

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 569**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06	(2006.01) C07H 19/14	(2006.01)
C07H 19/10	(2006.01) C07H 19/22	(2006.01)
C07H 19/16	(2006.01) C07H 19/23	(2006.01)
C07H 19/20	(2006.01) A61K 31/7056	(2006.01)
C07H 19/04	(2006.01) A61K 31/706	(2006.01)
C07H 19/044	(2006.01) A61K 31/7064	(2006.01)
C07H 19/048	(2006.01) A61P 31/14	(2006.01)
C07H 19/052	(2006.01)	
C07H 19/056	(2006.01)	
C07H 19/12	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2003** **E 03761744 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014** **EP 1523489**

54 Título: **Profármacos de nucleósidos modificados en 2' y 3' para el tratamiento de infecciones de Flaviviridae**

30 Prioridad:

28.06.2002 US 392350 P
28.06.2002 US 392351 P
28.04.2003 US 466194 P
14.05.2003 US 470949 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2014

73 Titular/es:

IDENIX PHARMACEUTICALS, INC. (25.0%)
320 Bent Street, Floor 4
Cambridge, MA 02141, US;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%);
UNIVERSITA DEGLI STUDI DI CAGLIARI (25.0%) y
L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II (25.0%)

72 Inventor/es:

SOMMADOSSI, JEAN-PIERRE;
LA COLLA, POALO;
STORER, RICHARD y
GOSSELIN, GILLES

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 469 569 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

Profármacos de nucleósidos modificados en 2' y 3' para el tratamiento de infecciones de Flaviviridae

Esta invención pertenece al área de la química farmacéutica, y es en particular, un nucleósido de pirimidina 2'-ramificado o un nucleósido de purina 2'-ramificado como se define en las reivindicaciones. La invención es también una composición farmacéutica que comprende el nucleósido, y el nucleósido para usar en un método para el tratamiento de una infección de Flaviviridae, tal como una infección por el virus de la hepatitis C.

Virus de flaviviridae

La familia de virus Flaviviridae comprende al menos tres géneros distintos: los pestivirus, que causan enfermedades en gatos y cerdos; flavivirus, que son la causa primaria de enfermedades tal como la fiebre del dengue y la fiebre amarilla; y hepacivirus, cuyo único miembro es el VHC. El género flavivirus incluye más de 68 miembros separados en grupos sobre la base de la relación serológica (Calisher et al., J. Gen. Virol., 1993, 70, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica (Fields Virology, editores: Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, Pensilvania, 1996, capítulo 31, 931-959). Los Flavivirus de preocupación global que están asociados con enfermedades humanas incluyen el virus de la fiebre hemorrágica del dengue (FHD), el virus de la fiebre amarilla, el síndrome de shock y el virus de la encefalitis japonesa (Halstead, S. B., Rev. Infect. Dis., 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., Science, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., New Eng. J. Med., 1988, 319, 641-643).

El género pestivirus incluye el virus de la diarrea vírica bovina (VDVB), el virus de la fiebre del cerdo clásica (VFCC, también llamada virus del cólera del cerdo) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) de las ovejas (Moennig, V. et al. Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Las infecciones por pestivirus del ganado (ganado, cerdos y ovejas) causan pérdidas económicas significativas a nivel mundial. BVDV causa la enfermedad de la mucosa en el ganado y es de importancia económica significativa para la industria del ganado (Meyers, G. y Thiel, H.-J., Advances in Virus Research, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al, Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Los pestivirus humanos no han sido tan extensivamente caracterizados como los pestivirus animales. Sin embargo, sondeos serológicos indican la exposición considerable de pestivirus en humanos.

Los pestivirus y hepacivirus son grupos de virus muy interrelacionados dentro de la familia de los Flaviviridae. Otros virus muy interrelacionados en esta familia incluyen los virus GB tipo A, agentes tipo virus GB tipo A, virusGB tipo B y virus GB tipo C (también llamados virus G de la hepatitis, HGV). El grupo de los hepacivirus (virus de la hepatitis C; VHC) consiste en un número de virus estrechamente relacionado pero genotípicamente distinguibles que infectan a los seres humanos. Hay aproximadamente 6 genotipos VHC y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre pestivirus y hepacivirus, combinado con la poca habilidad de los hepacivirus para crecer eficientemente en los cultivos celulares, el virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) se usa a menudo como un sustituto para estudiar el virus de VHC.

La organización genética de los pestivirus y hepacivirus es muy semejante. Estos virus de ARN trenzados positivos poseen un marco de lectura grande abierto único (ORF) que codifica todas las proteínas víricas necesarias para la replicación vírica. Estas proteínas son expresadas como una poliproteína que es co- y post-traslacionalmente procesada por proteinasas codificadas tanto por células como por virus para producir las proteínas víricas maduras. Las proteínas víricas responsables de la replicación del genoma ARN vírico están localizadas dentro de aproximadamente el terminal carboxi. Dos tercios del ORF son las llamadas proteínas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de la poliproteína de la porción proteica no estructural del ORF para los pestivirus y los hepacivirus es muy semejante. Para ambos, pestivirus y hepacivirus, las proteínas maduras no estructurales (NS), en orden secuencial a partir del terminal amino de la región de codificación de la proteína no estructural al terminal carboxi del ORF, consisten en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B.

