋₆ sustituido;

uno de R⁵ y R⁶ es hidrógeno y el otro se selecciona de H, OH y F; o

R⁵ y R⁶ o R⁵ y R⁶ juntos pueden ser =O o =CH₂;

20

R⁷ se selecciona de H, F y OH;

R⁸ se selecciona de H, C(O)alquilo C₁₋₆, P(O)(OH)₂, P(O)(O-alquilo C₁₋₆)₂ y P(O)(O-alquilo C₁₋₆)OH;

R⁹ se selecciona de H, N₃, CN, alquilo C₁₋₆; y

X-Y se selecciona de -CH₂O-, -O-CH₂- y -S-CH₂-;

para su uso en el tratamiento o prevención de malaria.

25

En una realización de la invención, R¹ en los compuestos de fórmula I se selecciona de CN, N₃, I, Br, NH₂, NO₂, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, NHC(O)alquilo C₁₋₆ y NHC(O)O-alquilo C₁₋₆. En realizaciones de la invención, R¹ en los compuestos de fórmula I se selecciona de I, Br, NO₂, N(alquilo C₁₋₄)₂, NHC(O)alquilo C₁₋₄ y NHC(O)O-alquilo C₁₋₄. En otras realizaciones de la invención, R¹ en los compuestos de fórmula I se selecciona de I, Br, NO₂, N(CH₃)₂, NHC(O)CH₃ y NHC(O)CH₃. En todavía otras realizaciones de la invención, R¹ en los compuestos de fórmula I se selecciona de I, Br y N(CH₃)₂. R¹ en los compuestos de fórmula I es I (yodo).

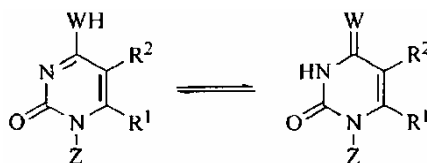
30

En una realización de la invención, R² en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, fluoro-alquilo C₁₋₆ sustituido, fluoro-alcoxi C₁₋₆ sustituido, N₃, NH₂ y CN. En realizaciones de la invención, R² en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, fluoro-alquilo C₁₋₄ sustituido, fluoro-alcoxi C₁₋₄ sustituido, N₃, NH₂ y CN. En otras realizaciones de la invención, R² en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, fluoro, cloro, bromo, CH₃, OCH₃, CF₃, CF₃O, N₃, NH₂ y CN. En todavía otras realizaciones de la invención, R² en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, fluoro, cloro, bromo, OCH₃ y CF₃, CF₃O.

35

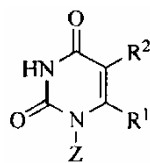
En una realización de la invención, R³ en los compuestos de fórmula I se selecciona de OH, NH₂, H y NHC(O)alquilo C₁₋₆. En realizaciones de la invención, R³ en los compuestos de fórmula I se selecciona de OH y NH₂. Si R³ en los compuestos de fórmula I se selecciona de OH y NH₂, los compuestos de fórmula I pueden existir como uno de los siguientes tautómeros:

40

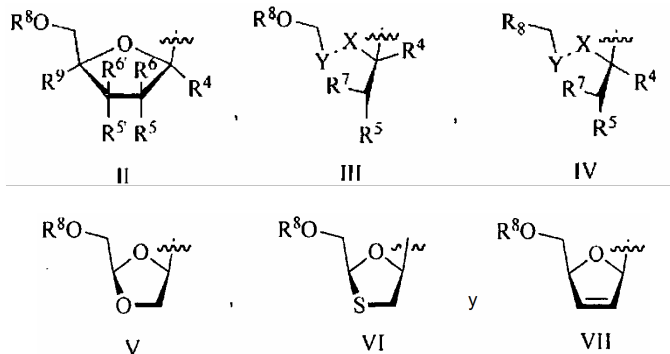


45

en las que W es O o NH. En realizaciones de la invención, W es O y el tautómero favorecido es:



En una realización de la invención, Z en los compuestos de fórmula I se selecciona de:



5

En una realización de la invención, Z es de fórmula II.

10

En una realización de la invención, R^4 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, alquilo C_1-C_6 e hidroxi-alquilo C_1-C_6 sustituido. En una realización de la invención, R^4 en los compuestos de fórmula I es H.

15

En una realización de la invención, los compuestos de fórmula I incluyen aquellos en los que R^5 y R^5 están seleccionados independientemente de H, OH y F y R^6 y R^6 están seleccionados independientemente de H, OH y F, a condición de que si R^5 no es H, entonces R^6 es H y si R^5 no es H, entonces R^6 es H; o R^5 y R^6 o R^5 y R^6 pueden ser juntos $=O$ o $=CH_2$. En una realización de la invención, R^5 y R^5 son ambos OH y R^6 y R^6 son ambos H. En otra realización de la invención, R^5 es H, R^5 es OH y R^6 y R^6 son ambos H.

20

En una realización de la invención, R^7 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, F y OH, adecuadamente H u OH.

25

En una realización de la invención, R^8 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, $C(O)$ alquilo C_1-C_6 , $P(O)(OH)_2$, $P(O)(O$ -alquilo $C_1-C_6)_2$ y $P(O)(O$ -alquilo $C_1-C_6)OH$. En realizaciones de la invención, R^8 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, $C(O)$ alquilo C_1-C_4 , $P(O)(OH)_2$, $P(O)(O$ -alquilo $C_1-C_4)_2$ y $P(O)(O$ -alquilo $C_1-C_4)OH$. En otras realizaciones de la invención, R^8 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, $C(O)CH_3$, $P(O)(OH)_2$, $P(O)(OCH_3)_2$ y $P(O)(OCH_3)OH$. En todavía otras realizaciones de la invención, R^8 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, $C(O)CH_3$ y $P(O)(OH)_2$.

30

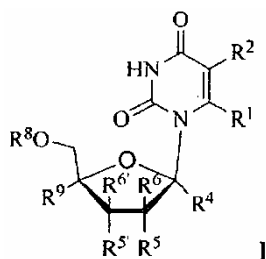
En una realización de la invención, R^9 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, N_3 , CN, alquilo C_1-C_6 . Adecuadamente, R^9 es H.

35

En una realización de la invención, X-Y en los compuestos de fórmula I se selecciona de $-CH_2-O-$, $-O-CH_2-$ y $-S-CH_2-$. Adecuadamente, X-Y es $-O-CH_2-$.

40

Es una realización de la invención que R^3 sea OH y Z sea la fórmula II. En estos compuestos se prefiere la forma tautómera ceto. Por consiguiente, es una realización de la invención que el compuesto de fórmula I en una realización de la invención tenga la siguiente estructura.



40

En una realización de la invención, el compuesto de fórmula I en el procedimiento de la invención se selecciona de:

- 6-Cianouridina;
 6-Cianouridina-5'-monofosfato;
 5 6-Azidouridina;
 6-Azidouridina-5'-*O*-monofosfato;
 10 6-Aminouridina-5'-*O*-monofosfato;
 6-Aminouridina;
 6-Metil-uridina;
 15 6-Metil-uridina-5'-*O*-monofosfato;
 6-Yodo-uridina;
 20 6-*N*-Metilaminouridina;
 6-*N,N*-Dimetilaminouridina;
 6-*N*-Metilaminouridina-5'-*O*-monofosfato;
 25 6-Yodo-uridina-5'-*O*-monofosfato;
 5-Fluoro-6-aminouridina;
 30 5-Bromo-6-yodo-uridina;
 5-Fluoro-6-azidouridina;
 5-Fluoro-6-yodo-uridina;
 35 5-Fluoro-6-aminouridina-5'-*O*-monofosfato;
 5-Bromo-6-yodo-uridina-5'-*O*-monofosfato;
 40 5-Fluoro-6-azidouridina-5'-*O*-monofosfato;
 5-Fluoro-6-yodo-uridina-5'-*O*-monofosfato;
 6-Metoxicarbonil-uridina;
 45 6-Etoxicarbonil-uridina;
 6-Metoxicarbonil-uridina-5'-*O*-monofosfato;
 50 6-Etoxicarbonil-uridina-5'-*O*-monofosfato;
 1'-Hidroximetil-6-yodo-uridina;
 1'-Hidroximetil-6-yodo-uridina-5'-monofosfato, y
 55 y

sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos como se ha descrito anteriormente

60 Todos los compuestos de fórmula I tienen más de un centro asimétrico. Si los compuestos según la invención poseen más de un centro asimétrico, pueden existir como diaestereómeros. Debe entenderse que todos aquellos isómeros y mezclas de los mismos en cualquier proporción están englobados dentro del alcance de la presente invención. En realizaciones adecuadas de la invención, la estereoquímica es la encontrada en la forma natural de la uridina como se representa anteriormente. Debe entenderse que aunque la estereoquímica relativa de los compuestos de fórmula I es adecuadamente como se muestra anteriormente, tales compuestos de fórmula I pueden también contener ciertas cantidades (por ejemplo, inferiores al 20%, preferentemente inferiores al 10%, más preferentemente inferiores al 5%) de los compuestos de fórmula 1 que tienen estereoquímica alternativa.

En otras realizaciones, la presente invención incluye un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y profármacos del mismo como se ha descrito anteriormente, para su uso en la prevención o el tratamiento de malaria, además de un uso de un compuesto
5 seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de malaria.

También se incluye en la presente invención un procedimiento para inhibir ODCasa en una muestra de plasma o de
10 sangre aislada de un sujeto que comprende añadir a dicha muestra de plasma o de sangre una cantidad eficaz inhibidora de un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente,

La presente invención también incluye un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido
15 anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente, para su uso en prevenir o tratar una infección de un parásito palúdico en un sujeto, además de un uso de un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente, para preparar un medicamento para prevenir o tratar una infección de un parásito palúdico en un sujeto. Todavía además, la presente
20 invención incluye adicionalmente un uso de un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente, para inhibir ODCasa en una muestra de plasma o de sangre aislada de un sujeto, además de un uso de un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente, para preparar un
25 medicamento para inhibir ODCasa en una muestra de plasma o de sangre aislada de un sujeto.

Según otro aspecto de la presente invención, se incluye una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o
prevención de malaria que comprende una cantidad eficaz antipalúdica de un compuesto seleccionado de un compuesto
30 de fórmula I como se ha definido anteriormente, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo como se ha descrito anteriormente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención se formulan adecuadamente en composiciones farmacéuticas para administración a
sujetos humanos en una forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*.

Las composiciones que contienen los compuestos de la invención pueden prepararse mediante procedimientos
35 conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, de forma que una cantidad eficaz de la sustancia activa se combine en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 – 20^a edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999. Sobre esta
40 base, las composiciones incluyen, pero no exclusivamente, disoluciones de las sustancias en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidas en disoluciones tamponadas con un pH adecuado e iso-osmóticas con los fluidos fisiológicos.

Los compuestos de fórmula I pueden usarse farmacéuticamente en forma de la base libre, en forma de sales, solvatos y
45 como hidratos. Todas las formas están dentro del alcance de la invención. Las sales de adición de ácido y de base pueden formarse con los compuestos de la invención para su uso como fuentes de la forma de base libre, aunque la sal particular se desee por sí misma sólo como un producto intermedio como, por ejemplo, cuando la sal se forma solo para los fines de purificación e identificación. Todas las sales que pueden formarse con los compuestos de la invención están,
50 por tanto, dentro del alcance de la presente invención.

Según los procedimientos desvelados en el presente documento, los compuestos descritos de la invención pueden
administrarse a un paciente en una variedad de formas que dependen de la vía de administración seleccionada, como se
entenderá por aquellos expertos en la materia. Los compuestos de la invención pueden administrarse, por ejemplo, por
administración oral, parenteral, bucal, sublingual, nasal, rectal, parche, bomba o transdérmica, y las composiciones
55 farmacéuticas formuladas en consecuencia. La administración parenteral incluye modo de administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, transepitelial, nasal, intrapulmonar, intratecal, rectal y tópica. La administración parenteral puede ser por infusión continua durante un periodo de tiempo seleccionado.

Un compuesto de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo
60 comestible asimilable, o puede encerrarse en cápsulas de gelatina de vaina dura o blanda, o puede comprimirse en comprimidos, o puede incorporarse directamente con la comida de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto de la invención puede incorporarse con excipiente y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares.

Un compuesto de la invención también puede administrarse parenteralmente. Las disoluciones de un compuesto de la
65 invención pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa.

También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, DMSO y mezclas de los mismos con o sin alcohol, y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Un experto en la materia sabría cómo preparar formulaciones adecuadas. Los procedimientos y componentes convencionales para la selección y preparación de formulaciones adecuadas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 – 20ª edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles o dispersión y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil capacidad de inyección.

Las composiciones para administración nasal pueden formularse convenientemente como aerosoles, gotas, geles y polvos. Las formulaciones en aerosol normalmente comprenden una disolución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso fisiológicamente aceptable y normalmente se presentan en cantidades individuales o de multidosis en forma estéril en un recipiente herméticamente cerrado, que puede tomar la forma de un cartucho o recarga para su uso con un dispositivo atomizador. Alternativamente, el recipiente herméticamente cerrado puede ser un dispositivo dispensador unitario tal como un inhalador nasal de dosis única o un dispensador de aerosol acoplado a una válvula dosificadora que está prevista para ser desechada después de uso. Si la forma de dosificación comprende un dispensador de aerosol, contendrá un propulsor que puede ser un gas comprimido tal como aire comprimido o un propulsor orgánico tal como fluoroclorohidrocarburo. Las formas de dosificación de aerosol también pueden tomar la forma de un atomizador de bomba.

Composiciones adecuadas para administración bucal o sublingual incluyen comprimidos, pastillas para chupar y pastillas, en las que el principio activo se formula con un vehículo tal como azúcar, goma arábica, tragacanto, o gelatina y glicerina. Las composiciones para administración rectal están convenientemente en forma de supositorios que contienen una base de supositorio convencional tal como manteca de cacao.

Los compuestos de la invención pueden administrarse solos a un animal o en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables, como se observa anteriormente, cuya proporción se determina por la solubilidad y naturaleza química del compuesto, vía de administración elegida y práctica farmacéutica estándar.

La dosificación de los compuestos de la invención puede variar dependiendo de muchos factores tales como las propiedades farmacodinámicas del compuesto, el modo de administración, la edad, salud y peso del receptor, la naturaleza y grado de los síntomas, la frecuencia del tratamiento y el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y la tasa de eliminación del compuesto en el animal que va a tratarse. Un experto en la materia puede determinar la dosificación apropiada basándose en los factores anteriores. Los compuestos de la invención pueden administrarse inicialmente en una dosificación adecuada que puede ajustarse según se requiera, dependiendo de la respuesta clínica. Para tratamiento *ex vivo* de células durante un corto periodo, por ejemplo durante 30 minutos a 1 hora o más, pueden usarse mayores dosis de compuesto que para la terapia *in vivo* a largo plazo. En una realización de la invención, formas de dosificación (composiciones adecuadas para administración) contienen de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de principio activo (uno o más compuestos de la invención) por unidad. En estas composiciones farmacéuticas, el principio activo estará generalmente presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5 al 95% en peso basado en el peso total de la composición.

Los compuestos de la invención pueden usarse solos o contemporáneamente con otros agentes que inhiben la actividad de ODCasa o en combinación con otros tipos de tratamiento (que pueden o pueden no modular ODCasa) para la malaria.

III. Compuestos de la invención

Se han preparado compuestos que muestran inhibición de la enzima ODCasa y actividad antipalúdica. Por consiguiente, la presente invención incluye todos los usos de estos compuestos novedosos que incluyen su uso en procedimientos terapéuticos y composiciones para tratar o prevenir malaria, su uso en ensayos de diagnóstico y su uso como herramientas de investigación y como materiales de partida y/o productos intermedios en la preparación de otras entidades químicas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I seleccionado de:

6-(dimetilamino)uridina;

5-fluoro-6-aminouridina;

5-bromo-6-aminouridina;

5-fluoro-6-azidouridina;

- 1'-hidroximetil-6-yodo-uridina;
 6-(dimetilamino)2'-deoxyuridina;
 5 5-fluoro-6-amino-2'-desoxiuridina;
 5-bromo-6-amino-2'-desoxiuridina;
 10 5-fluoro-6-azido-2'-desoxiuridina;
 5-cloro-6-yodo-2'-desoxiuridina;
 5-cloro-6-azido-2'-desoxiuridina;
 15 5-metoxi-6-yodo-2'-desoxiuridina;
 5-metoxi-6-azido-2'-desoxiuridina;
 20 5-metoxi-6-amino-2'-desoxiuridina;
 5-bromo-6-yodo-2'-desoxiuridina;
 5-bromo-6-azido-2'-desoxiuridina;
 25 6-(dimetilamino)uridina-5'-monofosfato;
 5-fluoro-6-aminouridina-5'-monofosfato;
 5-bromo-6-aminouridina-5'-monofosfato;
 30 5-fluoro-6-azidouridina-5'-monofosfato;
 1'-hidroximetil-6-yodo-uridina-5'-monofosfato
 35 6-(dimetilamino)-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-fluoro-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-bromo-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 40 5-fluoro-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-cloro-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 45 5-cloro-6-azido-2'-deoxyuridina 5'-monofosfato;
 5-metoxi-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-metoxi-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 50 5-metoxi-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-bromo-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 55 5-bromo-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-fluoro-6-yodo-uridina-5'-monofosfato;
 60 6-yodo-uridina-5'-acetato;
 6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-acetato, y

sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos como se ha descrito anteriormente.

65 La presente invención incluye adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos anteriormente enumerados y un vehículo farmacéuticamente

aceptable. La presente invención también incluye el uso de uno o más de los compuestos anteriormente enumerados, o sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, como se han descrito anteriormente como medicamentos.