Las proteínas NS de los pestivirus y hepacivirus comparten los dominios de secuencia que son característicos de las funciones de la proteína específica. Por ejemplo, las proteínas NS3 de los virus en ambos grupos poseen motivos de secuencia de aminoácidos característicos de las serinoproteinasas y de las helicasas (Gorbalenya et al. (1988) Nature 333:22; Bazan y Fletterick (1989) Virology 171:637-639; Gorbalenya et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17:3889-3897). Del mismo modo, las proteínas NS5B de pestivirus y hepacivirus tienen los motivos característicos de ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, E.V. y Dolja, V.V. (1993) Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 28:375-430).

Los roles y funciones actuales de las proteínas NS de pestivirus y hepacivirus en el ciclo de la vida de los virus son directamente análogos. En ambos casos, la serina proteinasa NS3 es responsable de todo el procesamiento proteolítico de precursores de poliproteína corriente abajo de su posición en el ORF (Wiskerchen y Collett (1991) Virology 184:341-350; Bartenschlager et al. (1993) J. Virol. 67:3835-3844; Eckart et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Comm. 192:399-406; Grakoui et al. (1993) J. Virol. 67:2832-2843; Grakoui et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10583-10587; Hijikata et al. (1993) J. Virol. 67:4665-4675; Tome et al. (1993) J. Virol. 67:4017-4026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager et al. (1994) J. Virol. 68:5045-5055; Failla et al. (1994) J. Virol. 68: 3753-3760; Lin et al. (1994) 68:8147-8157; Xu et al. (1997) J. Virol. 71:5312-5322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim et al. (1995)

Biochem. Biophys. Res. Comm. 215: 160-166; Jin y Peterson (1995) Arch. Biochem. Biophys., 323:47-53; Warrenner y Collett (1995) J. Virol. 69:1720-1726). Finalmente, las proteínas NS5B de pestivirus y hepacivirus tienen la actividad predicha de ARN polimerasas dirigida por ARN. (Behrens et al. (1996) EMBO J. 15:12-22; Lchmann et al.(1997) J. Virol. 71:8416-8428; Yuan et al.(1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 232:231-235; Hagedorn, documento de patente internacional PCT WO 97/12033; Zhong et al. (1998) J. Virol. 72:9365-9369).

Virus de la Hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa principal de la enfermedad crónica del hígado en todo el mundo. (Boyer, N. et al. J. Hepatol. 32:98-112, 2000). El VHC causa una infección vírica de crecimiento lento y es la mayor causa de cirrosis y de carcinoma hepatocelular (Di Besceglie, A. M. y Bacon, B. R., Scientific American, Octubre: 80-85, (1999); Boyer, N. et al. J. Hepatol. 32:98-112, 2000). Un estimado de 170 millones de personas están infectadas con VHC en todo el mundo. (Boyer, N. et al. J. Hepatol. 32:98-112, 2000). La cirrosis causada por la infección de hepatitis C crónica es responsable de 8.000-12.000 muertes por año en los Estados Unidos, y la infección por VHC es la principal indicación para el transplante de hígado.

Se sabe que VHC causa al menos el 80% de la hepatitis posttransfusión y una sustancial proporción de hepatitis aguda esporádica. La evidencia preliminar también implica a VHC en muchos casos de hepatitis "idiopática" crónica, cirrosis "criptogénica", y probablemente, el carcinoma hepatocelular no relacionado con otros virus de hepatitis, tal como el virus de la hepatitis B (VHB). Una pequeña proporción de personas sanas parecen ser portadores crónicos de VHC, variando con la geografía y otros factores epidemiológicos. Los números pueden superar sustancialmente los de VHB, aunque la información es aún preliminar; cuántas de estas personas tienen una enfermedad hepática crónica subclínica no está claro. (The Merck Manual, capítulo 69, página. 901, 16^{ava} edición, (1992)).

El VHC es un virus de sobre que contiene un genoma de ARN de sentido positivo de una sola hebra de aproximadamente 9,4 kb. El genoma vírico consiste de una región 5' no traducida (UTR), un largo marco de lectura abierto que codifica un precursor de poliproteína de aproximadamente 3011 aminoácidos, y un 3' UTR corto. El 5' UTR es la parte más altamente conservada del genoma de VHC y es importante para la iniciación y el control de la traducción de la poliproteína. La traducción del genoma de VHC se inicia por un mecanismo de tapa independiente conocido como la entrada del ribosoma interno. Este mecanismo implica la unión de los ribosomas a una secuencia de ARN conocida como el sitio de entrada interna del ribosoma (IRES). Se ha determinado recientemente que una estructura de pseudonudo de ARN es un elemento estructural esencial del IRES de VHC. Proteínas estructurales víricas incluyen una proteína de núcleo de nucleocápsido (C) y dos glicoproteínas de sobre, E1 y E2. El VHC también codifica dos proteinasas, una metaloproteína dependiente de cinc codificada por la región NS2-NS3 y una serina proteinasa codificada por la región NS3. Se requiere estas proteínas para la escisión de regiones específicas de la poliproteína precursora en péptidos maduros. La mitad carboxilica de la proteína no estructural 5, NS5B, contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN. La función de las proteínas no estructurales restantes, NS4A y NS4B, y la de NS5A (la mitad amino terminal de la proteína no estructural 5) siguen siendo desconocidas.

Un foco importante de investigación antivírica actual se dirige al desarrollo de mejores métodos de tratamiento de las infecciones crónicas de VHC en seres humanos (Di Besceglie, A. M. y Bacon, B. R., Scientific American, Octubre: 80-85, (1999)).