5 VI. Procedimientos de preparación de compuestos de la invención

Según otro aspecto de la presente invención, los compuestos de la invención pueden prepararse mediante procedimientos análogos a aquellos establecidos en la materia. En particular, son muy conocidas las reacciones para funcionalizar la posición 5 y/o 6 de un anillo de uracilo, citosina o timina. Por ejemplo, el tratamiento de uracilo, citosina o timina con una base fuerte, tal como un alquil-litio o diisopropilamina de litio, a temperaturas reducidas, tales como a aproximadamente -60 °C a aproximadamente -90 °C, seguido de reacción con un reactivo de fórmula R¹-LG en la que R¹ es como se define en la fórmula I y LG es un grupo saliente adecuado, tal como halógeno, proporciona un compuesto sustituido en la posición 6 del anillo de pirimidina con R¹. Compuestos sustituidos con un grupo saliente adecuado en la posición 5 del anillo de pirimidina de uracilo o citosina están comercialmente disponibles o se conocen en la técnica. Estos compuestos pueden convertirse en sus aniones correspondientes a temperaturas reducidas, tales como a aproximadamente -60 °C a aproximadamente -90 °C, y hacerse reaccionar con un reactivo de fórmula R²-LG en la que R² es como se define en la fórmula I y LG es un grupo saliente adecuado, tal como halo para proporcionar un compuesto sustituido en la posición 5 del anillo de pirimidina con R². La conversión de diversos grupos R¹ y R² en otros grupos R¹ y R² puede hacerse usando químicas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden reducirse grupos azido para proporcionar grupos amina que puede monoalquilarse, dialquilarse o acilarse usando químicas conocidas.

Los compuestos de pirimidina pueden hacerse reaccionar con un reactivo de fórmula Z-LG en la que Z es como se define en la fórmula I y LG es un grupo saliente adecuado bajo condiciones estándar para proporcionar nucleósidos de fórmula I o precursores para la fórmula I. Tales reacciones serían muy conocidas para aquellos expertos en la materia. La sustitución de los grupos R¹, R² y/o R³ apropiados sobre el anillo de pirimidina puede hacerse antes o después del acoplamiento con Z.

Los compuestos de pirimidina y reactivos de fórmula Z-LG están comercialmente disponibles o pueden prepararse usando procedimientos conocidos en la técnica. La acilación o adición del grupo fosfato sobre la posición 5' del nucleósido puede realizarse usando reacciones conocidas.

En algunos casos pueden tener que modificarse las químicas explicadas resumidamente anteriormente, por ejemplo, usando grupos protectores, para prevenir reacciones secundarias debidas a grupos reactivos tales como grupos reactivos unidos como sustituyentes. Esto puede lograrse por medio de grupos protectores convencionales, por ejemplo, como se describen en "Protective Groups in Organic Chemistry" McOmie, J.F.W. Ed., Plenum Press, 1973 y en Greene, T.W. y Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 3ª edición, 1999.

La formación de una sal de compuesto deseada se logra usando técnicas convencionales. Por ejemplo, el compuesto neutro se trata con un ácido o base en un disolvente adecuado y la sal formada se aísla por filtración, extracción o cualquier otro procedimiento adecuado.

La formación de solvatos de los compuestos de la invención variará dependiendo del compuesto y el solvato. En general se forman solvatos disolviendo el compuesto en el disolvente apropiado y aislando el solvato enfriando o usando un antisolvente. El solvato se seca normalmente o se destila azeotrópicamente bajo condiciones ambiente.

Los profármacos de los compuestos de fórmula I son ésteres convencionales formados con grupo hidroxilo, tiol, amino o carboxilo disponible. Por ejemplo, grupos hidroxilo o amino disponibles pueden acilarse usando un ácido activado en presencia de una base, y opcionalmente, en disolvente inerte (por ejemplo, un cloruro de ácido en piridina). En particular, los ésteres comunes que se han utilizado como profármacos son ésteres fenílicos, ésteres alifáticos (C₈-C₂₄), ésteres alcoximetilílicos, carbamatos y ésteres de aminoácidos.

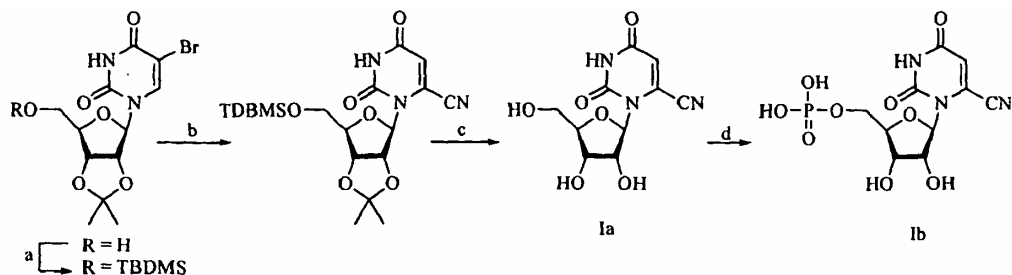
La presente invención incluye formas radiomarcadas de los compuestos de la invención, por ejemplo, compuestos de la invención marcados por incorporación dentro de la estructura ³H, ¹¹C o ¹⁴C o un halógeno radiactivo tal como ¹²⁵I y ¹⁸F. Un compuesto radiomarcado de la invención puede prepararse usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede incorporarse tritio en un compuesto de la invención usando técnicas convencionales, por ejemplo, mediante hidrogenación de un precursor adecuado dando un compuesto de la invención usando gas de tritio y un catalizador. Alternativamente, un compuesto de la invención que contiene yodo radiactivo puede prepararse a partir del derivado de trialquilestaño correspondiente (adecuadamente trimetilestaño) usando condiciones de yodación estándar tales como [¹²⁵I]-yoduro de sodio en presencia de cloramina-T en un disolvente adecuado, tal como dimetilformamida. El compuesto de trialquilestaño puede prepararse a partir del compuesto de halógeno no radiactivo correspondiente, adecuadamente yodo, usando condiciones de estanilación catalizadas por paladio convencionales, por ejemplo, hexametildiestaño en presencia de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) en un disolvente inerte tal como dioxano, y a temperaturas elevadas, adecuadamente 50-100 °C. Además, puede prepararse un compuesto de la invención que contiene un flúor radiactivo, por ejemplo, haciendo reaccionar K[¹⁸F]/K222 con un compuesto precursor adecuado tal como un compuesto de fórmula I que comprende un grupo saliente adecuado, por ejemplo, un grupo tosilo, que puede

desplazarse con el anión ^{18}F .

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención:

5 VI. EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos *la* y *lb*:



a) TBDMSiCl, imidazol; CH_2Cl_2 ; b) NaCN DMF; c) TFA ac. al 50%; d) POCl_3 , Py, H_2O , CH_3CN , $0\text{ }^\circ\text{C}$.

10

Las moléculas diana *la* y *lb* se sintetizaron a partir del derivado de 5-bromo-uridina como se muestra en el esquema anterior. Se preparó 2',3'-*O*-isopropiliden-5-bromouridina según un procedimiento bibliográfico^{xxx}. La protección del alcohol primario en 2',3'-*O*-isopropiliden-5-bromouridina como un éter de sililo se llevó a cabo con TBDMSiCl en condiciones básicas. El compuesto completamente protegido se convirtió entonces en el derivado de 6-ciano usando cianuro de sodio.^{xxxii} La desprotección de los grupos protectores con disolución acuosa al 50% de ácido trifluoroacético para dar el compuesto *la*, seguido de la mono-fosforilación con oxiclورو de fósforo, proporcionó la molécula diana deseada *lb*.^{xxxii,xxxiii,xxxiv} Finalmente, el compuesto *lb* se convirtió en su sal de amonio usando disolución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

15

20

(a) **5'-*O*-(*t*-Butildimetilsilil)-2',3'-*O*-isopropiliden-5-bromouridina**: Una disolución de 2',3'-*O*-isopropiliden-5-bromouridina (0,25 g, 0,69 mmoles) en CH_2Cl_2 seco (5,0 ml) se trató con imidazol (0,093 g, 1,38 mmoles) y TBDMSiCl (0,103 g, 0,69 mmoles) a $0\text{ }^\circ\text{C}$. La mezcla de reacción se llevó entonces hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y la fase orgánica se lavó con agua, salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . La fase orgánica se concentró a presión reducida y el compuesto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc: hexano, 1:9) para obtener el compuesto 5'-*O*-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-*O*-isopropiliden-5-bromouridina (0,32 g, 98%) como una espuma. RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,12 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 1,36 (s, 3H), 1,59 (s, 3H), 3,79 (dd, 1H, $J = 2,7, 11,5$ Hz), 3,93 (dd, 1H, $J = 2,1, 11,5$ Hz), 4,39 (d a, 1H, $J = 2,1$ Hz), 4,67 (dd, 1H, $J = 3,0, 6,0$ Hz), 4,72 (dd, 1H, $J = 2,1, 6,0$ Hz), 5,89 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz), 7,90 (s, 1H), 8,41 (s a, 1H).

25

30

(b) **5'-*O*-(*t*-Butildimetilsilil)-2',3'-*O*-isopropiliden-6-cianouridina**. Una disolución de 5'-*O*-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-*O*-isopropiliden-5-bromouridina (0,32 g, 0,71 mmoles) en DMF seca (3 ml) se trató con NaCN (0,052 g, 1,07 mmoles) a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó durante 24 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (20 ml) y el pH de la disolución se llevó a ~6 y se extrajo con acetato de etilo (3x20 ml). Las fases de acetato de etilo combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a presión reducida. El compuesto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc: hexano, 1:3) para obtener 5'-*O*-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-*O*-isopropiliden-6-cianouridina con rendimiento cuantitativo (0,28 g). RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm 0,06 (s, 6H), 0,89 (s, 9H), 1,35 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 3,81-3,85 (m, 2H), 4,13-4,18 (m, 1H), 4,76 (dd, 1H, $J = 4,8, 6,6$ Hz), 5,12 (dd, 1H, $J = 2,4, 6,6$ Hz), 6,03 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 6,29 (s, 1H), 8,88 (s a, 1H); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm 4,79, 18,84, 25,74, 26,27, 27,52, 63,64, 81,45, 83,65, 88,62, 93,74, 110,84, 113,11, 115,06, 127,71, 148,57, 160,55.

35

40

(c) **6-Cianouridina (*la*)**. El compuesto 5'-*O*-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-*O*-isopropiliden-6-cianouridina (0,12 g, 0,30 mmoles) se trató con TFA acuoso al 50% (5 ml) a $0\text{ }^\circ\text{C}$, luego se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El disolvente se evaporó y el compuesto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (EtOH: CHCl_3 , 1:9) para obtener 6-cianouridina (*la*) con rendimiento cuantitativo (0,076 g). $\lambda_{\text{máx}}$ de UV = 283 nm; RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$) δ ppm 3,41-3,66 (m, 3H), 4,00 (t, 1H, $J = 5,7, 6,0$ Hz), 4,45 (dd, 1H, $J = 5,1, 6,0$ Hz), 5,73 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz), 6,66 (s, 1H).

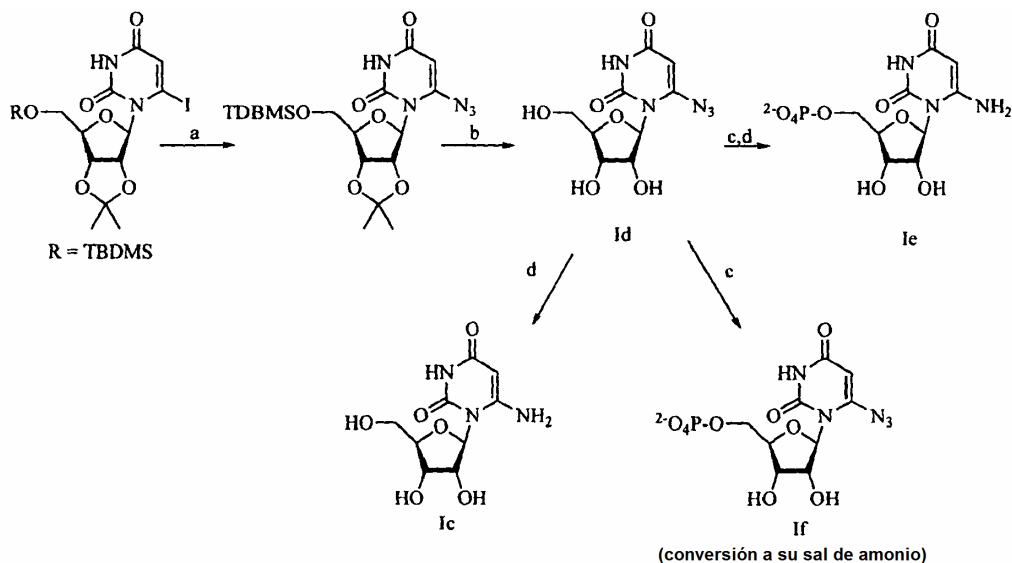
45

50

(d) **6-Cianouridina-5'-monofosfato (*lb*)**. Una disolución con agitación de POCl_3 (0,3 ml, 3,271 mmoles), H_2O (0,037 g, 2,081 mmoles) y CH_3CN (2 ml) se trató con piridina (0,28 ml, 2,081 mmoles) a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y a esta se añadió 6-cianouridina (0,2 g, 0,743 mmoles). Después de 5 h de agitación a $0\text{ }^\circ\text{C}$, la mezcla de reacción se inactivó con 50 ml de agua fría y la agitación continuó durante otra 1 h. La mezcla de reacción se concentró y el compuesto en bruto se purificó sobre resina de intercambio iónico Dowex (ácido fórmico 1,0 M) para obtener 6-cianouridina-5'-monofosfato (10) (0,12 g, 46%). UV (H_2O): $\lambda_{\text{máx}} = 283$ nm; RMN ^1H (D_2O) δ 3,98-4,26 (m, 3H), 4,43 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz), 4,77 (dd,

1H, $J = 3,9, 6,3$ Hz), 5,95 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz), 6,64 (s, 1H).

Ejemplo 2: Síntesis de los compuestos *Ic*, *Id*, *Ie* y *If*:



Condiciones de reacción: (a) NaN_3 , DMF, ta; (b) TFA al 50%, ta; (c) POCl_3 , piridina, H_2O , CH_3CN , 0 °C; (d) H_2 , Pd/C, MeOH, ta.

5

La introducción del resto de yodo en la posición C-6 de uridina completamente protegida se logró mediante LDA y yodo, y la sustitución adicional del yodo por el grupo azido produjo el derivado de 6-azido mostrado en el esquema anterior.^{xxxv} La desprotección de los grupos isopropilideno y *t*-butildimetilsililo usando ácido trifluoroacético dio 6-azido-uridina **Id**. La monofosforilación de **Id** con oxiclورو de fósforo para proporcionar su mononucleótido seguido de la reducción del grupo azido con Pd/C dio el compuesto 6-amino-uridina-5'-O-monofosfato **Ie** con buen rendimiento.^{xxxvi,xxxvii,xxxviii} La reducción del resto azido en el compuesto **Id** dio 6-amino-uridina **Ic**. La fosforilación del compuesto **Ic** con oxiclورو de fósforo proporcionó su 6-azido-uridina-5'-O-monofosfato de mononucleótido **Ie**.

10

15

(a) **6-Azido-5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina**. Se disolvió 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-6-yodo-uridina (0,25 g, 0,48 mmoles) en DMF seca (3 ml) y se añadió NaN_3 (0,034 g, 0,53 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. El disolvente orgánico se evaporó a vacío y el bruto se disolvió en acetato de etilo (15 ml), se lavó con salmuera y se secó (Na_2SO_4). Las fases orgánicas se evaporaron y el bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (1% de EtOH: CHCl_3). La purificación del compuesto y la evaporación del disolvente se realizaron en la oscuridad dando el compuesto del título 6-azido-5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,19 g, 0,44 mmoles) con un rendimiento del 92% como un sólido marrón claro. RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,06 (s, 6H), 0,89 (s, 9H), 1,34 (s, 3H), 1,54 (s, 3H), 3,74-3,85 (m, 2H), 4,08-4,15 (m, 1H), 4,80 (dd, 1H, $J = 4,8, 6,3$ Hz), 5,14 (dd, 1H, $J = 1,5, 6,3$ Hz), 5,50 (s, 1H), 6,09 (dd, 1H, $J = 1,5$ Hz), 9,12 (s a, 1H).

25

(b) **6-Azidouridina (Id)**. Una disolución con agitación de 6-azido-5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,300 g, 0,683 mmoles) se trató con ácido trifluoroacético acuoso al 50% (3 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se llevó entonces a ta y se agitó durante una hora adicional. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (10-15% de EtOH en CHCl_3) dio la 6-azidouridina **Id** (0,17 g, 0,61 mmoles) con un rendimiento del 89% como un sólido marrón claro. UV (H_2O): $\lambda_{\text{máx}} = 285$ nm; RMN ^1H (D_2O) δ 3,77 (dd, 1H, $J = 5,4, 12,0$ Hz), 3,89-4,00 (m, 2H), 4,43 (t, $J = 6,9$ Hz 1H), 4,77 (dd, 1H, $J = 3,6, 6,9$ Hz), 5,76 (s, 1H), 6,07 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz). EM-HR (ESI) Calculada para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_6\text{Na}$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 308,0601, hallada 308,0597.