Tratamiento de la infección por VHC con interferón

Los interferones (IFNs) han estado disponibles comercialmente para el tratamiento de la hepatitis crónica durante casi una década. IFNs son glicoproteínas producidas por células inmunes en respuesta a una infección vírica. IFNs inhiben la replicación de un número de virus, incluyendo el VHC, y cuando se utilizan como el único tratamiento para la infección de la hepatitis C, el IFN puede en ciertos casos suprimir el ARN del VHC en el suero hasta niveles indetectables. Además, el IFN puede normalizar los niveles de amino transferasa del suero. Desafortunadamente, el efecto de IFN es temporal y se produce una respuesta sostenida en solo el 8%-9% de los pacientes crónicamente infectados con el VHC (Gary L. Davis. Gastroenterology 118:S104-S114, 2000). La mayoría de los pacientes, sin embargo, tienen dificultad para tolerar el tratamiento con interferón, que causa síntomas similares a la gripe severa, pérdida de peso, y falta de energía y vitalidad.

Un número de patentes describen el uso de terapias para los Flaviviridae, incluyendo VHC, basadas en el interferón. Por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos N° 5.980.884 de Blatt et al. describe métodos para el retratamiento de pacientes afectados por el VHC utilizando interferón de consenso. El documento de patente de Estados Unidos N° 5.942.223 de Bazer et al. describe una terapia anti-VHC usando interferón tau ovino o bovino. El documento de patente de Estados Unidos N° 5.928.636 de Alber et al. describe la terapia de combinación de interleucina-12 e interferón alfa para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo VHC. El documento de patente de Estados Unidos N° 5.849.696 de Chretien et al. describe el uso de timosinas, solas o en combinación con interferón, para el tratamiento de VHC. El documento de patente de Estados Unidos N° 5.830.455 de Valtueña et al. describe una terapia de combinación de VHC que emplea interferón y un limpiador de radicales libres. El documento de patente de Estados Unidos N° 5.738.845 de Imakawa describe el uso de proteínas de interferón tau humano para el tratamiento de VHC. Otros tratamientos basados en interferón para VHC se describen en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.676.942 de Testa et al., el documento de patente de Estados Unidos N° 5.372.808 de Blatt

et al., y el documento de patente de Estados Unidos N° 5.849.696. Un número de patentes también describen formas pegiladas de interferón, tal como, los documentos de patente de Estados Unidos N°s 5.747.646, 5.792.834 y 5.834.594 de Hoffmann-La Roche Inc; Publicación PCT de los documentos de patente internacional WO 99/32139 y WO 99/32140 para Enzon; el documento de patente internacional WO 95/13090 y los documentos de patente de Estados Unidos N°s. 5.738.846 y 5.711.944 de Schering; y el documento de patente de Estados Unidos N° 5.908.621 de Glue et al.

El interferón alfa-2a e interferón alfa-2b están aprobados actualmente como monoterapia para el tratamiento de VHC. ROFERON®-A (Roche) es la forma recombinante de interferón alfa-2a. PEGASYS® (Roche) es la forma pegilada (es decir, modificada con polietilenglicol) de interferón alfa-2a. INTRON®A (Schering Corporation) es la forma recombinante de interferón alfa-2b, y PEG-INTRON® (Schering Corporation) es la forma pegilada de interferón alfa-2b.

Otras formas de interferón alfa, así como de interferón beta, gamma, tau y omega están actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento de VHC. Por ejemplo, INFERGEN (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON de Human Genome Sciences, REBIF (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Omega Interferon de BioMedicine, Oral Interferon Alfa de Amarillo Biosciences, e interferón gamma, interferón tau, e interferón gamma-1b de InterMune están en desarrollo.

Ribavirina

La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de nucleósido antivírico sintético, no inductor de interferón, de amplio espectro vendido bajo el nombre comercial, Virazole (The Merck Index, 11ª edición, Editor: Budavari, S., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, página 1304, 1989). El documento de patente de Estados Unidos N° 3.798.209 y RE 29. 835 describen y reivindican a la ribavirina. La ribavirina es estructuralmente similar a la guanosina, y tiene actividad in vitro contra varios virus de ADN y ARN incluyendo los Flaviviridae (Gary L. Davis. Gastroenterology 118:S104-S114, 2000).

La ribavirina reduce los niveles séricos de la amino transferasa a niveles normales en el 40% de pacientes, pero no disminuye los niveles séricos de HVC-ARN (Gary L. Davis. Gastroenterology 118:S104-S114, 2000). Por lo tanto, la ribavirina sola no es eficaz para reducir los niveles víricos de ARN. Además, la ribavirina tiene una toxicidad significativa y se sabe que induce anemia.

La ribavirina no está aprobada como monoterapia contra el VHC. Se ha aprobado en combinación con el interferón alfa-2a o el interferón alfa-2b para el tratamiento del VHC.

Combinación de interferón y ribavirina

El actual estándar de tratamiento para la hepatitis C crónica es la terapia de combinación de un interferón alfa y la ribavirina. Se ha informado de que la combinación de interferón y ribavirina para el tratamiento de VHC es eficaz en el tratamiento de pacientes no tratados previamente con interferón (Battaglia, A.M. et al., Ann. Pharmacother. 34:487-494, 2000), así como para el tratamiento de pacientes cuando la enfermedad histológica está presente (Berenguer, M. et al. Antivir. Ther. 3 (Suppl. 3):125-136, 1998). Estudios han demostrado que más pacientes con hepatitis C responden a la terapia de combinación de interferón alfa pegilado/ribavirina que a la terapia de combinación con interferón alfa no pegilado. Sin embargo, al igual que con la monoterapia, efectos secundarios significativos se desarrollan durante la terapia de combinación, incluyendo hemólisis, síntomas parecidos a la gripe, anemia y fatiga. (Gary L. Davis. Gastroenterology 118:S104-S114, 2000).

Terapia de combinación con cápsulas de PEG-INTRON® (peginterferón alfa-2b) y REBETOL® (ribavirina, USP) está comercializado por Schering Corporation. REBETOL® (Schering Corporation) también ha sido aprobado en combinación con INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante, Schering Corporation). Roche PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado) y COPEGUS® (ribavirina) también están aprobados para el tratamiento del VHC. Las publicaciones PCT de patente internacional WO 99/59621, WO 00/37110, WO 01/81359, WO 02/32414 y WO 03/024461 para Schering Corporation describen el uso de la terapia de combinación del interferón alfa pegilado y la ribavirina para el tratamiento de VHC.

Las publicaciones PCT de patente internacional WO 99/15194, WO 99/64016, y WO 00/24355 para Hoffmann-La Roche Inc también describen el uso de la terapia de combinación del interferón alfa pegilado y la ribavirina para el tratamiento de VHC.

Métodos adicionales para tratar infecciones de Flaviviridae

El desarrollo de nuevos agentes antivíricos para las infecciones por Flaviviridae, especialmente la hepatitis C, está actualmente en curso. Se están desarrollando inhibidores específicos de enzimas derivadas de VHC tales como inhibidores de las proteasas, helicasas y polimerasas. Fármacos que inhiben otros pasos en la replicación de VHC también se encuentran en desarrollo, por ejemplo, fármacos que bloquean la producción de antígenos del VHC a partir del ARN (inhibidores IRES), fármacos que previenen el procesamiento normal de las proteínas del VHC (inhibidores de la glicosilación), fármacos que bloquean la entrada del VHC en las células (bloqueando su receptor) y

agentes citoprotectores no específicos que bloquean la lesión celular causada por la infección del virus. Además, se están también desarrollando enfoques moleculares para tratar la hepatitis C, por ejemplo se están investigando los ribozimas, que son enzimas que descomponen moléculas específicas del ARN vírico, y oligonucleótidos antisentido, que son pequeños segmentos complementarios de ADN que se unen al ARN vírico e inhiben la replicación vírica. Un número de tratamientos de VHC han sido revisados por Bymock et al. en *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11:2; 79-95 (2000) y De Francesco et al. en *Antiviral Research*, 58: 1-16, (2003).

Ejemplos de clases de medicamentos que se están desarrollando para el tratamiento de infecciones por Flaviviridae incluyen:

(1) Inhibidores de proteasas

Inhibidores de la proteasa NS3 basados en el sustrato (Attwood et al., *Antiviral peptide derivatives*, documento PCT de patente internacional WO 98/22496, 1998 Attwood et al., *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1999, 10, 259-273; Attwood et al., *Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents*, documento de patente alemana DE 19914474; Tung et al. *Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease*, documento PCT de patente internacional WO 98/17679), incluyendo alfacetoamidas e hidrazinouras, e inhibidores que terminan en un electrófilo tal como un ácido borónico o fosfonato (Linas-Brunet et al., *Hepatitis C inhibitor peptide analogues*, documento PCT de patente internacional WO 99/07734) están siendo investigados. También se están investigando inhibidores de la proteasa NS3 no basados en el sustrato tales como derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitro-benzamida (Sudo K. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, 643-647; Sudo K. et al. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1998, 9, 186), incluyendo RD3-4082 y RD3-4078, el primero sustituido en la amida con una cadena de 14 carbonos y el segundo procesando un grupo para-fenoxifenil también se están investigando. Sch 68631, una fenantrenoquinona, es un inhibidor de la proteasa del VHC (Chu M. et al., *Tetrahedron Letters* 37:7229-7232, 1996). En otro ejemplo de los mismos autores, Sch 351633, aislado del hongo *Penicillium griseofulvum*, fue identificado como un inhibidor de la proteasa (Chu M. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9:1949-1952). Potencia nanomolar contra la enzima de la proteasa NS3 del VHC se ha logrado mediante el diseño de inhibidores selectivos basados en la macromolécula eglin c. Eglin c, aislada de la sanguijuela, es un potente inhibidor de varias serina proteasas como *S. griseus* proteasas A y B, α -quimotripsina, quimasa y subtilisina. Qasim M.A. et al., *Biochemistry* 36:1598-1607, 1997.

Varias patentes de Estados Unidos describen inhibidores de proteasa para el tratamiento de VHC. Por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos N. 6.004.933 para Spruce et al. describe una clase de inhibidores de cisteína proteasas para inhibir la endopeptidasa VHC 2. El documento de patente de Estados Unidos N° 5.990.276 para Zhang et al. describe inhibidores sintéticos de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C. El inhibidor es una subsecuencia de un sustrato de la proteasas NS3 o un sustrato del cofactor NS4A. El uso de enzimas de restricción para tratar VHC se describen en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.538.865 de Reyes et al. Péptidos como inhibidores de la serina proteasa NS3 de VHC se describen en el documento de patente internacional WO 02/008251 para Corvas International, Inc, y los documentos de patente internacional WO 02/08187 y WO 02/008256 para Schering Corporation. Tripéptidos inhibidores de VHC se describen en los documentos de patente de Estados Unidos N° 6.534.523, 6.410.531, y 6.420.380 de Boehringer Ingelheim y el documento de patente internacional WO 02/060926 de Bristol Myers Squibb. Péptidos diarílicos como inhibidores de la serina proteasa NS3 de VHC se describen en el documento de patente internacional WO 02/48172 de Schering Corporation. Imidazoleidinonas como inhibidores de la serina proteasas NS3 de VHC se describen en los documentos de patente internacional WO 02/08198 de Schering Corporation y WO 02/48157 de Bristol Myers Squibb. Los documentos de patente internacional WO 98/17679 de Vertex Pharmaceuticals y WO 02/48116 de Bristol Myers Squibb también describen inhibidores de la proteasa de VHC.