30

35

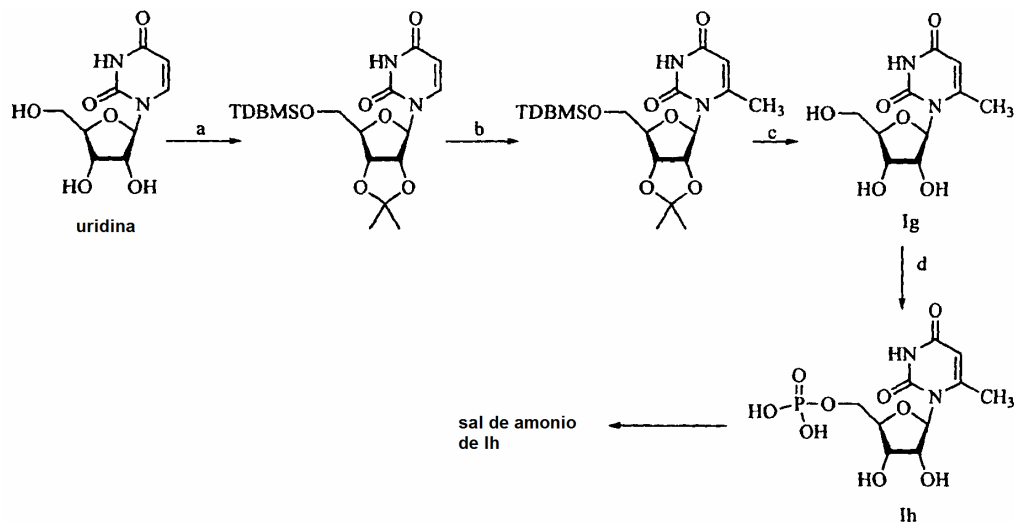
(c) **6-Azidouridina-5'-O-monofosfato (If)**. Una disolución con agitación de agua (0,03 g, 1,89 mmoles) y POCl_3 (0,28 ml, 2,97 mmoles) en acetonitrilo anhidro (3 ml) se trató con piridina (0,26 ml, 3,24 mmoles) a 0 °C y se agitó durante 10 min. Se añadió la 6-azidouridina **Id** (0,25 g, 0,68 mmoles) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a 0 °C. La mezcla de reacción se inactivó con 25 ml de agua fría y la agitación continuó durante otra hora. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (resina básica de intercambio iónico Dowex, ácido fórmico 0,1 M) dio el mononucleótido **If** (0,23 g, 0,63 mmoles) con un rendimiento del 60% como un jarabe. UV (H_2O) $\lambda_{\text{máx}} = 283$ nm; RMN ^1H (D_2O) δ 3,78-3,85 (m, 1H), 3,89-4,00 (m, 2H), 4,34 (t, $J = 6,9$ Hz 1H), 4,80 (m, 1H), 5,73 (s, 1H), 6,04 (s a, 1H). RMN ^{31}P (D_2O) δ ppm 2,47. EM-HR (ESI, negativa) Calculada para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}$ (M^-) 364,0299, hallada 364,0307.

40

(d) **6-Aminouridina-5'-O-monofosfato **le****. El mononucleótido **lf** (0,06 g, 0,15 mmoles) se disolvió en metanol acuoso al 50% y añadió 10% de Pd/C (10 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h bajo la atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de Celite® y el disolvente se evaporó a sequedad dando 6-aminouridina-5'-O-monofosfato **le** como jarabe con un rendimiento del 85% (43 mg, 0,13 mmoles). UV (H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ = 270 nm; RMN ¹H (D₂O) δ 3,96-4,05 (m, 2H), 4,12-4,24 (m, 2H), 4,51 (t, J = 6,6 Hz 1H), 4,81 (s, 1H), 6,20 (d, J = 6,6, 1H). EM-HR (ESI, negativa) Calculada para C₉H₁₃N₃O₉P (M⁻) 338,0394, hallada 338,0403.

(e) **6-Aminouridina (**lc**)**. El compuesto **lc** se obtuvo tratando la 6-azidouridina (**ld**) con hidrógeno en presencia de Pd/C en MeOH usando el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 2(d).

Ejemplo 3: Síntesis de los compuestos **lg** y **lh**.



Condiciones de reacción: (a) i. acetona/H⁺, ii. TBDMSCl, imidazol/CH₂Cl₂, 0-25 °C; (b) LDA, CH₃I, THF, -78 °C; (c) TFA al 50%, ta; (d) POCl₃, piridina, H₂O, CH₃CN, 0 °C.

Las moléculas diana se sintetizaron a partir de uridina según procedimientos bibliográficos.^{xxxix} La introducción del grupo metilo en la posición C-6 se logró mediante LDA y yoduro de metilo.^{xl} La desprotección de los grupos protectores con TFA^{xli} proporcionó el compuesto **lg**, seguido de la monofosforilación con oxiclورو de fósforo^{xlii,xliii} proporcionó el nucleósido monofosforilado **lh**. Finalmente, el compuesto de monofosfato **lh** se transformó en la sal de amonio por neutralización con disolución 0,5 M de NH₄OH a 0 °C y se liofilizó para obtener las sales de amonio como polvo.

(a) **5'-O-(t-Butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina**. Una suspensión con agitación de uridina (1 g, 4,098 mmoles) en acetona seca (50 ml) se trató con H₂SO₄ (0,5 ml) gota a gota a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó adicionalmente 1 h y se neutralizó con Et₃N. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (5-8% de MeOH en CHCl₃) dio la 2',3'-O-isopropiliden-uridina (1,15 g) con rendimiento cuantitativo como un sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,36 (s, 3H, -CH₃), 1,57 (s, 3H, -CH₃), 3,80 (dd, 1H, J = 3,3, 12,0 Hz, H-5'), 3,91 (dd, 1H, J = 2,7, 12,0 Hz, H-5''), 4,26-4,30 (m, 1H, H-4'), 4,95 (dd, 1H, J = 3,3, 6,3 Hz, H-3'), 5,02 (dd, 1H, J = 2,7, 6,3 Hz, H-2') 5,56 (d, 1H, J = 2,7 Hz, H-1'), 5,72 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H-5), 7,36 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H-6). Una disolución con agitación de 2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,2 g, 0,704 mmoles) en CH₂Cl₂ seco (3 ml) se trató con imidazol (0,095 g, 1,408 mmoles) y TBDMSCl (0,105 g, 0,704 mmoles) a 0 °C. La mezcla de reacción se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. El disolvente se evaporó a vacío y el sólido se recogió en acetato de etilo (30 ml), se lavó con agua (15 ml), salmuera (15 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (5% de MeOH en CHCl₃) dio la 5'-O-(t-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,268 mg) con un rendimiento del 96% como un sólido espumoso. RMN ¹H (CDCl₃): δ 0,10 (s, 6H, -CH₃), 0,90 (s, 9H, -CHO₃), 1,36 (s, 3H, -CH₃), 1,59 (s, 3H, -CH₃), 3,79 (dd, 1H, J = 2,7, 11,2 Hz, H-5'), 3,92 (dd, 1H, J = 2,4, 11,2 Hz, H-5''), 4,30-4,33 (m, 1H, H-4'), 4,67 (dd, 1H, J = 2,7, 6,0 Hz, H-3'), 4,75 (dd, 1H, J = 3,0, 6,0 Hz, H-2'), 5,66 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H-5), 5,96 (dd, 1H, J = 3,0 Hz, H-1'), 7,68 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H-6), 8,47 (s a, 1H, -NH).

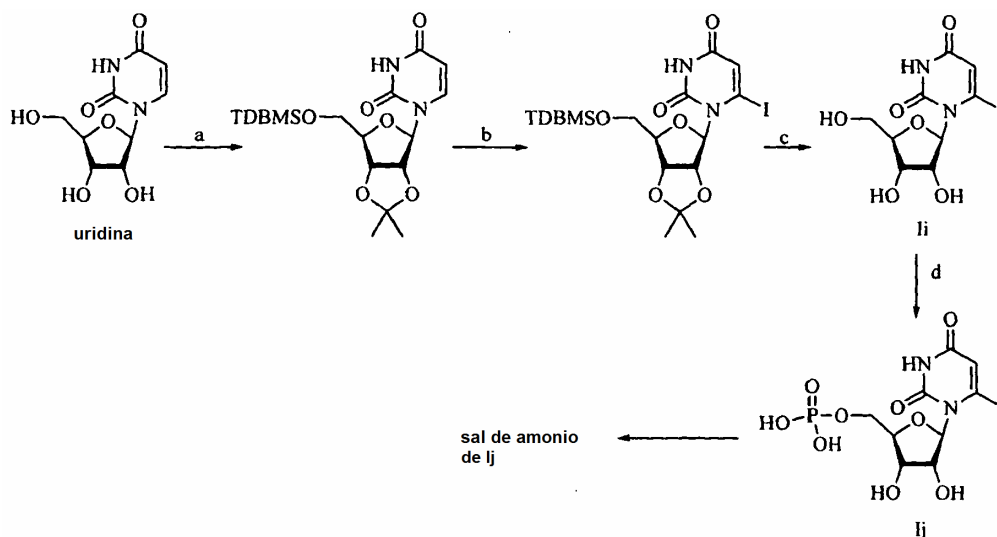
(b) **5'-O-(t-Butildimetilsilil)-6-metil-2',3'-O-isopropiliden-uridina**. Una disolución con agitación de LDA (0,62 ml, 1,256 mmoles, disolución 2,0 M en THF) en THF seco (2 ml) se trató con 5'-O-(t-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,25 g, 0,628 mmoles) en 1,5 ml de THF seco a -78 °C. Después de agitar durante 1 h se añadió yoduro de metilo (0,628 mmoles) en THF seco (2 ml) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La reacción se inactivó con AcOH (0,3 ml), luego se llevó hasta temperatura ambiente y se disolvió en acetato de etilo (25 ml). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml), salmuera (10 ml) y se secó (Na₂SO₄).

La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (hexanos-acetato de etilo, 70:30) dio la 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-metil-2',3'-O-isopropiliden-uridina como un sólido blanco espumoso.

(c) **6-Metil-uridina (Ig)**. Una disolución con agitación de 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-metil-2',3'-O-isopropilideno (0,300 g) se trató con ácido trifluoroacético acuoso al 50% (3 ml) a 0 °C y luego se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (10-15% de EtOH en CHCl₃) dio la 6-metil-uridina (**Ig**) como un sólido blanco.

(d) **6-Metil-uridina-5'-O-monofosfato (Ih)**. Una disolución con agitación de H₂O (0,034 g, 1,89 mmoles) y POCl₃ (0,277 ml, 2,973 mmoles) en acetonitrilo seco (3 ml) se trató con piridina (0,261 ml, 3,24 mmoles) a 0 °C y se agitó durante 10 min. Se añadió 6-metil-uridina (**Ig**) (0,675 mmoles) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La mezcla de reacción se inactivó con 25 ml de agua fría y la agitación continuó durante 1 h más. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (resina básica de intercambio iónico Dowex, ácido fórmico 0,1 M) dio la 6-metil-uridina-5'-O-monofosfato (**Ih**) como un jarabe. El derivado de monofosfato se convirtió en la sal de di-amonio como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 4: Síntesis de 6-yodo-uridina (Ii) y 6-yodo-uridina-5'-O-monofosfato (Ij).



Condiciones de reacción: (a) i. acetona/H⁺, ii. TBDMSCl, imidazol/CH₂Cl₂, 0-25 °C; (b) LDA, I₂, THF, -78 °C; (c) TFA al 50%, ta; (d) POCl₃, piridina, H₂O, CH₃CN, 0 °C.

Los compuestos **Ii** y **Ij** se sintetizaron a partir de uridina. La introducción del resto de yodo en la posición C-6 de uridina protegida se logró usando diisopropilamida de litio, seguido de tratamiento con yodo.^{xiv} La desprotección con TFA seguida dio el compuesto **Ii**, y la posterior fosforilación con oxiclورو de fósforo proporcionó el mononucleótido **Ij**.^{xiv, xvi, xvii} Entonces, el compuesto **Ij** se transformó en su sal de amonio por neutralización con disolución 0,5 M de NH₄OH a 0 °C y se liofilizó para conseguir la sal de amonio como un polvo.

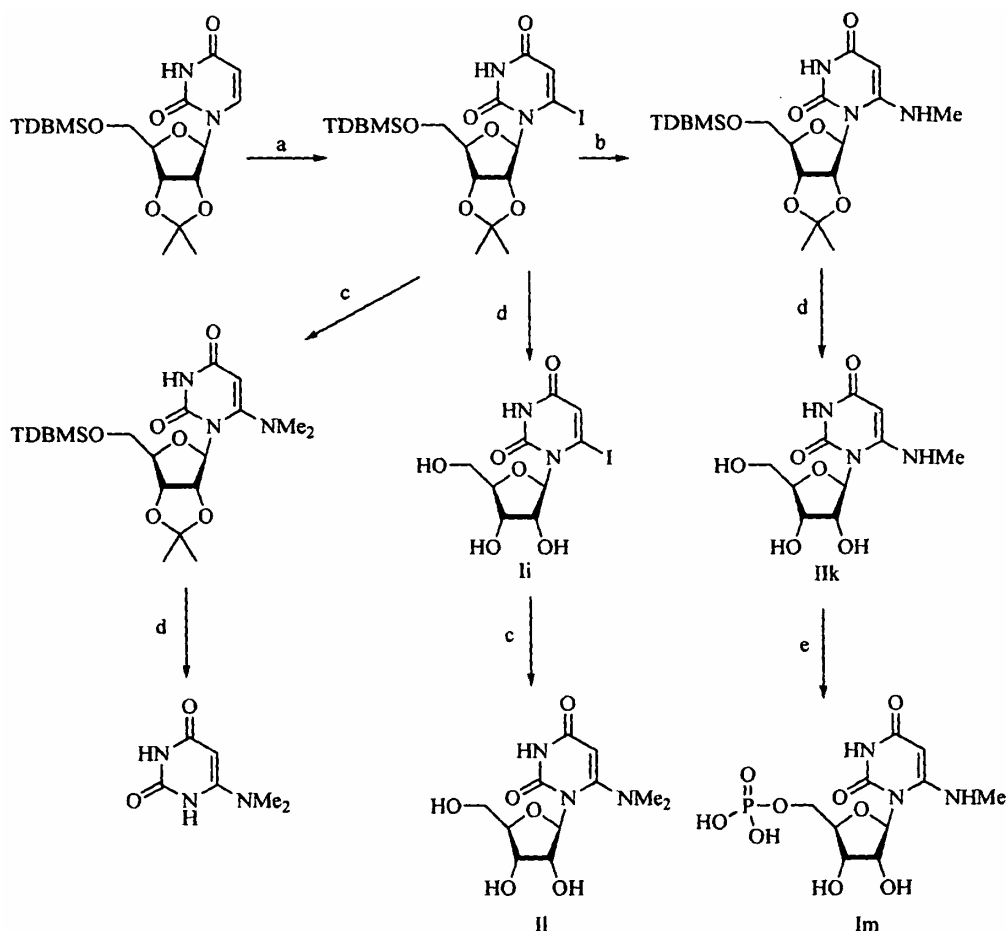
(a) **5'-O-(*t*-Butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina**. Una suspensión con agitación de uridina (1 g, 4,1 mmoles) en anhidro acetona (50 ml) se trató con H₂SO₄ (0,5 ml) gota a gota a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó durante una hora adicional. La reacción se neutralizó entonces con Et₃N y se concentró. La mezcla en bruto se purificó por cromatografía en columna (5-8% de MeOH:CHCl₃) para proporcionar 2',3'-O-isopropiliden-uridina (1,15 g, cuant.) como un sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 1,36 (s, 3H, -CH₃), 1,57 (s, 3H, -CH₃), 3,80 (dd, 1H, H-5'), 3,91 (dd, 1H, H-5''), 4,26-4,30 (m, 1H, H-4'), 4,95 (dd, 1H, H-3'), 5,02 (dd, 1H, H-2') 5,56 (d, 1H, H-1'), 5,72 (d, 1H, H-5), 7,36 (d, 1H, H-6).

Una disolución con agitación de 2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,2 g, 0,7 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (3 ml) se trató con imidazol (0,095 g, 1,4 mmoles) y TBDMSiCl (0,105 g, 0,7 mmoles) a 0 °C. La mezcla de reacción se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante una hora adicional. El disolvente se evaporó a vacío y el bruto se disolvió en acetato de etilo (30 ml), se lavó con agua (15 ml), salmuera (15 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (5% de MeOH en CHCl₃) dio 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,27 mg, rendimiento del 96%) como una espuma: RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 0,10 (s, 6H, CH₃), 0,90 (s, 9H, CH₃), 1,36 (s, 3H, CH₃), 1,59 (s, 3H, CH₃), 3,79 (dd, 1H, H-5'), 3,92 (dd, 1H, H-5''), 4,30-4,33 (m, 1H, H-4'), 4,67 (dd, 1H, H-3'), 4,75 (dd, 1H, H-2'), 5,66 (d, 1H, H-5), 5,96 (dd, 1H, H-1'), 7,68 (d, 1H, H-6), 8,47 (s a, 1H, -NH).

(b) **5'-O-(*t*-Butildimetilsilil)-6-yodo-2',3'-O-isopropiliden-uridina.** Una disolución con agitación de LDA (0,62 ml, 1,3 mmoles, disolución 2,0 M en THF) en THF anhidro (2 ml) se trató con 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,25 g, 0,6 mmoles) disuelto en 1,5 ml de THF anhidro, a -78 °C. Después de agitar durante 1 h se añadió yodo (0,16 g, 0,6 mmoles) en THF anhidro (2 ml) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La reacción se inactivó con AcOH (0,3 ml), luego se llevó hasta temperatura ambiente y se disolvió en acetato de etilo (25 ml). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml), disolución al 5% de Na₂S₂O₃ (10 ml), salmuera (10 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (hexanos-acetato de etilo, 70:30) dio la 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-yodo-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,224 g, 68%) como una espuma amarilla: RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 0,06 (s, 6H, CH₃), 0,89 (s, 9H, 3CH₃), 1,35 (s, 3H, CH₃), 1,56 (s, 3H, CH₃), 3,76-3,86 (m, 2H, H5', H-5"), 4,15-4,20 (m, 1H, H-4'), 4,81 (dd, 1H, *J* = 4,2, 6,3 Hz, H-3'), 5,18 (dd, 1H, *J* = 2,0, 6,3 Hz, H-2'), 6,09 (s, 1H, H-5), 6,45 (dd, 1H, *J* = 2,0 Hz, H-1'), 8,78 (s a, 1H, NH).

(c) **6-Yodo-uridina (II).** Una disolución con agitación de 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-yodo-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,300 g, 0,572 mmoles) se trató con TFA acuoso al 50% (3 ml) a 0 °C, se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h en la oscuridad. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (10-15% de EtOH en CHCl₃) proporcionó 6-yodo-uridina II (0,182 g, 0,49 mmoles, 86%) como un sólido marrón claro. UV (H₂O): λ_{máx} = 268 nm (ε = 8975); RMN ¹H (D₂O) δ ppm 3,77 (dd, 1H, H-5'), 3,91 (dd, 1H, H-5"), 3,978-4,032 (m, 1H, H-4'), 4,43 (t, 1H, H-3'), 4,84 (dd, 1H, H-2'), 6,06 (d, 1H, H-1'), 6,67 (s, 1H, H-5). EM-HR (ESI) calculada para C₉H₁₁N₂O₆NaI (M+Na⁺) 392,9554, hallada 392,9565.

(d) **6-Yodo-uridina-5'-O-monofosfato (Ij).** Una disolución con agitación de H₂O (0,034 g, 1,89 mmoles) y POCl₃ (0,28 ml, 2,97 mmoles) en anhidro acetonitrilo (3 ml) se trató con piridina (0,261 ml, 3,24 mmoles) a 0 °C y se agitó durante 10 min. Se añadió 6-yodo-uridina (0,250 g, 0,67 mmoles) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a 0 °C. La mezcla de reacción se inactivó entonces con 25 ml de agua fría y continuó la agitación durante una hora adicional. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (resina básica de intercambio iónico Dowex, ácido fórmico 0,1 M) proporcionó 6-yodo-uridina-5'-O-monofosfato (Ij) (0,207 g, 68%) como un jarabe. UV (H₂O): λ_{máx} = 267 nm (ε = 2890); RMN ¹H (D₂O) δ ppm 3,78 (dd, 1H, H-5'), 3,91 (dd, 1H, H-5"), 3,98-4,03 (m, 1H, H-4'), 4,43 (t, H-3'), 4,84 (dd, 1H, H-2'), 6,05 (d, 1H, H-1'), 6,67 (s, 1H, H-5). RMN ³¹P (D₂O) δ ppm 2,214. EM-HR (ESI, negativa) calculada para C₉H₁₁N₂OPI (M) 448,9252, hallada 448,9263.

Ejemplo 5: Síntesis de los compuestos Ik, Il y Im:

Condiciones de reacción: (a) THF, I₂, -78 °C, LDA; (b) NH₂Me, EtOH, TEA; (c) NHMe₂, EtOH, TEA; (d) TFA, H₂O; (e) POCl₃, piridina, H₂O, CH₃CN.

5

(a) **5'-O-(*t*-Butildimetilsilil)-6-*N*-metilamino-2',3'-O-isopropiliden-uridina.** Se disolvió 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-yodo-2',3'-O-isopropiliden-uridina (262 mg, 0,5 mmoles) en 20 ml de etanol seco, luego se añadió metilamina (187 mg) seguido de añadir trietilamina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 3 h y se consumió todo el material de partida. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se purificó por cromatografía en columna, (CHCl₃:MeOH= 9:1) para obtener 98 mg de 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-metilamino-2',3'-O-isopropiliden-uridina (rendimiento del 50%).

10

(b) **5'-O-(*t*-Butildimetilsilil)-6-*N,N*-dimetilamino-2',3'-O-isopropiliden-uridina.** El procedimiento fue el mismo que antes, excepto que se usó dimetilamina en lugar de metilamina. La reacción se completó en 3 h. El disolvente fue hexano: EtoAc=1:1 para purificar el producto usando cromatografía en columna (rendimiento del 77,1%).

15

(c) **6-*N,N*-Dimetilamino-uracilo.** Se mezclaron TFA (10 ml) y H₂O (10 ml) y se enfriaron a 0 °C y se añadió al matraz con 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-*N,N*-dimetilamino-2',3'-O-isopropiliden-uridina. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 2 h, seguido de una hora adicional a temperatura ambiente. La mezcla se evaporó a sequedad, se neutralizó la mezcla con trietilamina y la mezcla resultante se purificó por cromatografía en columna (CHCl₃:MeOH = 17:3) para obtener 6-*N,N*-dimetilamino-uracilo.

20

(d) **6-Yodouridina (Ii).** Se trató 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-yodo-2',3'-O-isopropiliden-uridina con ácido trifluoroacético y el producto se purificó usando cromatografía en columna.

25

(e) **6-*N,N*-Dimetilaminouridina (II).** Se trató 6-yodouridina (Ii) con dimetilamina en etanol y trietilamina, como se ha descrito anteriormente. El producto se purificó por cromatografía en columna (EtoAc: MeOH = 8:1) para dar 70 mg de 6-*N,N*-dimetilaminouridina (II) con un rendimiento del 90,3%.

30

(f) **6-*N*-Metilaminouridina (Ik).** Se trató 5'-O-(*t*-butildimetilsilil)-6-*N*-metilamino-2',3'-O-isopropiliden-uridina con ácido

trifluoroacético en agua para obtener 6-*N*-metilaminouridina (**Ik**).

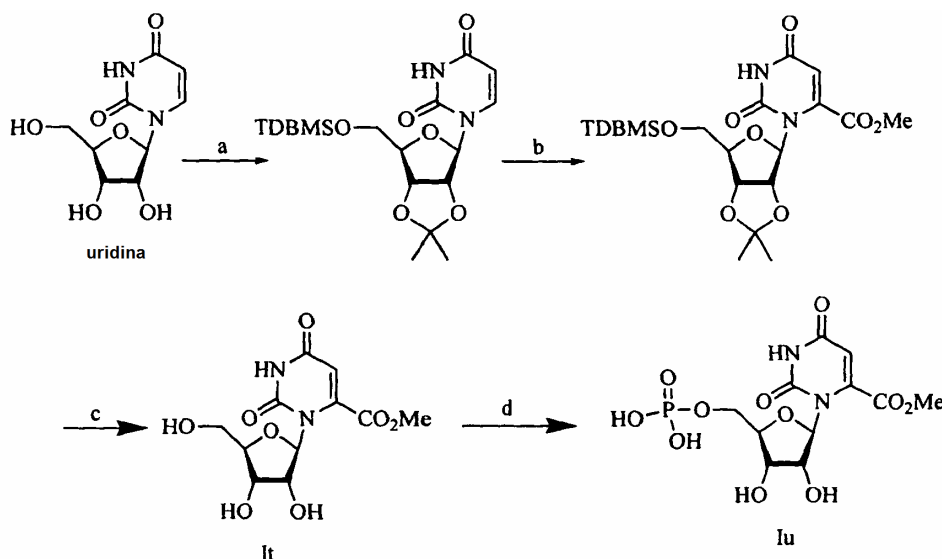
(g) **6-*N*-Metilaminouridina-5'-*O*-monofosfato (Im)**. Una disolución con agitación de POCl₃ (67 mg, 0,44 mmoles), H₂O (5 mg) y CH₃CN (0,5 ml) se trató con piridina (37 mg) a 0 °C. Se añadió 6-*N*-metilaminouridina **Ik** (30 mg, 0,11 mmoles) y se agitó a esta temperatura durante 3 h. La mezcla de reacción se inactivó con 1 ml de agua fría y se agitó durante una hora adicional. La mezcla se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC para obtener 2 mg de 6-*N*-metilaminouridina-5'-*O*-monofosfato (**Im**).

Ejemplo 6: Extensión a análogos sustituidos con 5-fluoro.

5-Fluoro-6-aminouridina (**In**), 5-fluoro-6-azidouridina (**Io**), 5-fluoro-6-yodo-uridina (**Ip**) y sus formas de mononucleótido (**Iq**, **Ir** y **Is**, respectivamente) se sintetizaron usando los procedimientos descritos en los Ejemplos 1-5, sustituyendo uridina con 5-fluoro-uridina como material de partida.

Otros compuestos pueden sintetizarse utilizando los nucleósidos apropiadamente protegidos y sustituyendo los sustituyentes en C6 como se muestra en los ejemplos anteriores. La mayoría de los procedimientos son comunes en la bibliografía y pueden llevarse a cabo por personas con habilidades técnicas en la materia.

Ejemplo 7: Síntesis de los compuestos It y Iu



Condiciones de reacción: (a) i. acetona/H⁺, ii. TBDMSCI, imidazol/CH₂Cl₂, 0-25 °C; (b) LDA, ClCO₂Me, THF, -78 °C; (c) TFA al 50%, ta; (d) POCl₃, piridina, H₂O, CH₃CN, 0 °C.

Los compuestos **It** y **Iu** se sintetizaron a partir de uridina. La introducción de metoxicarbonilo en la posición C-6 se logró mediante LDA y clorocromato de metilo. La desprotección de los grupos protectores con TFA, seguido de la monofosforilación con oxicluro de fósforo, proporcionó el nucleósido mono-fosforilado. Finalmente, el compuesto de monofosfato **Iu** se transformó en la sal de amonio por neutralización con disolución 0,5 M de NH₄OH a 0 °C y se liofilizó dando las sales de amonio como polvo.

(a) **5'-*O*-(¹-Butildimetilsilil)-2',3'-*O*-isopropiliden-uridina**. Una suspensión con agitación de uridina (1 g, 4,098 mmoles) en acetona seca (50 ml) se trató con H₂SO₄ (0,5 ml) gota a gota a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó adicionalmente 1 h y se neutralizó con Et₃N. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (5-8% de MeOH en CHCl₃) dio la 2',3'-*O*-isopropiliden-uridina (1,15 g) con rendimiento cuantitativo como un sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,36 (s, 3H, -CH₃), 1,57 (s, 3H, -CH₃), 3,80 (dd, 1H, *J* = 3,3, 12,0 Hz, H-5'), 3,91 (dd, 1H, *J* = 2,7, 12,0 Hz, H-5''), 4,26-4,30 (m, 1H, H-4'), 4,95 (dd, 1H, *J* = 3,3, 6,3 Hz, H-3'), 5,02 (dd, 1H, *J* = 2,7, 6,3 Hz, H-2') 5,56 (d, 1H, *J* = 2,7 Hz, H-1'), 5,72 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-5), 7,36 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-6). Una disolución con agitación de 2,3-*O*-isopropilidenuridina (0,2 g, 0,704 mmoles) en CH₂Cl₂ seco (3 ml) se trató con imidazol (0,095 g, 1,408 mmoles) y TBDMSCI (0,105 g, 0,704 mmoles) a 0 °C. La mezcla de reacción se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. El disolvente se evaporó a vacío y el sólido se recogió en acetato de etilo (30 ml), se lavó con agua (15 ml), salmuera (15 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (5% de MeOH en CHCl₃) dio **2** (0,268 mg) con un rendimiento del 96% como un sólido espumoso. RMN ¹H (CDCl₃): δ 0,10 (s, 6H, -CH₃), 0,90 (s, 9H, -CH₃), 1,36 (s,

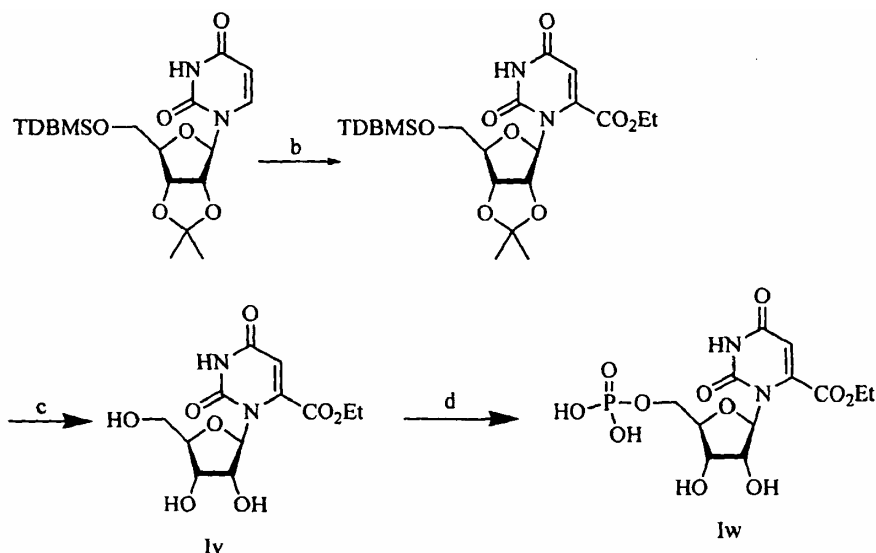
3H, -CH₃) 1,59 (s, 3H, -CH₃), 3,79 (dd, 1H, *J* = 2,7, 11,2 Hz, H5'), 3,92 (dd, 1H, *J* = 2,4, 11,2 Hz, H-5''), 4,30-4,33 (m, 1H, H-4'), 4,67 (dd, 1H, *J* = 2,7,60 Hz, H-3'), 4,75 (dd, 1H, *J* = 3,0, 6,0 Hz, H-2'), 5,66 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-5), 5,96 (dd, 1H, *J* = 3,0 Hz, H-1'), 7,68 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-6), 8,47 (s a, 1H, -NH).

5 **(b) 5'-O-(^t-Butildimetilsilil)-6-metoxicarbonil-2',3'-O-isopropiliden-uridina.** Una disolución con agitación de 5'-O-(^t-butildimetilsilil)2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,25 g, 0,628 mmoles) en THF seco (2 ml) se trató con LDA (0,62 ml, 1,256 mmoles, disolución 2,0 M en THF) a -78°C. Después de agitar durante 1 h se añadió cloroformiato de metilo (0,048 g, 0,628 mmoles) en THF seco (2 ml) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La reacción se inactivó con AcOH (0,3 ml), luego se llevó hasta temperatura ambiente y se disolvió en acetato de etilo (25 ml). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml), disolución al 5% de Na₂S₂O₃ (10 ml), salmuera (10 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (hexanos-acetato de etilo, 70:30) dio el compuesto del título (0,18 g) con un rendimiento del 64% como un jarabe. RMN ¹H (CDCl₃): δ 0,056 (s, 6H, -CH₃), 0,88 (s, 9H, -CH₃), 1,34 (s, 3H, -CH₃), 1,54 (s, 3H, -CH₃), 3,75 (dd, 1H, *J* = 7,2, 10,9 Hz, H5'), 3,81 (dd, 1H, *J* = 5,1, 10,9 Hz, H5'), 3,93 (s, 3H - CH₃), 4,06-4,12 (m, 1H, H-4'), 4,71 (dd, 1H, *J* = 4,8, 6,4 Hz, H-3'), 5,15 (dd, 1H, *J* = 2,0,1 6,4 Hz, H-2'), 5,89 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz, H-1'), 6,07 (s, 1, H-5), 9,32 (s a, 1H, -NH).

20 **(c) 6-Metoxicarbonil-uridina (It).** Una disolución con agitación del compuesto 5'-O-(^t-butildimetilsilil)-6-metoxicarbonil-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,23 g, 0,504 mmoles) se trató con TFA acuoso al 50% (3 ml) a 0 °C y luego se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (10-15% de EtOH en CHCl₃) dio **It** (0,135 g) con un rendimiento del 89% como un sólido. RMN ¹H (DMSO-D₂O): δ 3,37 (dd, 1H, *J* = 6,6, 12,0 Hz, H-5'), 3,54 (dd, 1H, *J* = 3,6, 12,0 Hz, H-5''), 3,62-3,67 (m, 1H, H-4'), 3,80 (s, 3H, -CO₂CH₃), 3,88-3,97 (m, 1H, H-3'), 4,41 (dd, 1H, *J* = 4,2, 6,3 Hz, H-2'), 5,34 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz, H-1'), 5,95 (s, 1H, H-5).

25 **(d) 6-Metoxicarboniluridina-5'-O-monofosfato (Iu).** Una disolución con agitación de H₂O (0,02 g, 1,112 mmoles) y POCl₃ (0,16 ml, 1,748 mmoles) en acetonitrilo seco (3 ml) se trató con piridina (0,154 ml, 1,907 mmoles) a 0 °C y se agitó durante 10 min. Se añadió el compuesto **It** (0,12 g, 0,397 mmoles) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La mezcla de reacción se inactivó con 25 ml de agua fría y la agitación continuó durante 1 h más. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (resina básica de intercambio iónico Dowex, ácido fórmico 0,1 M) dio **Iu** como un jarabe. UV (H₂O): λ_{máx} = 274 nm; RMN ¹H (D₂O): δ 3,99 (s, 3H -CO₂CH₃), 4,02-4,08 (m, 2H, H-5',5''), 4,16-4,23 (m, 1H, H-4'), 4,37 (t, *J* = 6,6 Hz 1H, H-3'), 4,75 (dd, 1H, *J* = 3,3, 6,6 Hz, H-2'), 5,70 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz, H-1'), 6,26 (s, 1H, H-5).

35 Ejemplo 8: Síntesis de los compuestos **Iv** y **Iw**



Condiciones de reacción: (b) LDA, ClCO₂Et, THF, -78 °C; (c) TFA al 50%, ta; (d) POCl₃, piridina, H₂O, CH₃CN, 0 °C.