(2) Derivados de tiazolidina que muestran una inhibición relevante en un ensayo de HPLC de fase inversa con una proteína de fusión NS3/4 y un sustrato NS5A/5B (Sudo K. et al., *Antiviral Research*, 1996, 32, 9-18), específicamente el compuesto RD-1-6250, que posee un resto cinamóilo fusionado sustituido con una cadena larga de alquilo, RD4 6205 y RD4 6193;

(3) Tiazolidinas and benzanilidas identificadas por Kakiuchi N. et al. *J. EBS Letters* 421, 217-220; Takeshita N. et al. *Analytical Biochemistry*, 1997, 247, 242-246;

(4) Una fenantrenoquinona que posee actividad contra la proteasa en un ensayo de SDS-PAGE y un ensayo de autoradiografía aislada del caldo de cultivo de fermentación de especies de *Streptomyces*, Sch 68631 (Chu M. et al., *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 7229-7232), y Sch 351633, aislado del hongo *Penicillium griseofulvum*, que demuestra actividad en un ensayo de proximidad de centelleo (Chu M. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952);

(5) Inhibidores de helicasa (por ejemplo Diana G.D. et al., *Compounds, compositions and methods for treatment of hepatitis C*, documento de patente de los Estados Unidos N° 5.633.358; Diana G.D. et al., *Piperidine derivatives, pharmaceutical compositions thereof and their use in the treatment of hepatitis C*, documento PCT de patente internacional WO 97/36554);

(6) Inhibidores de la polimerasa de nucleótidos y la gliotoxina (Ferrari R. et al. Journal of Virology, 1999, 73, 1649-1654), y el producto natural cerulenina (Lohmann V. et al., Virology, 1998, 249, 108-118);

(7) Oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido (S-ODN) complementarios a la secuencia que se extiende en la región no codificante 5' (NCR) del virus (Alt M. et al., Hepatology, 1995, 22, 707-717), o los nucleótidos 326-348 que comprenden el extremo 3' del NCR y los nucleótidos 371-388 situados en la región de codificación de núcleo del ARN del VCH (Alt M. et al., Archives of Virology, 1997, 142, 589-599; Galderisi U. et al., Journal of Cellular Physiology, 1999, 181, 251-257);

(8) Los inhibidores de la traducción dependiente de IRES (Ikeda N et al., Agent for the prevention and treatment of hepatitis C, documento de patente japonesa JP-08268890; Kai Y. et al. Prevention and treatment of viral diseases, documento de patente japonesa JP-10101591);

(9) Las ribozimas, tales como ribozimas resistentes a nucleasas (Maccjak, D. J. et al., Hepatology 1999, 30, resumen 995) y los descritos en la patente de Estados Unidos N° 6.043.077 de Barber et al., y los documentos de patente de Estados Unidos N°s 5.869.253 y 5.610.054 de Draper et al.; y

(10) Los análogos de nucleósidos también se han desarrollado para el tratamiento de infecciones por Flaviviridae.

Idenix Pharmaceuticals describe el uso de nucleósidos ramificados en el tratamiento de flavivirus (incluyendo VHC) y pestivirus en los documentos de patente internacional N°. WO 01/90121 y WO 01/92282. Específicamente un método para el tratamiento de la infección por hepatitis C (y flavivirus y pestivirus) en seres humanos y otros animales hospedantes se describe en las publicaciones de Idenix que incluye la administración de una cantidad eficaz de un nucleósido biológicamente activo 1', 2', 3' o 4'-ramificado β -D o β -L o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrado bien solo o en combinación con otro agente antivírico, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otras solicitudes de patente que describen el uso de ciertos análogos de nucleósidos para tratar el virus de la hepatitis C incluyen: el documento PCT/CA00/01316 (documento de patente internacional WO 01/32153; presentado el 3 de noviembre de 2000) y el documento PCT/CA01/00197 (documento de patente internacional WO 01/60315; presentado el 19 de febrero de 2001) presentado por BioChem Pharma, Inc. (actualmente Shire Biochem, Inc.); el documento PCT/US02/01531 (documento de patente internacional WO 02/057425; presentado el 18 de Enero de 2002) y el documento PCT/US02/03086 (documento de patente internacional WO 02/057287; presentado el 18 de Enero de 2002) presentado por Merck & Co., Inc., PCT/EP01/09633 (documento de patente internacional WO 02/18404; publicado el 21 de Agosto de 2001) presentado por Roche, y el documento PCT del documento de patente internacional N° WO 01/79246 (presentado el 13 de Abril de 2001), documento de patente internacional WO 02/32920 (presentado el 18 de Octubre de 2001) y WO 02/48165 para Pharmasset, Ltd.

La publicación PCT del documento de patente internacional WO 99/43691 para la universidad de Emory, titulada "2'-Fluoronucleosides" describe el uso de ciertos 2'-fluoronucleósidos para el tratamiento de VHC.

Eldrup et al. (Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16^{ava} International Conference on Antiviral Research (April 27 de 2003, Savannah, Ga.)) describen la relación estructura actividad de nucleósidos 2'-modificados para la inhibición del VHC.