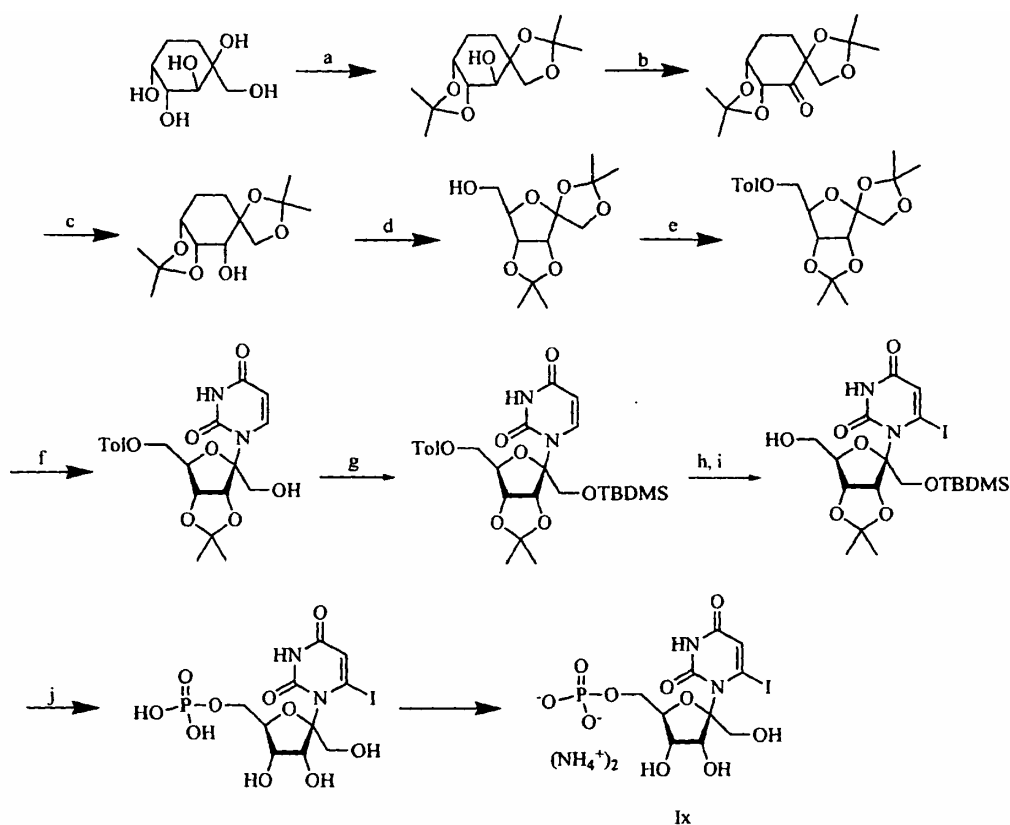
40 Las moléculas diana **Iv** y **Iw** se sintetizaron a partir de 5'-O-(^t-butildimetilsilil)2',3'-O-isopropiliden-uridina. La introducción de etoxicarbonilo en la posición C-6 se logró mediante LDA y cloroformiato de etilo. La desprotección de los grupos protectores con TFA seguido de la mono-fosforilación con oxiclورو de fósforo proporcionó el nucleósido monofosforilado **Iv**. El monofosfato **Iw** se transformó en la sal de amonio por neutralización con disolución 0,5 M de NH₄OH a 0 °C y se liofilizó para conseguir las sales de amonio como polvo.

5 (a) **5'-O-(^t-Butildimetilsilil)-6-etoxicarbonil-2',3'-O-isopropiliden-uridina**. Una disolución con agitación de 5'-O-(^t-butildimetilsilil)2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,25 g, 0,628 mmoles) en THF seco (2 ml) se trató con LDA (0,62 ml, 1,256 mmoles, disolución 2,0 M en THF) a -78°C. Después de agitar durante 1 h se añadió cloroformiato de etilo (0,048 g, 0,628 mmoles) en THF seco (2 ml) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La reacción se inactivó con AcOH (0,3 ml), luego se llevó hasta temperatura ambiente y se disolvió en acetato de etilo (25 ml). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml), disolución al 5% de Na₂S₂O₃ (10 ml), salmuera (10 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (hexanos-acetato de etilo, 70:30) dio el compuesto del título (0,18 g) con un rendimiento del 64% como un jarabe.

10 (b) **6-Etoxicarbonil-uridina (Iv)**. Una disolución con agitación de 5'-O-(^t-butildimetilsilil)-6-etoxicarbonil-2',3'-O-isopropiliden-uridina (0,23 g, 0,504 mmoles) se trató con TFA acuoso al 50% (3 ml) a 0 °C y luego se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (10-15% de EtOH en CHCl₃) dio **Iv** (0,135 g) con un rendimiento del 89% como un sólido.

15 (c) **6-Etoxicarboniluridina-5'-O-monofosfato (Iw)**. Una disolución con agitación de H₂O (0,02 g, 1,112 mmoles) y POCl₃ (0,16 ml, 1,748 mmoles) en acetonitrilo seco (3 ml) se trató con piridina (0,154 ml, 1,907 mmoles) a 0 °C y se agitó durante 10 min. Se añadió el compuesto **Iv** (0,12 g, 0,397 mmoles) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La mezcla de reacción se inactivó con 25 ml de agua fría y la agitación continuó durante 1 h más. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (resina básica de intercambio iónico Dowex, ácido fórmico 0,1 M) dio **Iw** como un jarabe. El monofosfato **Iw** se transformó en la sal de amonio por neutralización con disolución 0,5 M de NH₄OH a 0 °C y se liofilizó para conseguir las sales de amonio como polvo.

20
25 **Ejemplo 9: Síntesis del compuesto Ix**



Condiciones de reacción: (a) acetona, H_2SO_4 conc., ta; (b) PCC, tamices moleculares de 4 angstrom, DCM, ta; (c) NaBH_4 , EtOH, 0 °C; (d) HClO_4 al 50%, dimetoxipropano, acetona, ta; (e) cloruro de p-metil-benzoilo, trietilamina, DCM; (f) uracilo presililado, TMSOTf , CH_3CN , 0 °C a ta; (g) TBDMSCl , DMAP, TEA, DCM, ta; (h) LDA, I_2 , THF, -78 °C; (i) NH_3 7 N en metanol, ta; (j) POCl_3 , piridina, H_2O , CH_3CN , 0 °C.

Se protegió selectivamente D-fructosa, se oxidó y luego se redujo. La transposición del compuesto resultante se logró mediante 2,2-dimetoxipropano y cantidad catalítica de HClO_4 al 50% en acetona. El acoplamiento del azúcar modificado con uracilo en acetonitrilo seco produjo una mezcla de dos isómeros, el isómero α y el isómero β , en relación ~ 1:1. El isómero β deseado puede yodarse y desprotegerse con NH_3 7 N en metanol y se fosforiló dando el monofosfato deseado en una etapa. Los grupos de protección se quitarán durante la hidrólisis. Finalmente, el nucleósido puede convertirse en la sal de amonio **Ix**.

10 (a) 1,2:4,5-Di-O-isopropilidín- β -fructopiranososa

A una suspensión de D-fructosa (15 g, 83,26 mmoles) en acetona seca se añadió H_2SO_4 concentrado (1,4 ml) por jeringuilla a temperatura ambiente. La suspensión se agitó a ta y se volvió clara lentamente durante un periodo de 3 h. Se enfrió a 0 °C y se añadió una disolución de NaOH (4,65 g) en agua (42 ml) para neutralizar el ácido sulfúrico. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se extrajo con cloruro de metileno (2x). Los extractos combinados se lavaron con agua (2x) y luego se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración, el disolvente se eliminó dando bruto como un sólido blanco. El bruto se disolvió en éter dimetilico y se añadió hexano para precipitar el producto puro (8,5 g) como un sólido blanco.

20 (b) 1,2:4,5-Di-O-isopropilidín- β -D-eritro-2,3-hexodiulo-2,6-piranososa

A una mezcla de 1,2:4,5-di-O-isopropilidín- β -fructopiranososa (8,24 g, 31,67 mmoles, 1,0 equiv.) y tamiz molecular de 4 Å en polvo (20 g) en diclorometano (200 ml) se añadió PCC (20,5 g, 3,0 equiv.) en porciones durante un periodo de 20 min a temperatura ambiente bajo N_2 . La mezcla se agitó a ta durante 5 h y luego se diluyó con gran cantidad de éter y se filtró. El filtrado se pasó a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se pasó a través de una almohadilla de gel de sílice. El disolvente se eliminó a vacío proporcionando el producto como un sólido blanco (7,8 g, rendimiento del 95%). Se usó para la siguiente reacción sin más purificación.

(c) 1,2:4,5-Di-O-isopropilidín-β-D-psicopiranososa

A una disolución de 1,2:4,5-di-O-isopropilidín-β-D-eritro-2,3-hexodiolo-2,6-piranososa (16,4 g, 63,52 mmoles, 1,0 equiv.) en etanol (160 ml) se añadió NaBH₄ sólido (1,45 g, 38,11 mmoles, 0,6 equiv.) en una porción a 15 °C. La mezcla se agitó durante 1,5 h y luego se evaporó a casi sequedad a presión reducida. Se añadió una disolución saturada de NH₄Cl (100 ml) y la mezcla se agitó durante 3 h a ta. Se extrajo con éter (3x). Los extractos combinados se lavaron con salmuera (2x), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El disolvente se eliminó dando bruto como aceite, que se usó para la siguiente reacción directamente.

(d) 1,2:3,4-Di-O-isopropilidín-β-D-psicofuranosa

A una disolución de la 1,2:4,5-di-O-isopropilidín-β-D-psicopiranososa en bruto (14,4 g) en acetona (150 ml) se añadió dimetoxipropano (4 ml) y HClO₄ al 60% (1,0 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 3 h a la misma temperatura. Se añadió una disolución de hidróxido de amonio (2 ml). Después de la evaporación se añadió agua. La mezcla se extrajo con éter (3x). Los extractos combinados se lavaron con salmuera (2x), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. La evaporación del disolvente dio el producto en bruto (10,5 g) como un aceite, que solidificó después de secarse a vacío.

(e) 6-O-(4-Toluoil)-1,2:3,4-di-O-isopropilidén-D-psicofuranosa

A una disolución con agitación de la 1,2:3,4-di-O-isopropilidín-β-D-psicofuranosa en bruto (10,5 g, 40,35 mmoles, 1,0 equiv.), DMAP (0,49 g, 4,035 mmoles, 0,1 equiv.) y TEA (20,42 g, 201,75 mmoles, 5,0 equiv.) se añadió cloruro de p-toluoil (6,86 g, 44,39 mmoles, 1,1 equiv.) gota a gota a 0 °C. Se dejó que la disolución amarilla clara resultante alcanzara lentamente la ta y luego se agitó a ta durante la noche. Se añadió una disolución saturada de NaHCO₃. Después de agitar durante 30 min la fase orgánica se separó y se lavó con agua (2x) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La filtración y evaporación del disolvente dio el bruto, que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (50:1-20:1 de hexano/EtOAc) proporcionando producto puro (10,0 g) como un sólido blanco.

(f) 1-[3',4'-O-Isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-β-D-psicofuranosil]uracilo

A un matraz con uracilo (2,2 g) se añadieron HMDS (15 ml) y TMSCl (2,4 ml). La suspensión resultante se calentó a 120 °C bajo N₂ y se agitó a esta temperatura durante 4 h después de que la suspensión virara a una disolución transparente. Se enfrió a ta y los materiales volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se mantuvo a vacío durante 45 min y luego se disolvió en acetonitrilo seco (25 ml) y se transfirió a una disolución de 6-O-(4-toluoil)-1,2:3,4-di-O-isopropilidén-D-psicofuranosa (4,2 g, 11,1 mmoles, 1,0 equiv.) mediante cánula a ta. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió TMSOTf (2,96 g, 2,41 ml, 13,31 mmoles, 1,2 equiv.) por jeringuilla. Se dejó que la disolución alcanzara lentamente ta y luego se agitó durante la noche. Se añadió gota a gota una disolución saturada de NaHCO₃. Después de agitar durante 30 min se añadió agua. La mezcla se extrajo con EtOAc (3x). Los extractos combinados se lavaron con salmuera (2x), se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se filtraron. La evaporación del disolvente dio el producto en bruto, que se cromatografió sobre gel de sílice (100:1-40:1 de CH₂Cl₂/MeOH) proporcionando 1-[3',4'-O-isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-a-D-psicofuranosil]uracilo puro y 1-[3',4'-O-isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-β-D-psicofuranosil]uracilo (relación de ~ 1:1, 4,26 g, rendimiento del 88,7%) como sólidos blancos.

(g) 1-[3',4'-O-Isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-β-D-psicofuranosil]-6-yodouracilo (profético)

Una disolución con agitación de 1-[3',4'-O-isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-β-D-psicofuranosil]-uracilo (0,628 mmoles) en THF seco (5 ml) se trata con LDA (1,984 mmoles, disolución 2,0 M en THF) en THF seco (2 ml) a -78°C. Después de agitar durante 1 h se añade yodo (0,161 g, 0,628 mmoles) en THF seco (2 ml) y la mezcla se agita durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La reacción se inactiva con AcOH (0,3 ml), luego se lleva hasta temperatura ambiente y se disuelve en acetato de etilo (25 ml). La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml), salmuera (10 ml) y se seca (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (hexanos-acetato de etilo, 70:30) da el compuesto del título.

(h) 1-[1'-O-(t-Butildimetilsilil)-3',4'-O-isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-β-D-psicofuranosil]-6-yodouracilo (profético)

Una mezcla de compuesto 1-[3',4'-O-isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-β-D-psicofuranosil]-6-yodouracilo (1,51 g, 3,48 mmoles, 1,0 equiv.), TBDMSCl (0,63 g, 4,18 mmoles, 1,2 eq.), imidazol (1,19 g, 17,42 mmoles) y DMAP en cloruro de metileno seco (50 ml) se agita a ta durante la noche. Se añade una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se separa y la fase acuosa se extrae con cloruro de metileno. Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua, se secan sobre MgSO₄ anhidro, se filtran. El disolvente se elimina dando el bruto, que se re-cristaliza en acetato de etilo/hexano proporcionando el producto puro.

(i) 1-[1'-O-(t-Butildimetilsilil)-3',4'-O-isopropilidén-β-D-psicofuranosil]-6-yodouracilo (profético)

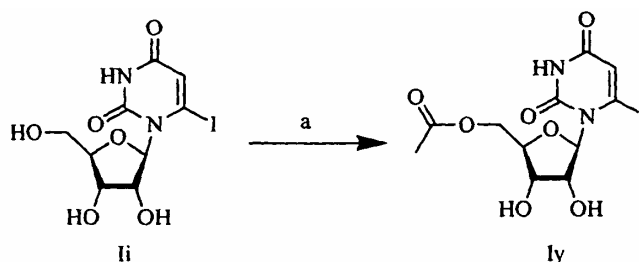
Se disuelve 1-[1'-O-(t-butildimetilsilil)-3',4'-O-isopropilidén-6'-O-(4-toluoil)-β-D-psicofuranosil]-6-yodouracilo (1,22 g) en NH₃ 7 N en metanol. La disolución se agita a ta durante 2 días. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se

purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (50:1-20:1 de CH₂Cl₂/MeOH) dando el producto puro.

(j) 1'-Hidroximetil-6-yodo-uridina-5'-monofosfato y su sal de amonio (lx) (profético)

- 5 A una disolución de POCl₃ (0,676 g, 4,4 mmoles, 4,4 equiv.) en acetonitrilo seco (4 ml) se añade piridina (0,380 g, 4,8 mmoles, 4,8 equiv.) y agua (0,050 g, 2,8 mmoles, 2,8 equiv.) a 0 °C. Después de agitar se añade 1-[1'-O-(t-butildimetilsilil)-3',4'-isopropiliden-β-D-psicofuranosil]-6-yodouracilo (0,429 g, 1,0 mmol, 1,0 equiv.). La disolución resultante se agita durante 4,5 h y se añade agua con hielo (20 ml). La mezcla se agita durante 1,5 h adicionales y luego se evapora a vacío. El residuo se carga a una columna de resina básica Dowex. La columna se lava con gran cantidad de agua (~ 300 ml) y luego con 5% de ácido fórmico dando el producto ácido. Este aceite se neutraliza cuidadosamente con hidróxido de amonio 0,5 N a 0 °C y se liofiliza dando el compuesto lx.
- 10

Ejemplo 10: Síntesis del compuesto ly



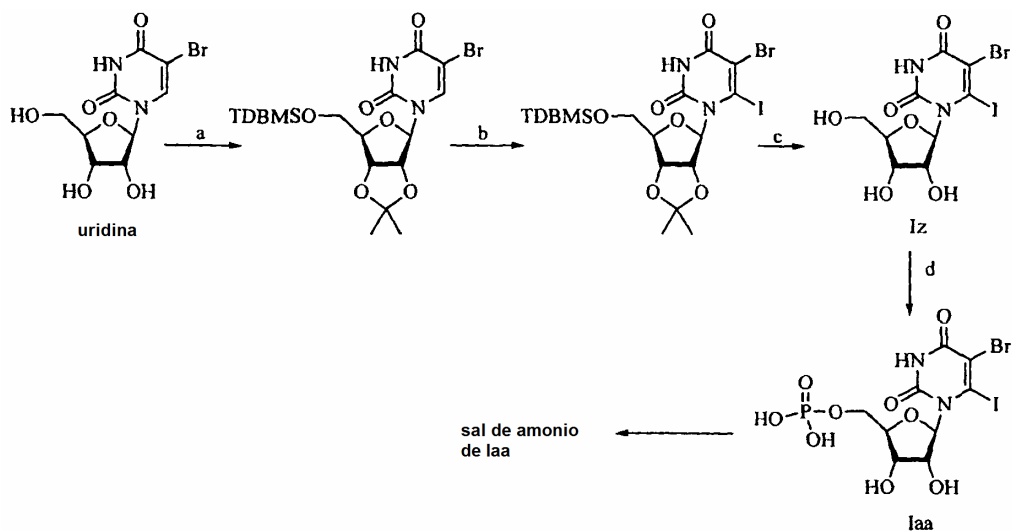
- 15 **Condiciones de reacción: (a) anhídrido acético, piridina, ta. 1 hora**

Se preparó una mezcla con agitación de 6-yodouridina (li) en 2 ml de piridina seca (50 mg, 0,135 mmoles). A esta mezcla se añadieron 0,068 mmoles de anhídrido acético en piridina seca (2 ml). Esta mezcla se agitó durante 25 min, y se añadieron 0,034 mmoles adicionales de anhídrido acético en piridina seca (1 ml), seguido de 0,017 mmoles adicionales de anhídrido acético en piridina (1 ml). Después de 15 minutos de agitación, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el producto se purificó por cromatografía en columna (3% de MeOH en CHCl₃), para obtener 10 mg (rendimiento del 18%) del compuesto diana ly.

20

Ejemplo 11: Síntesis de los compuestos lz y laa

25



Condiciones de reacción: (a) i. acetona/H⁺, ii. TBDMSCl, imidazol/CH₂Cl₂, 0-25 °C; (b) LDA, I₂, THF, -78 °C; (c) TFA al 50%, ta; (d) POCl₃, piridina, H₂O, CH₃CN, 0 °C.

Los compuestos lz y laa se sintetizaron a partir de 5-bromouridina. La introducción de yodo en la posición C-6 se logró mediante LDA y yodo. La desprotección de los grupos protectores con TFA seguido de la mono-fosforilación con oxicluro de fósforo proporcionó el nucleósido mono-fosforilado. Finalmente, el compuesto de monofosfato se transformó en la sal de amonio de laa por neutralización con una disolución 0,5 M de NH₄OH a 0 °C y se liofilizó para conseguir las sales de amonio como polvo.

30

(a) 5'-O-(^t-Butildimetilsilil)2',3'-O-isopropiliden-5-bromo-uridina. Una suspensión con agitación de 5-bromouridina

(lg) en acetona seca (50 ml) se trató con H₂SO₄ (0,5 ml) gota a gota a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó adicionalmente 1 h y se neutralizó con Et₃N. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (5-8% de MeOH en CHCl₃) dio la 2,3-O-isopropiliden-5-bromouridina (1,15 g) con rendimiento cuantitativo como un sólido blanco. Una disolución con agitación de 2,3-O-isopropiliden-5-bromouridina (0,2 g) en seco CH₂Cl₂ (3 ml) se trató con imidazol (0,095 g, 1,408 mmoles) y TBDMSCI (0,105 g, 0,704 mmoles) a 0 °C. La mezcla de reacción se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. El disolvente se evaporó a vacío y el sólido se recogió en acetato de etilo (30 ml), se lavó con agua (15 ml), salmuera (15 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (5% de MeOH en CHCl₃) dio el compuesto del título con un rendimiento del 96% como sólido espumoso.

(b) 5'-O-(^t-Butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-5-bromo-6-yodo-uridina. Una disolución con agitación de 5'-O-(^t-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-5-bromo-uridina (0,628 mmoles) en THF seco (5 ml) se trató con LDA (1,984 mmoles, disolución 2,0 M en THF) en THF seco (2 ml) a -78°C. Después de agitar durante 1 h se añadió yodo (0,161 g, 0,628 mmoles) en THF seco (2 ml) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La reacción se inactivó con AcOH (0,3 ml), luego se llevó a temperatura ambiente y se disolvió en acetato de etilo (25 ml). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml), salmuera (10 ml) y se secó (Na₂SO₄). La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (hexanos-acetato de etilo, 70:30) dio el compuesto del título con un rendimiento del 90% como un sólido amarillo espumoso.

(c) 5-Bromo-6-yodo-uridina (Iz). Una disolución con agitación de 5'-O-(^t-butildimetilsilil)-2',3'-O-isopropiliden-5-bromo-6-yodo-uridina (0,300 g) se trató con TFA acuoso al 50% (3 ml) a 0 °C y luego se llevó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h, protegido de la luz. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (10-15% de EtOH en CHCl₃) dio **Iz** (0,182 g, 0,492 mmoles) con un rendimiento del 85% como un sólido marrón claro.

(d) 5-Bromo-6-yodo-uridina-5'-O-monofosfato, sal de amonio (Iaa). Una disolución con agitación de H₂O (0,034 g, 1,89 mmoles) y POCl₃ (0,277 ml, 2,973 mmoles) en acetonitrilo seco (3 ml) se trató con piridina (0,261 ml, 3,24 mmoles) a 0 °C y se agitó durante 10 min. Se añadió el compuesto **Iz** (0,675 mmoles) y la mezcla se agitó durante 5 h adicionales a la misma temperatura. La mezcla de reacción se inactivó con 25 ml de agua fría y la agitación continuó durante 1 h más. La evaporación del disolvente y la purificación del bruto por cromatografía en columna (resina básica de intercambio iónico Dowex, ácido fórmico 0,1 M) dio el derivado de monofosfato con un rendimiento del 61% como un jarabe. Finalmente, el compuesto de monofosfato se transformó en la sal de amonio de **Iaa** por neutralización con disolución 0,5 M de NH₄OH a 0 °C y se liofilizó para conseguir las sales de amonio como polvo.

35 **Ejemplo 12: Cultivos de *P. falciparum* y ensayos de células CHO**

Se realizaron ensayos comparando las actividades antiplasmodiales de los compuestos de la invención usando el procedimiento SYBR-Green.^{xlviii} Brevemente, los compuestos se disolvieron en DMSO para lograr una concentración de 10 mg/ml. Se añadieron cincuenta microlitros de RPMI-A a cada pocillo en una placa de 96 pocillos antes de que se añadieran 40 µl de RPMI-A y 10 µl de disolución de compuesto al primer pocillo, el contenido del pocillo se mezcló, se extrajeron 50 µl y se añadieron al siguiente pocillo en serie y el procedimiento se repitió hasta que se llegó al penúltimo pocillo. Esto produjo una placa con una serie de diluciones dobles a su través, excepto para el último pocillo en la serie, que contuvo RPMI-A solo. Se añadieron cincuenta microlitros de cultivo de parásito (2% de hematocrito, 2% de parasitemia) a cada pocillo y las placas se incubaron entonces a 37 °C en 95% de N₂, 3% de CO₂ y 2% de O₂ durante 72 h.

Se cultivaron células CHO (ATCC, Manassas, VA) en RPMI-1640 complementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma, St. Louis, MO), HEPES 25 mM y gentamicina (RPMI-10). Se sembraron células en placas de 96 pocillos y se cultivaron al 50% de confluencia en 100 µl de RPMI-10 por pocillo antes de la adición de tanto DMSO solo como un compuesto de prueba disuelto en DMSO a una concentración de 10 mg/ml. Los gradientes de compuesto se prepararon añadiendo 90 µl de RPMI-10 mezclado con 10 µl de disolución de compuesto al primer pocillo en la serie, mezclando, transfiriendo 100 µl al siguiente pocillo y repitiendo hasta que se alcanzó el penúltimo pocillo. Después de 48 h, la viabilidad de las células se determinó desechando el medio de los pocillos y añadiendo 100 µl de 10 mg/ml de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma, St. Louis, MO) en RPMI-10, incubando las placas durante una hora adicional y luego eliminando el medio y añadiendo 100 µl de DMSO y leyendo la absorbancia a 650 nm.^{xlix} Los valores de CI₅₀ de compuestos individuales se determinaron aplicando un análisis de regresión no lineal de la curva de respuesta a dosis usando el programa informático SigmaPlot (Jandel Scientific).

(a) Enzimología. Se incubaron ODCasa de *M. thermoautotrophicum* (*Mt*) y el compuesto **Id** a temperatura ambiente en el tampón de reacción (Tris 50 mM, DTT 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,5). Las concentraciones de **Id** fueron 1x, 2,5x, 3,5x y 5x de la concentración de enzima, correspondientes a 50, 125, 175 y 250 µM, respectivamente. La actividad enzimática restante en la mezcla de reacción de enzima-inhibidor se midió después de 30 min, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 96 horas después del comienzo de la incubación. Se sacaron alícuotas (1 µl) de la mezcla de reacción y se diluyeron a 2,5 ml con el tampón de ensayo (Tris 50 mM, DTT 1 mM, pH 7,5). Después de la dilución, la concentración de enzima eficaz fue 20 nM y las concentraciones de inhibidor fueron: 20, 50, 70 y 100 nM. Cada ensayo de inhibición se inició por una inyección de 5 µl de OMP 11,41 mM (preparado en tampón de ensayo). La concentración de sustrato final (OMP) fue 40 µM.

- La inhibición de ODCasa de *P. falciparum* (*Pf*) se ensayó de un modo similar. Se incubó ODCasa de *Pf* (50 μ M) en presencia de 0,5x, 1x, 1,2x y 2x correspondiente a 25, 50, 72 y 100 μ M, respectivamente, de compuesto de prueba. La reacción de control no contuvo compuesto de prueba. Todas las muestras se prepararon en Tris 50 mM, DTT 10 mM, NaCl 20 mM, pH 8,0 y se incubaron a temperatura ambiente. La actividad restante de ODCasa se midió a 37 $^{\circ}$ C durante hasta 48 h. En cada momento de tiempo, una alícuota de 3 μ l de la mezcla de incubación se diluyó con el tampón de reacción (Tris 50 mM, DTT 1 mM, pH 8,0) a un volumen final de 2,5 ml. La reacción se inició por una única inyección de 6 μ l de OMP 2,85 mM en la cámara de muestra de ITC. La concentración de sustrato final fue 12 μ M.
- La concentración de ODCasa de *Pf* en cada una de las muestras (tiempos de incubación de 15, 30 y 45 min) fue 60 nM. Las concentraciones de **Id** fueron 30, 60 y 72 nM correspondientes a 0,5x, 1x y 1,2x la concentración de enzima, respectivamente. Las muestras se incubaron a 37 $^{\circ}$ C. Las actividades de enzima restantes en estas muestras se midieron inyectando 3 μ l de OMP 2,85 mM. La actividad enzimática a $t = 0$ se midió inyectando OMP y 6-yodo-UMP simultáneamente en la disolución de enzima 60 nM en la cámara de muestra de ITC. La disolución de los ligandos (sustrato y compuesto de prueba) se preparó dando las concentraciones finales de 30, 60 y 75 nM del compuesto de prueba y OMP 6 μ M en la celda de reacción después de una inyección de 3 μ l. La muestra de control con enzima 60 nM se incubó durante 15-45 minutos a 37 $^{\circ}$ C, y la actividad enzimática se midió después de la adición de 3 μ l de OMP 2,85 mM.
- (b) Análisis de datos.** La actividad enzimática se derivó de las porciones lineales de las curvas de progreso de las isotermas obtenidas de la calorimetría de valoración isotérmica (potencia frente al tiempo). En todos los cálculos se supuso una inhibición covalente sin renovación de inhibidor.



- La tasa de inhibición (k) a cada concentración del inhibidor se derivó de la pendiente del \ln (% de actividad enzimática) frente al tiempo. Las constantes de inhibición enzimática k_{inact} y K_i se derivaron del ajuste no lineal de las pendientes a la siguiente ecuación:

$$k = \frac{k_{inact} \times [I]}{K_i + [I]} \quad (1)$$

- en la que k es la tasa de inhibición a una concentración de inhibidor específica, k_{inact} es la constante de inactivación y K_i es la constante de disociación para la inactivación,¹

$$\text{Pendiente} = \frac{K_i}{k_{inact}} \quad (2)$$

- La tasa de inactivación k_{inact} se deriva del recíproco de la ordenada en el origen del eje y. La constante de inhibición para la formación del complejo reversible K_i se deriva del recíproco del eje x negativo.
- El tiempo medio de inactivación $t_{1/2}$ se calculó a partir de:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{inact} \quad (3)$$

- (c) Análisis cristalográfico.** Todas las concentraciones de ODCasa de *Mt* se determinaron usando un kit de ensayo de proteínas BioRAD y BSA como patrón. Se preparó ODCasa (10 mg/ml) con 6-yodo-UMP (**Id**, 10 mM) en tampón de cristalización compuesto por HEPES-NaOH 20 mM a pH 7,5, cloruro sódico 150 mM y DTT 5 mM. Esta disolución de proteína (2 μ l) se mezcló con 2 μ l de disolución de depósito que contenía citrato de sodio 1,1 - 1,3 M, 5% (v/v) de dioxano y MES 100 mM a pH 6,5 y luego se fijó para la cristalización usando la técnica de gota pendiente. Al día siguiente, la microsiembra empezó la formación de cristales de calidad para difracción, que duró aproximadamente una semana hasta alcanzar su tamaño completo. Cuando se recogieron, los cristales se sumergieron inmediatamente en agua de cristalización complementada con 15% (v/v) de glicerol para la crioprotección, luego se congelaron rápidamente en una corriente de nitrógeno seco a 100 K. Los datos de difracción se recogieron a 1,6 \AA de resolución en la línea de haz 14BM-C BioCARS, Advanced Photon Source, IL, EE.UU. Los datos recogidos se redujeron usando los programas DENZO, SCALEPACK y TRUNCATE del paquete de programas CCP4.^{lii} Los cristales pertenecieron al grupo espacial P2₁ con parámetros de celdilla unidad, $a = 57,8 \text{ \AA}$, $b = 73,3 \text{ \AA}$, $c = 59,1 \text{ \AA}$, $\beta = 119,3^{\circ}$. Las fases se calcularon basándose en las coordenadas del complejo de ODCasa de *Mt*-BMP (código PDB: 1X1Z). Se construyó un modelo atómico con la ayuda del programa O y se refinó usando el programa CNS, versión 1.1, produciendo los factores finales $R_{cristal}$ y R_{libre} del 15,9% y 18,7%, respectivamente.^{liii,liiv} La recogida de datos y la estadística de refinamiento final se muestran en la Tabla S1. Las

coordenadas atómicas y los factores estructurales se han depositado en la base de datos de proteínas.

(d) Ensayos de glóbulos sanguíneos primarios.

- 5 Se usó el siguiente procedimiento para realizar ensayos de glóbulos sanguíneos primarios humanos. Se añadieron 3 ml de PBS (instalación de OCI Media) a 3 ml de sangre agotada en suero de controles humanos adultos normales. Se pipetearon 6 ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham 17-1440-03) en un tubo de centrifuga de 15 ml. Se recubrió con sangre diluida con PBS. Se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, sin freno.
- 10 Se extrajo y se desechó la fase superior (PBS). Las células en la superficie de separación de PBS/Ficoll se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml limpio. Se añadieron 10 ml de PBS. Luego se centrifugó a 1250 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 15 Se desechó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en medio Dulbecco modificado por Iscove (Gibco 12440 preparado por instalación de OCI Media) complementado con 2ME $5,5 \times 10^{-5}$ M (Fisher 03446-100) y 5% de SBF (Hyclone SH30397-03 n° de lote KPG21604). Las células se cultivaron a 50.000 células por pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar 3595). Se añadió concanavalina A (Pharmacia 17-0450-01) a una concentración final de 1,5 microg/ml. Todas las condiciones se establecieron por triplicado.
- 20 Se incluyeron controles sin tratar (solo Con A). Las células se cultivaron durante 48 horas o 72 horas a 37 °C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Se añadieron 0,5 uCi de H3 (Perkin Elmer NET027A) por pocillo en 10 microl durante las 8 últimas horas del periodo de cultivo. Los pocillos se transfirieron a placas Unifilter-96 GFC (Perkin Elmer 6005174).
- 25 Las placas se secaron durante 1 hora a 37 °C. Se añadieron 25 microl de líquido de centelleo Microscint O (Perkin Elmer 6013611) por pocillo. Los datos se recogieron por lectura de las cuentas de radiactividad.

(e) Estudios de eficacia de ratón contra plasmodios:

- 30 Infección por AS de *P. chabaudi chabaudi* (Pcc): Hay dos especies diferentes de malaria de ratón que se usan comúnmente en estudios de eficacia en ratones: *P. chabaudi chabaudi* AS y *P. burghei*. La cepa de *Pcc* induce mayor carga de parásitos e incluso mueren algunas cepas de ratón. Si la cepa de *P. burghei* se administra al ratón, desarrollan menor parásitos, pero enferman mucho. La cepa de *Pcc* proporciona la oportunidad de observar en ratones si los números de parásitos se reducen en el contexto de un animal razonablemente sano. Así, la cepa de *Pcc* se usó en el modelo de eficacia.
- 35 Se mantuvo PCCAS en estadio en sangre como se ha descrito (Podoba JE y Stevenson, 1991) [2]. Se iniciaron infecciones en animales experimentales por inyección intraperitoneal de 1×10^6 eritrocitos infectados por *P. chabaudi chabaudi* (PCCAS). La evolución de la infección se monitorizó diariamente durante 18 días determinando parasitemia sobre frotis de sangre poco espesa teñido con Diff Quik (American Scientific Products, Mississauga, ON). Los
- 40 compuestos a ensayarse se enrasaron en RPMI 1640 a la concentración requerida para administrar la dosis diana en un volumen total de 0,5 ml y luego se esterilizaron por filtración. Los compuestos se almacenaron a 4 °C antes de uso. Después de la infección, la presencia de parásitos en la circulación periférica se monitorizó diariamente hasta que los parásitos se observaron por primera vez. Los ratones se inyectaron entonces diariamente durante tres días consecutivos con tanto RPMI 1640 solo como compuesto disuelto en RPMI. La salud de los animales se evaluó diariamente y la parasitemia se determinó examinando extensiones de sangre. Los animales que fueron inactivos y que se consideraron que estaban terminalmente enfermos se sacrificaron inmediatamente.
- 45

(f) Resultados

- 50 Se encontró que el compuesto **li** en evaluaciones de actividad antiparasítica *in vitro* presentó potente actividad antiplasmodial, con Cl_{50} de $4,4 \pm 1,3$ mM y $6,2 \pm 0,7$ mM contra las cepas aisladas ItG y 3D7 de *P. falciparum*, respectivamente (Figura 4). Así, el compuesto **li** es un inhibidor de ODCasa covalente y su análogo de nucleósido abren el camino a una nueva clase de inhibidores contra la malaria. Las toxicidades para líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), Vero y de fibroblasto humano (HFF) para el compuesto **li** fueron 366 ± 45 mM (Cl_{50}), >300 mM (CC_{50}) y >300 mM (Cl_{50}), respectivamente. Adicionalmente, la toxicidad sobre glóbulos sanguíneos primarios humanos (PBL) tampoco se observó hasta 200 mM. Estos resultados muestran que el compuesto **li** puede fosforilarse a su derivado de monofosfato **lj** e inhibe el parásito (*in vitro* e *in vivo*).
- 60 Se realizaron estudios de eficacia en ratones usando **li** para probar el potencial *in vivo* de este compuesto. Los ratones se infectaron con *P. burghei*, una cepa de ratón similar al parásito de la malaria humana *P. falciparum*. La cepa de *P. burghei* es aproximadamente 20 veces menos sensible a **li**, de manera que la dosis en ratones tuvo que ajustarse en consecuencia. La parasitemia se monitorizó en ratones después de administrar el fármaco a dos dosis diferentes: 0,6 mg/ratón (n=3) y 6 mg/ratón (n=3). Hubo un grupo de control de ratones sin ningún tratamiento con **li**. La Figura 5 muestra la parasitemia reducida en ratones tratados con fármaco en comparación con los controles, y esto depende de la dosis. La Figura 6 representa la representación de la tasa de supervivencia en animales tratados con **li** frente a controles, y claramente corrobora la reducida parasitemia con la del mayor tiempo de supervivencia, cuando se tratan con **li**.
- 65

Anteriormente la Figura 7 confirma que mayores dosis de **li** potencian la eficacia de este compuesto contra la malaria, con elevada supervivencia de los animales tratados en comparación con aquellos sin ningún fármaco.