Bhat et al. (sesión oral V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae, 2003 (sesión oral V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16th International Conference on Antiviral Research (April 27 de 2003, Savannah, Ga.); p A75) describe la síntesis y propiedades farmacocinéticas de análogos de nucleósidos como posibles inhibidores de la replicación de ARN del VHC. Los autores informan que nucleósidos 2' modificados demuestran potente actividad inhibidora en ensayos de replicones basados en células.

Olsen et al. (sesión oral V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16th International Conference on Antiviral Research (April 27, 2003, Savannah, Ga.) página A76) también describieron el efecto de nucleósidos modificados en 2' sobre la replicación del ARN del VHC.

(11) Otros compuestos misceláneos que incluyen 1-amino-alkilciclohexanos (documento de patente de Estados Unidos N° 6.034.134 de Gold et al.), alquilípidos (documento de patente de Estados Unidos N° 5.922.757 de Chojkier et al.), vitamina E y otros antioxidantes (documento de patente de Estados Unidos N° 5.922.757 de Chojkier et al.), escualeno, amantadina, ácidos biliares (documento de patente de Estados Unidos N° 5.846.964 de Ozeki et al.), N-(ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico, (documento de patente de Estados Unidos N° 5.830.905 para Diana et al.), bencenodicarboxamidas (documento de patente de Estados Unidos N° 5.633.388 para Diana et al.), derivados del ácido poliadenílico (documento de patente de Estados Unidos No. 5.496.546 para Wang et al.), 2',3'-didesoxiinosina (documento de patente de Estados Unidos N° 5.026.687 para Yarchoan et al.), bencimidazoles (documento de patente de Estados Unidos N° 5.891.874 para Colacino et al.), extractos de planta (documento de patente de Estados Unidos N° 5.837.257 para Tsai et al., documento de patente de Estados Unidos N° 5.725.859 para Omer et al., y documento de patente de Estados Unidos N° 6.056.961), y piperidenos (documento de patente de Estados Unidos N° 5.830.905 para Diana et al.).

(12) Otros compuestos actualmente en desarrollo preclínico o clínico para el tratamiento del virus de la hepatitis C incluyen: Interleucina-10 de Schering-Plough, IP-501 de Interneuron, merimebodib (VX-497) de Vertex, AMANTADINE® (Symmetrel) de Endo Labs Solvay, HEPTAZYME® de RPI, IDN-6556 de Idun Pharma., XTL-002 de XTL., HCV/MF59 de Chiron, CIVACIR® (inmunoglobulina para hepatitis C) de NABI, LEVOVIRIN® de ICN/Ribapharm, VIRAMIDINE® de ICN/Ribapharm, ZADAXIN® (timosina alfa-1) de Sci Clone, timosina más interferón pegilado de Sci Clone, CEPLENE® (dihidrocloreuro de histamina) de Maxim, VX 950 / LY 570310 de Vertex/Eli Lilly, ISIS 14803 de Isis Pharmaceutical/Elan, IDN-6556 de Idun Pharmaceuticals, Inc., JTK 003 de AKROS Pharma, BILN-2061 de Boehringer Ingelheim, CellCept (micofenolato de mofetilo) de Roche, T67, un inhibidor de β -tubulina, de Tularik, una vacuna terapéutica dirigida a E2 de Innogenetics, FK788 de Fujisawa Healthcare, Inc., IdB 1016 (Siliphos, fitosoma de silibina-fosfatidilcolina oral), inhibidores de la replicación de ARN (VP50406) de ViroPharma/Wyeth, vacuna terapéutica de Intercell, de Epimmune/Genencor, inhibidor IRES de Anadys, ANA 245 y ANA 246 de Anadys, inmunoterapia (Therapore) de Avant, inhibidor de proteasa de Corvas/Schering, inhibidor de helicasa de Vertex, inhibidor de fusión de Trimeris, terapia de células T de CellExSys, inhibidor de polimerasa de Biocryst, química del ARN dirigida de PTC Therapeutics, Dication por Immtech, Int., inhibidor de proteasa de Agouron, inhibidor de proteasa de Chiron/Medivir, terapia antisentido de AVI BioPharma, terapia antisentido de Hybridon, hemopurificador de Aethlon Medical, vacuna terapéutica por Merix, inhibidor de proteasa de Bristol-Myers Squibb/Axys, Chron-VacC, una vacuna terapéutica, de Tripep, UT 231B de United Therapeutics, inhibidores de proteasa, helicasa y polimerasa de Genelabs Technologies, inhibidores de IRES de Immusol, R803 de Rigel Pharmaceuticals, INFERGEN® (interferon alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON® (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON® de Human Genome Sciences, REBIF® (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Omega Interferon de BioMedicine, Oral Interferon Alpha de Amarillo Biosciences, interferón gamma, interferón tau, e interferón gamma-1b de InterMune.

Profármacos de nucleósidos se han descrito anteriormente para el tratamiento de otras formas de hepatitis. Los documentos de patente internacional WO 00/09531 (presentado el 10 de Agosto de 1999) y WO 01/96353 (presentado el 15 de Junio de 2001) para Idenix Pharmaceuticals describen 2'-desoxi- β -L-nucleósidos y sus 3'-profármacos para el tratamiento de VHB. El documento de patente de Estados Unidos N° 4.957.924 para Beauchamp describe varios ésteres terapéuticos del aciclovir.

A la luz del hecho de que la infección por el VHC ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo, y tiene efectos trágicos sobre el paciente infectado, sigue habiendo una gran necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos eficaces para tratar la hepatitis C que tengan baja toxicidad para el anfitrión.

Además, dada la amenaza creciente de otras infecciones por Flaviviridae, sigue habiendo una fuerte necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos eficaces para tratar la hepatitis C que tengan baja toxicidad para el anfitrión.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un compuesto, y una composición y su uso en un método para el tratamiento de un anfitrión infectado con el virus de la hepatitis C.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un compuesto, y una composición y su uso en un método para el tratamiento de un anfitrión infectado con pestivirus, flavivirus o hepacivirus.

Esta invención se refiere a nucleósidos 2'-ramificados, composiciones de los mismos, y los nucleósidos para uso en los métodos como se define en las reivindicaciones.

3'-profármacos de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L, o sus sales farmacéuticamente aceptables o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos son útiles en la prevención y tratamiento de las infecciones por Flaviviridae y otras condiciones relacionadas tales como condiciones con anticuerpos anti-Flaviviridae positivos y condiciones Flaviviridae positivas, inflamación crónica del hígado causada por el VHC, cirrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis crónica persistente, y fatiga. Estos compuestos o formulaciones también se pueden usar profilácticamente para prevenir o retrasar el progreso de la enfermedad clínica en individuos que son anti-Flaviviridae-anticuerpos o Flaviviridae-antígeno positivos o que han sido expuestos a un Flaviviridae.

Se describe también un método para el tratamiento de una infección vírica por Flaviviridae en un anfitrión, incluyendo un ser humano, que incluye administrar una cantidad eficaz de un 3'-profármaco de un nucleósido biológicamente activo 2'-ramificado β -D o β -L o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrado bien solo o en combinación o alternancia con otro agente anti-Flaviviridae, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término 3'-profármaco, como se usa en este documento, se refiere a nucleósidos 1', 2', 3' o 4'-ramificados β -D o β -L que tienen un resto biológicamente escindible en la posición 3', incluyendo, pero no limitado a un acilo, y en una realización, un aminoácido natural o sintético D o L, preferiblemente un L-aminoácido.

Salas farmacéuticamente aceptables incluyen el tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, y α -glicerofosfato, formiato, fumarato, propionato, glicolato, lactato,

piruvato, oxalato, maleato, salicilato, sulfato, sulfonato, nitrato, bicarbonato, bromhidrato, hidrobromuro, hidroyoduro, carbonato, y sales del ácido fosfórico. Una realización particularmente preferida es la sal de mono o diclorhidrato.

Los nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L pueden tener restos biológicamente escindibles en las posiciones 5'. Los restos preferidos son ésteres de D o L aminoácidos naturales o sintéticos, including D o L-valilo, aunque preferiblemente ésteres de L-aminoácidos, tales como L-valilo, y ésteres de alquilo incluyendo acetilo.

Los nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L pueden tener restos biológicamente escindibles en las posiciones 3' y/o 5'. Los restos preferidos son ésteres de D o L aminoácidos naturales o sintéticos, tales como valilo, aunque preferiblemente ésteres de L-aminoácidos, tales como L-valilo, y ésteres de alquilo incluyendo acetilo. Por lo tanto, esta invención específicamente incluye ésteres de 3'-L-aminoácidos y ésteres de 3',5'-L-diaminoácidos de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco original tiene opcionalmente un EC_{50} menor de 15 micromolar, e incluso más preferiblemente menor de 10 micromolar; ésteres de 3'-(alquilo o arilo) o ésteres de 3',5'-L-di(alquilo o arilo) de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L con cualquier base de purina o pirimidina deseada, en donde el fármaco original tiene opcionalmente un EC_{50} menor de 10 o 15 micromolar; y profármacos de 3',5'-diésteres de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L en donde (i) el 3' éster es un éster de un D o L aminoácido natural o sintético y el 5'-éster es un éster alquilo o arilo; (ii) ambos ésteres son ésteres de D o L-aminoácidos naturales o sintéticos; (iii) ambos ésteres son independientemente ésteres de alquilo o arilo; y (iv) el 3'-éster es independientemente un éster de alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster de un D o L aminoácido natural o sintético, en donde el fármaco original tiene opcionalmente un EC_{50} menor de 10 o 15 micromolar.

Ejemplos de profármacos son el 3'-L-valina éster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 3'-L-valina éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3'-L-valina éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3'-L-valina éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3'-L-valina éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina; 3'-L-valina éster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 3'-acetil éster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 3'-acetil éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3'-acetil éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3'-acetil éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3'-acetil éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; y 3'-ésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 3'-ésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el 3' éster es un éster de aminoácido; o (ii) el 3' éster es un éster alquilo o arilo.

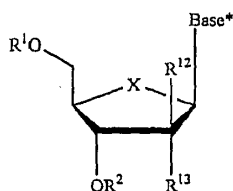
Ejemplos adicionales de profármacos son el 3',5'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-citidina (dival-2',6-diMe-L-dC); 3',5'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3',5'-L-divalina éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3',5'-L-divalina éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3',5'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; 3',5'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 3',5'-diacetil éster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 3',5'-diacetil éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 3',5'-diacetil éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 3',5'-diacetil éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 3',5'-diacetil éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluoro-citidina; y 3',5'-diésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 3',5'-diésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el 3' éster es un éster de aminoácido y el 5'-éster es un éster alquilo o arilo; (ii) ambos ésteres son ésteres de aminoácidos; (iii) ambos ésteres son independientemente ésteres de alquilo o arilo; o (iv) el 3' éster es un éster alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster de aminoácido.