- 5 Los compuestos la, lb, lc, ld, le, lf, lj, lp, lo, ln y lt fueron todos probados para actividad antipalúdica contra *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. Estos compuestos mostraron CI_{50} en el intervalo de aproximadamente 20 μ M a aproximadamente 2000 μ M.

10 CITANES COMPLETAS PARA DOCUMENTOS A LOS QUE SE HA HECHO REFERENCIA EN LA MEMORIA DESCRIPTIVA

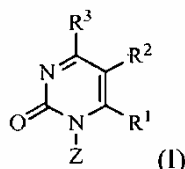
- i. Warshel, A.; Florian, J. Computer simulations of enzyme catalysis: finding out what has been optimized by evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998, 95, 5950-5955.
- 15 ii. Radzicka, A.; Wolfenden, R. A proficient enzyme. Science 1995, 267, 90-93.
- iii. Miller, B. G.; Wolfenden, R. Catalytic proficiency: The unusual case of OMP decarboxylase. Ann. Rev. Biochem. 2002, 71, 847-885.
- 20 iv. Sievers, A.; Wolfenden, R. Equilibrium of formation of the 6-carbanion of UMP, a potential intermediate in the action of OMP decarboxylase. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 13986-13987.
- v. Snider, M. J.; Wolfenden, R. The rate of spontaneous decarboxylation of amino acids. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 11507-11508.
- 25 vi. Schutz A. G. R.; Konig, S.; Hubner, G.; Tittmann, K. Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates. Biochemistry 2005, 44, 6164-6179.
- 30 vii. Tittmann, K.; Golbik, R.; Uhlemann, K.; Khailova, L.; Schneider, G.; Patel, M.; Jordan, F.; Chipman, D. M.; Duggleby, R. G.; Hübner, G. NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. Biochemistry 2003, 42, 7885-7891.
- viii. Reichard, P. The enzymatic synthesis of pyrimidines. Adv. Enzymol. Mol. Biol. 1959, 21, 263-294.
- 35 ix. Donovan, W. P.; Kushner, S. R. Purification and characterization of orotidine-5'-monophosphate decarboxylase from *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 1983, 156, 620-624.
- x. Pragobpol, S.; Gero, A. M.; Lee, C. S.; O'Sullivan, W. J. Orotate phosphoribosyltransferase and orotidylate decarboxylase from *Crithidia luciliae*: Subcellular location of the enzymes and a study of substrate channeling. Arch. Biochem. Biophys. 1984, 230, 285-293.
- 40 xi. Kotra, L. P.; Pai, E.F.; Bello, A. M.; Fujihashi, M.; Poduch, E. (2005) Inhibitors of orotidine monophosphate decarboxylase (ODCase) activity, solicitud de EE.UU. nº 60/596.537, patente en trámite.
- 45 xii. Christopherson, R. I.; Lyons, S. D.; Wilson, P. K. Inhibitors of de Novo nucleotide biosynthesis as drugs. Acc. Chem. Res. 2002, 35, 961-971.
- xiii. Scott, H. V.; Gero, A. M.; O'Sullivan, W. J. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by pyrazofurin, an inhibitor of pyrimidine biosynthesis de novo. Mol. Biochem. Parasitol. 1986, 18, 3-15.
- 50 xiv. Levine, H. L.; Brody, R. S.; Westheimer, F. H. Inhibition of orotidine-5'-phosphate decarboxylase by 1-(5'-phospho-beta-d-ribofuranosyl)barbituric acid, 6 azauridine 5'-phosphate, and uridine 5'-phosphate, Biochemistry 1980, 19, 4993-4999.
- 55 xv. Harris, P.; Poulsen, J. C. N.; Jensen, K. F.; Larsen, S. Substrate binding induces domain movements in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. J. Mol. Biol. 2002, 318, 1019-1029.
- xvi. Wu, N.; Mo, Y.; Gao, J.; Pai, E. F. Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 2017-2022.
- 60 xvii. Appleby, T. C.; Kinsland, C.; Begley, T. P.; Ealick, S. E. The crystal structure and mechanism of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 2005-2010.
- 65 xviii. Miller, B. G.; Hassell, A. M.; Wolfenden, R.; Milburn, M. V.; Short, S. A. Anatomy of a proficient enzyme: the structure of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in the presence and absence of a potential transition state

- analog. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 2011-2016.
- xix. Lee, T. S.; Chong, L. T.; Chodera, J. D.; Kollman, P. A. An alternative explanation for the catalytic proficiency of orotidine 5'-phosphate decarboxylase. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 12837-12848.
- 5 xx. Miller, B. G.; Butterfoss, G. L.; Short, S. A.; Wolfenden, R. Role of enzyme-ribofuranosyl contacts in the ground state and transition state for orotidine 5'-phosphate decarboxylase: a role for substrate destabilization? *Biochemistry* 2001, 40, 6227-6232.
- 10 xxi. Warshel, A.; Strajbl, M.; Villa, J.; Florian, J. Remarkable rate enhancement of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase is due to transition-state stabilization rather than to ground-state destabilization. *Biochemistry* 2000, 39, 14728-14738.
- 15 xxii. Harris, P.; Navarro Poulsen, J. C.; Jensen, K. F.; Larsen, S. Structural basis for the catalytic mechanism of a proficient enzyme: orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Biochemistry* 2000, 39, 4217-4224.
- xxiii. Jencks, W. P. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the Circe effect. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 1975, 43, 219-410.
- 20 xxiv. Miller, B. G.; Snider, M. J.; Short, S. A.; Wolfenden, R. Contribution of enzyme-phosphoribosyl contacts to catalysis by orotidine 5'-phosphate decarboxylase. *Biochemistry* 2000, 39, 8113-8118.
- xxv. Amyes, T. L.; Richard, J. P.; Tait, J. J. Activation of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase by phosphate dianion: the whole substrate is the sum of two parts. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 15708-15709.
- 25 xxvi. Gero, A. M.; O'Sullivan, W. J. Purines and pyrimidines in malarial parasites, *Blood Cells* 1990, 16, 467-484.
- xxvii. Jones, M. E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: Genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 1980, 49, 253-279.
- 30 xxviii. Seymour, K. K.; Lyons, S. D.; Phillips, L.; Rieckmann, K. H.; Christopherson, R. I. Cytotoxic effects of inhibitors of de novo pyrimidine biosynthesis upon *Plasmodium falciparum*, *Biochemistry* 1994, 33, 5268-5274.
- 35 xxix. Krungkrai, J.; Krungkrai, S. R.; Phakanont, K. Anti-malarial activity of orotate analogs that inhibit dihydroorotase and dihydroorotate dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 43, 1295-1301.
- xxx. Hirota, K.; Tomishi, T.; Maki, Y.; Sajiki, H. *Nucleosides & Nucleotides* 1998, 17, 161-173.
- 40 xxxv. Tanaka, H.; Hayakawa, H.; Haraguchi, K.; Miyasaka, T. Introduction of an azido group to the C-6 position of uridine by the use of a 6-iodouridine derivative. *Nucleosides & Nucleotides* 1985, 4, 607-612.
- xxxvi. Tanaka, H.; Hayakawa, H.; Miyasaka, T. "Umpolung" of reactivity at the C-6 position of uridine: a simple and general method for 6-substituted uridines, *Tetrahedron* 1982, 38, 2635-2642.
- 45 xxxvii. Sowa, T.; Ouchi, S. Facile synthesis of 5'-nucleotides by selective phosphorylation of a primary hydroxyl group of nucleosides with phosphoryl chloride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1975, 48, 2084-2090.
- 50 xxxviii. Ueda, T.; Yamamoto, M.; Yamane, A.; Imazawa, M.; Inoue, H. Conversion of uridine nucleotides to the 6-cyano derivatives: synthesis of orotidylic acid. *Carbohydr. Nucleosides Nucleotides* 1978, 5, 261-271.
- xxxix. Poduch, E.; Bello, A.M.; Tang, S.; Fujihashi, M.; Pai, E.F.; Kotra, L.P. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 4937-4935.
- 55 xl. Tanaka, H.; Hayakawa, H.; Haraguchi, K.; Miyasaka, T. *Nucleosides & Nucleotides* 1985, 4, 607-612.
- xli. Tanaka, H.; Hayakawa, H.; Miyasaka, T. *Tetrahedron* 1982, 38, 2635-2642.
- 60 xlii. Sowa, T.; Ouchi, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1975, 48, 2084-2090.
- xliii. Ueda, T.; Yamamoto, M.; Yamane, A.; Imazawa, M.; Inoue, H. *Carbohydr. Nucleosides Nucleotides* 1978, 5, 261-271.
- xliv. Tanaka, H.; Hayakawa, H.; Haraguchi, K.; Miyasaka, T. Introduction of an azido group to the C-6 position of uridine by the use of a 6-iodouridine derivative. *Nucleosides Nucleotides* 1985, 4, 607-612.
- 65 xlv. Tanaka, H.; Hayakawa, H.; Miyasaka, T. "Umpolung" of reactivity at the C-6 position of uridine: a simple and general method for 6-substituted uridines. *Tetrahedron* 1982, 38, 2635-2642.

- xlvi. Sowa, T.; Ouchi, S. Facile synthesis of 5'-nucleotides by selective phosphorylation of a primary hydroxyl group of nucleosides with phosphoryl chloride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1975, 48, 2084-2090.
- 5 xvii. Ueda, T.; Yamamoto, M.; Yamane, A.; Imazawa, M.; Inoue, H. Conversion of uridine nucleotides to the 6-cyano derivatives: synthesis of orotidylic acid. *Carbohydr. Nucleosides Nucleotides* 1978, 5, 261-271.
- 10 xviii. Smilkstein, M.; Sriwilaijaroen, N.; Kelly, J. X.; Wilairat, P.; Riscoe, M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput anti-malarial drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 1803-1806.
- 15 xlix. Camping, B. G.; Pym, J.; Galbraith, P. R.; Cole, S. P. Use of MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemia Res.* 1988, 12, 823 - 831.
- 20 (l) Alejandro G. Marangoni, *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. John Wiley & Sons. Inc. 2003.
- (li) Otwinowski, Z.; Minor, W., *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. In *Macromolecular Crystallography, Part A*, Carter, C. W., Jr.; Sweet, R. M., Eds. Academic Press: 1997; Vol. 276, pp 307-326.
- 25 (lii) Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994, 50, 760-763.
- (liii) Jones, T. A.; Zou, J.-Y.; Cowan, S. W. Improved Methods for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in these Models. *Acta Crystallogr A* 1991, 47, 110-119.
- 30 (liv) Brunger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; DeLano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J. S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1998, 54 Part 5, 905 -921.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I, tautómeros del mismo y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el profármaco se selecciona de un éster fenílico, un éster de alquilo C₈-C₂₄, un éster alcoximetílico, un carbamato y un éster de aminoácido, de cualquier grupo hidroxilo, tior, amino o carboxilo disponible en el compuesto de fórmula I:



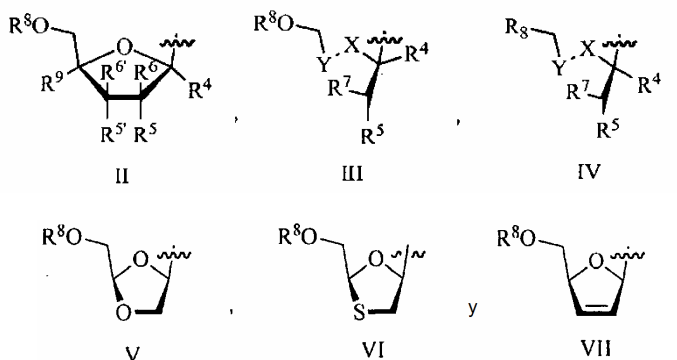
10 en la que

R¹ se selecciona de CN, N₃, I, Br, NH₂, NO₂, C(O)alquilo C₁₋₆, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquilo C₁₋₆)₂, NHC(O)alquilo C₁₋₆ y NHC(O)O-alquilo C₁₋₆;

15 R² se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, fluoro-alquilo C₁₋₆ sustituido, fluoro-alcoxi C₁₋₆ sustituido, N₃, NH₂ y CN;

R³ se selecciona de OH, NH₂, H y NHC(O)alquilo C₁₋₆;

Z se selecciona de:



20

en las que

25 R⁴ se selecciona de H, alquilo C₁₋₆ e hidroxialquilo C₁₋₆ sustituido; uno de R⁵ y R⁶ es hidrógeno y el otro se selecciona de H, OH y F y uno de R⁵ y R⁶ es hidrógeno y el otro se selecciona de H, OH y F o R⁵ y R⁶ o R⁵ y R⁶ juntos pueden ser =O o =CH₂;

R⁷ se selecciona de H, F y OH;

R⁸ se selecciona de H, C(O)alquilo C₁₋₆, P(O)(OH)₂, P(O)(O-alquilo C₁₋₆)₂ y P(O)(O-alquilo C₁₋₆)OH;

30 R⁹ se selecciona de H, N₃, CN, alquilo C₁₋₆; y

X-Y se selecciona de -CH₂-O-, -O-CH₂- y -S-CH₂-;

para su uso en el tratamiento o prevención de malaria en un sujeto.

35 2. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que R¹ en los compuestos de fórmula I se selecciona de I, Br, NO₂, N(alquilo C₁₋₄)₂, NHC(O)alquilo C₁₋₄ y NHC(O)O-alquilo C₁₋₄.

3. Un compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que R¹ en los compuestos de fórmula I se selecciona de I, Br, NO₂, N(CH₃)₂, NHC(O)CH₃ y NHC(O)CH₃.

40

4. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que R¹ en los compuestos de fórmula I se selecciona de I, Br y N(CH₃)₂.

5. Un compuesto para su uso según la reivindicación 4, en el que R¹ en los compuestos de fórmula I es I.

45

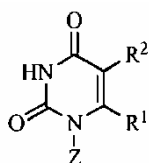
6. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que R² en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, fluoro-alquilo C₁₋₄ sustituido, fluoro-alcoxi C₁₋₄ sustituido, N₃, NH₂ y CN.

7. Un compuesto para su uso según la reivindicación 6, en el que R^2 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, fluoro, cloro, bromo, CH_3 , OCH_3 , CF_3 , CF_3O , N_3 , NH_2 y CN .

5 8. Un compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que R^2 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, fluoro, cloro, bromo, OCH_3 y CF_3 , CF_3O .

9. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que R^3 en los compuestos de fórmula I se selecciona de OH y NH_2 .

10 10. Un compuesto para su uso según la reivindicación 9, en el que R^3 en los compuestos de fórmula I es OH y el compuesto de fórmula I tiene la siguiente estructura tautómera:



15 11. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que en los compuestos de fórmula I Z es la fórmula II.

20 12. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que R^4 en los compuestos de fórmula I es H.

13. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que R^5 y R^6 son ambos OH y R^6 y R^6 son ambos H.

25 14. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que R^5 es H, R^5 es OH y R^6 y R^6 son ambos H.

15. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que R^7 en los compuestos de fórmula I es H u OH .

30 16. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que R^8 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, $C(O)alquilo$ C_1-C_4 , $P(O)(OH)_2$, $P(O)(O-alquilo$ $C_1-C_4)_2$ y $P(O)(O-alquilo$ $C_1-C_4)OH$.

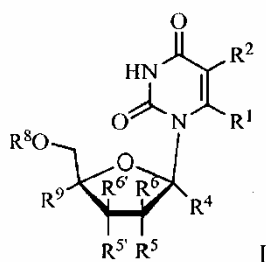
35 17. Un compuesto para su uso según la reivindicación 16, en el que R^8 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, $C(O)CH_3$, $P(O)(OH)_2$, $P(O)(OCH_3)_2$ y $P(O)(OCH_3)OH$.

18. Un compuesto para su uso según la reivindicación 17, en el que R^8 en los compuestos de fórmula I se selecciona de H, $C(O)CH_3$ y $P(O)(OH)_2$.

40 19. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que R^9 en los compuestos de fórmula I es H.

20. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que X-Y es $-O-CH_2-$.

45 21. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que el compuesto de fórmula I tiene la siguiente estructura:



50 22. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que el compuesto de fórmula I se

selecciona de:

- 6-Cianouridina;
- 5 6-Cianouridina-5'-monofosfato;
- 6-Azidouridina;
- 10 6-Azidouridina-5'-*O*-monofosfato;
- 6-Aminouridina-5'-*O*-monofosfato;
- 6-Aminouridina;
- 15 6-Metil-uridina;
- 6-Metil-uridina-5'-*O*-monofosfato;
- 6-Yodo-uridina;
- 20 6-N-Metilaminouridina;
- 6-N,N-Dimetilaminouridina;
- 25 6-N Metilaminouridina-5'-*O*-monofosfato;
- 6-Yodo-uridina-5'-*O*-monofosfato;
- 5-Fluoro-6-aminouridina;
- 30 5-Bromo-6-yodo-uridina;
- 5-Fluoro-6-azidouridina;
- 35 5-Fluoro-6-yodo-uridina;
- 5-Fluoro-6-aminouridina-5'-*O*-monofosfato;
- 5-Bromo-6-yodo-uridina-5'-*O*-monofosfato;
- 40 5-Fluoro-6-azidouridina-5'-*O*-monofosfato;
- 5-Fluoro-6-yodo-uridina-5'-*O*-monofosfato;
- 45 6-Metoxicarbonil-uridina;
- 6-Etoxicarbonil-uridina;
- 6-Metoxicarbonil-uridina-5'-*O*-monofosfato;
- 50 6-Etoxicarbonil-uridina-5'-*O*-monofosfato;
- 1'-Hidroximetil-6-yodo-uridina;
- 55 1'-Hidroximetil-6-yodo-uridina-5'-monofosfato, y

sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que el profármaco se selecciona de un éster fenílico, un éster de alquilo C₈-C₂₄, un éster alcoximetílico, un carbamato y un éster de aminoácido, de cualquier grupo hidroxilo, tiol, amino o carboxilo disponible en el compuesto de fórmula I.

- 60 23. Un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, para su uso en prevenir o tratar una infección de un parásito palúdico en un sujeto.
- 65 24. Un procedimiento para inhibir ODCasa en una muestra de plasma o de sangre aislada de un sujeto que comprende añadir a dicha muestra de plasma o de sangre una cantidad eficaz inhibidora de un compuesto seleccionado de un

compuesto de fórmula I, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

25. Un compuesto de fórmula I seleccionado de:

- 5 6-(dimetilamino)uridina;
 5-fluoro-6-aminouridina;
 10 5-bromo-6-aminouridina;
 5-fluoro-6-azidouridina;
 15 1'-hidroximetil-6-yodo-uridina;
 6-(dimetilamino)-2'-desoxiuridina;
 5-fluoro-6-amino-2'-desoxiuridina;
 20 5-bromo-6-amino-2'-desoxiuridina;
 5-fluoro-6-azido-2'-desoxiuridina;
 5-cloro-6-yodo-2'-desoxiuridina;
 25 5-cloro-6-azido-2'-desoxiuridina;
 5-metoxi-6-yodo-2'-desoxiuridina;
 30 5-metoxi-6-azido-2'-desoxiuridina;
 5-metoxi-6-amino-2'-desoxiuridina;
 5-bromo-6-yodo-2'-desoxiuridina;
 35 5-bromo-6-azido-2'-desoxiuridina;
 6-(dimetilamino)uridina-5'-monofosfato;
 40 5-fluoro-6-aminouridina-5'-monofosfato;
 5-bromo-6-aminouridina-5'-monofosfato;
 5-fluoro-6-azidouridina-5'-monofosfato;
 45 1'-hidroximetil-6-yodo-uridina-5'-monofosfato
 6-(dimetilamino)-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 50 5-fluoro-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-bromo-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-fluoro-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 55 5-cloro-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-cloro-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 60 5-metoxi-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-metoxi-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 5-metoxi-6-amino-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
 65 5-bromo-6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;

- 5-bromo-6-azido-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato;
- 5 5-fluoro-6-yodo-uridina-5'-monofosfato;
- 6-yodo-uridina-5'-acetato;
- 6-yodo-2'-desoxiuridina-5'-acetato, y
- 10 sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos en los que el profármaco se selecciona de un éster fenílico, un éster de alquilo C₈-C₂₄, un éster alcoximetílico, un carbamato y un éster de aminoácido, de cualquier grupo hidroxilo, tiol, amino o carboxilo disponible en el compuesto de fórmula I.
- 15 26. Una composición farmacéutica que comprende uno o más de un compuesto según la reivindicación 25 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo.
- 20 27. Uso de un compuesto seleccionado de un compuesto de fórmula I, tautómeros del mismo y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir malaria.

FIGURA 1

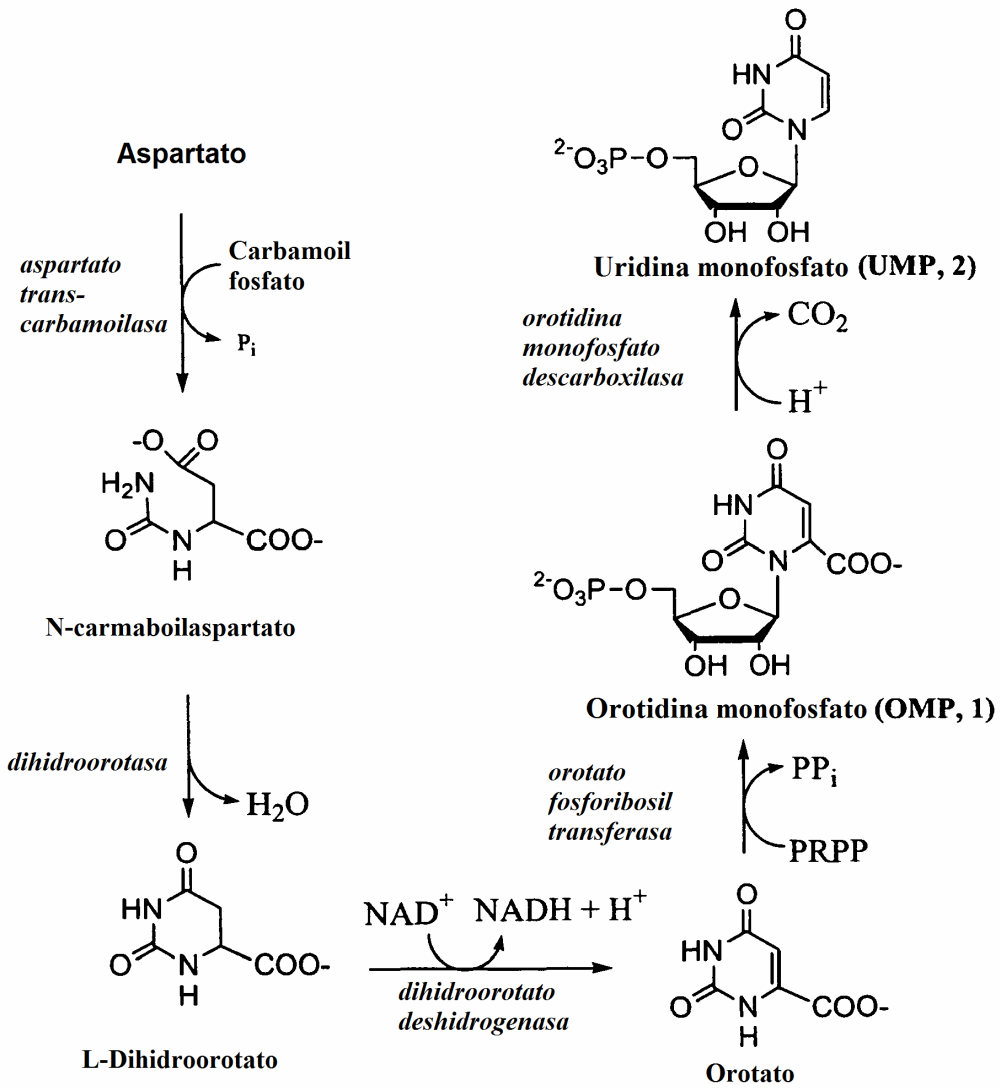
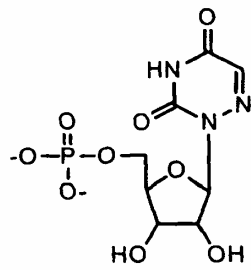
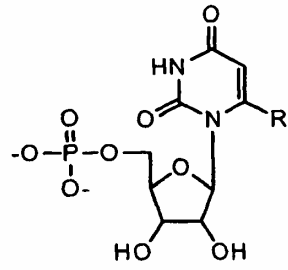


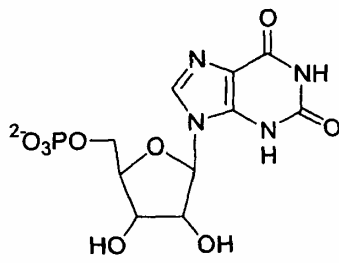
FIGURA 2



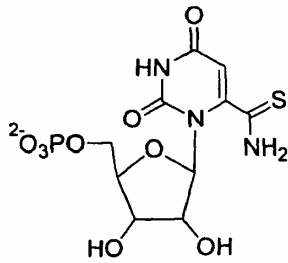
6-Aza-UMP



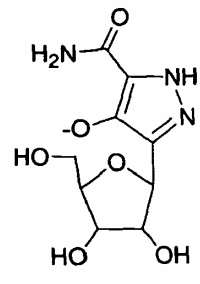
R = -OH, 6-OH-UMP o
BMP



XMP (12)



6-Tiocarboxamido UMP (13)



Pirazofurina (14)

FIGURA 3

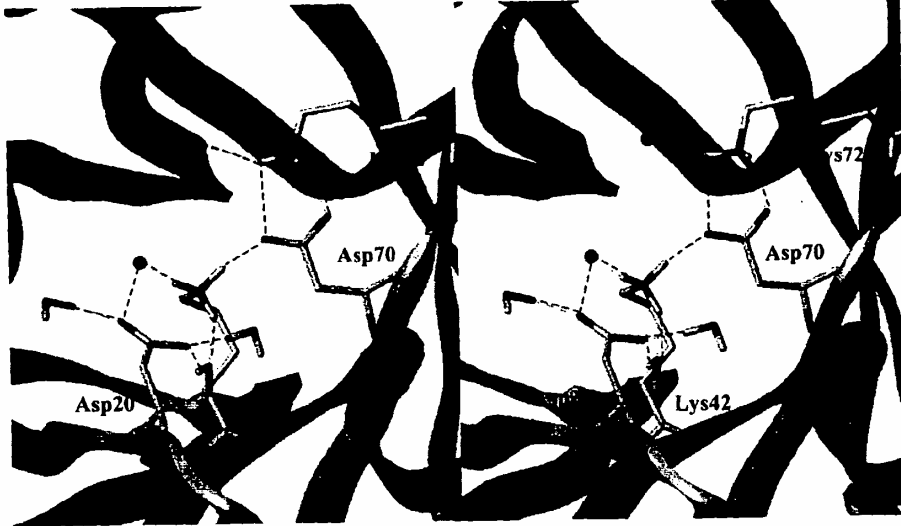
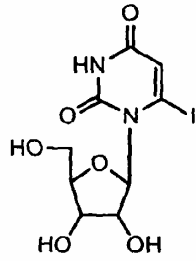


FIGURA 4



6-I-Uridina
(Compuesto II)

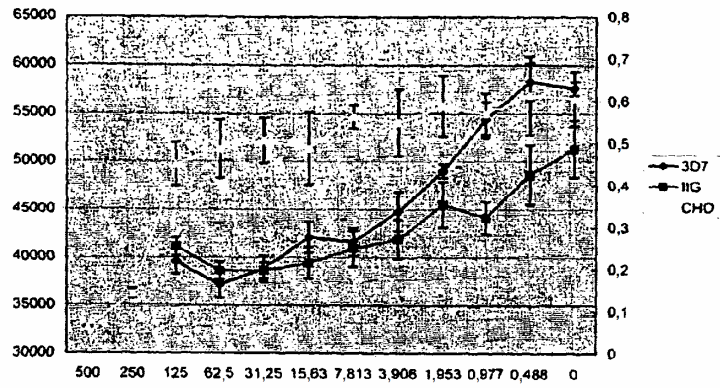
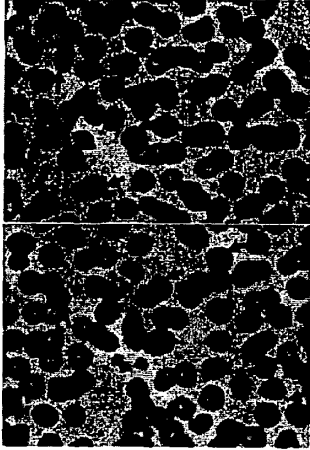
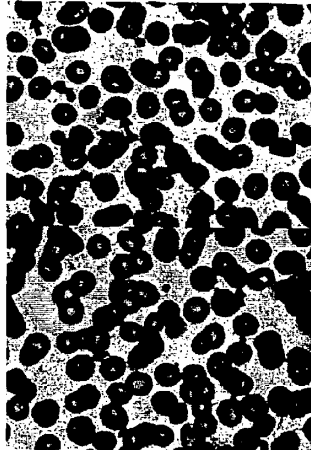


FIGURA 5

Controles (n=2)



Dosis = 0,6 mg/ratón
(n=3)



Dosis = 6 mg/ratón
(n=3)

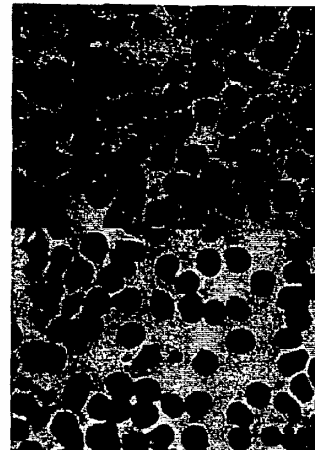
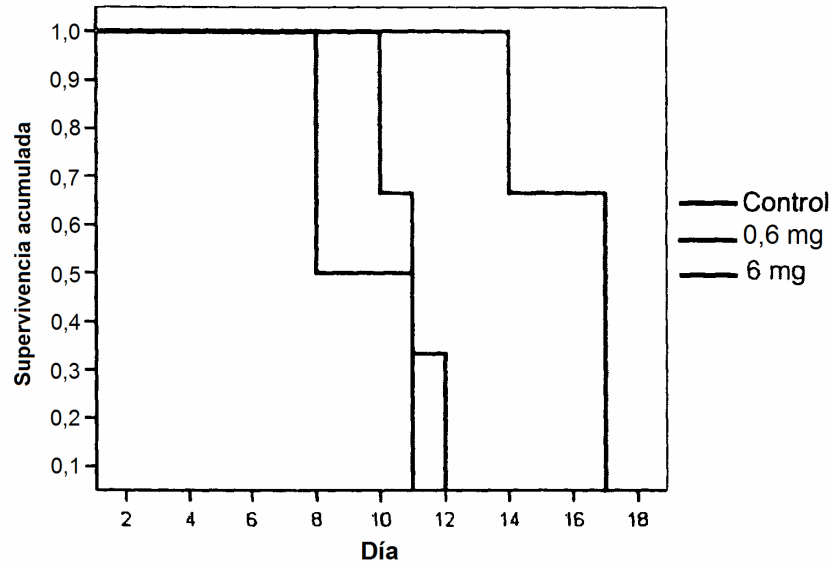


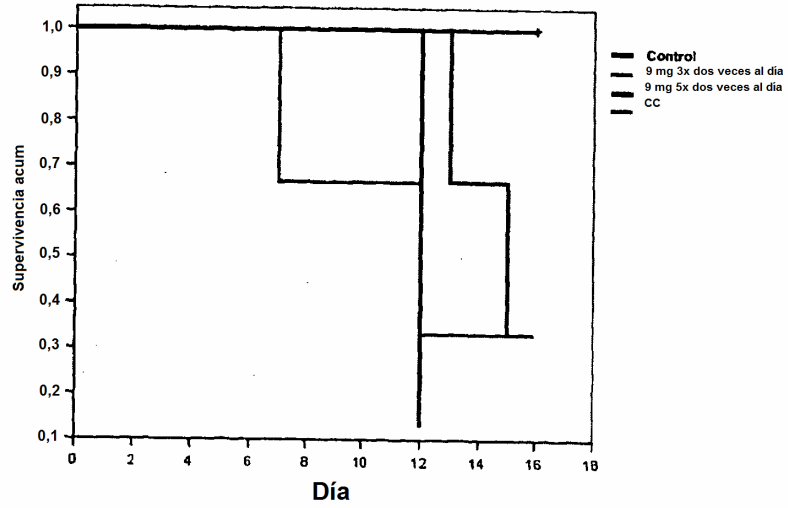
FIGURA 6



Por emparejamiento

estado	1,0		2,0		3,0	
	Chi al cuadrado	Sig.	Chi al cuadrado	Sig.	Chi al cuadrado	Sig.
Orden log (Mantel-Cox)						
1,0			,71	,39	4,26	,03
2,0	,71	,39			5,05	,02
3,0	4,26	,03	5,05	,02		

FIGURA 7



Comparaciones por emparejamiento

Estado	1,00		3,00		4,00		5,00	
	Chi al cuadrado	Sig.	Chi al cuadrado	Sig.	Chi al cuadrado	Sig.	Chi al cuadrado	Sig.
Orden log (Mantel-Cox)								
1,00			,020	,886	5,000	,025	5,000	,025
3,00	,020	,886			,297	,586	2,469	,116
4,00	5,000	,025	,297	,586			2,469	,116
5,00	5,000	,025	2,469	,116	2,469	,116		