Éster de aminoácido y el 3'-éster es un éster alquilo o arilo; (ii) ambos ésteres son ésteres de aminoácidos; (iii) ambos ésteres son independientemente ésteres de alquilo o arilo; y (iv) el 2'-éster es independientemente un éster de alquilo o arilo y el 3'-éster es un éster de aminoácido, en donde el fármaco original tiene opcionalmente un EC_{50} menor de 10 o 15 micromolar. Adicionalmente, 2',3',5'-triésteres de nucleósidos 1', 2', 3' o 4'-ramificados β -D o β -L en donde (i) todos los tres ésteres son ésteres de aminoácidos; (ii) todos los tres ésteres son independientemente ésteres de alquilo o arilo; (iii) el 2' éster es un éster de aminoácido, el 3' éster es un éster de aminoácido y el 5'-éster es un éster de alquilo o arilo; (iv) el 2' éster es un éster de aminoácido, el 3' éster es un éster alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster alquilo o arilo; (v) el 2' éster es un éster alquilo o arilo, el 3' éster es un éster alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster de aminoácido; (vi) el 2' éster es un éster alquilo o arilo, el 3' éster es un éster de aminoácido y el 5'-éster es un éster de aminoácido; (vii) el 2' éster es un éster alquilo o arilo, el 3' éster es un éster de aminoácido y el 5'-éster es un éster alquilo o arilo; y (viii) el 2' éster es un éster de aminoácido, el 3' éster es un éster alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster de aminoácido; en donde el fármaco original tiene opcionalmente un EC_{50} menor de 10 or 15 micromolar.

Ejemplos de profármacos que caen dentro de la invención incluyen el 2',3'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-citidina (dival-2',6-diMe-L-dC); 2',3'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3'-L-divalina éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3'-L-divalina éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina; 2',3'-L-divalina éster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 2',3'-diacetil éster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 2',3'-diacetil éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3'-diacetil éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3'-diacetil éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3'-diacetil éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina; y 2',3'-diésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) o 2',3'-diésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) el 2' éster es un éster de aminoácido y el 3'-éster es un éster alquilo o arilo; (ii) ambos ésteres son ésteres de aminoácidos; (iii) ambos ésteres son independientemente ésteres de alquilo o arilo; o (iv) el 2' éster es un éster alquilo o arilo y el 3'-éster es un éster de aminoácido.

Ejemplos adicionales de profármacos que caen dentro de la invención incluyen el 2',3',5'-L-trivalina éster de β -D-2',6-dimetil-citidina (trival-2',6-diMe-L-dC); 2',3',5'-L-trivalina éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3',5'-L-trivalina éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3',5'-L-trivalina éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3',5'-L-trivalina éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina; 2',3',5'-L-trivalina éster de β -D-2',6-dimetil-uridina; 2',3',5'-triacetil éster de β -D-2',6-dimetil-citidina; 2',3',5'-triacetil éster de β -D-2',6-dimetil-timidina; 2',3',5'-triacetil éster de β -D-2',8-dimetil-adenosina; 2',3',5'-triacetil éster de β -D-2',8-dimetil-guanosina; 2',3',5'-triacetil éster de β -D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina; y 2',3',5'-triésteres de β -D-2',6-dimetil-(citidina, 5-fluorocitidina, uridina o timidina) y 2',3',5'-triésteres de β -D-2',8-dimetil-(guanosina, adenosina o inosina) en donde (i) todos los tres ésteres son ésteres de aminoácidos; (ii) todos los tres ésteres son independientemente ésteres de alquilo o arilo; (iii) el 2' éster es un éster de aminoácido, el 3' éster es un éster de aminoácido y el 5'-éster es un éster alquilo o arilo; (iv) el 2' éster es un éster de aminoácido, el 3' éster es un éster alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster alquilo o arilo; (v) el 2' éster es un éster de alquilo o arilo, el 3' éster es un éster de alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster de aminoácido; (vi) el 2' éster es un éster de alquilo o arilo, el 3' éster es un éster de aminoácido y el 5'-éster es un éster de aminoácido; (vii) el 2' éster es un éster de alquilo o arilo, el 3' éster es un éster de aminoácido y el 5'-éster es un éster de alquilo o arilo; y (viii) el 2' éster es un éster de aminoácido, el 3' éster es un éster de alquilo o arilo y el 5'-éster es un éster de aminoácido.

En una realización principal, se proporciona un compuesto de fórmula (IX), o una sal farmacéuticamente aceptable, o una forma tautómera o polimórfica del mismo, así como el compuesto para uso en un método para el tratamiento de un anfitrión infectado con un Flaviviridae que comprende administrar una cantidad de tratamiento eficaz del compuesto de fórmula (IX):



(IX)

o una sal farmacéuticamente aceptable, o una forma tautómera o polimórfica del mismo, en donde:

R^1 y R^2 son independientemente H; fosfato; alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica; acilo; CO-alquilo; CO-arilo; CO-alcoxialquilo; CO-ariloxialquilo; arilo CO-sustituido; éster de sulfonato; bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; alquilsulfonilo; arilsulfonilo; aralquilsulfonilo; un lípido; un aminoácido; un hidrato de carbono; un péptido; o un colesterol;

X es O;

la Base* es una base de purina o pirimidina;

R^{12} es $C(Y^3)_3$;

Y^3 es H; y

R^{13} es flúor.

En otra realización preferida, R^2 es un resto de aminoácido, y es preferiblemente L-valinilo.

Los nucleósidos β -D- y β -L- de esta invención pueden inhibir la actividad de polimerasa de los Flaviviridae. Los nucleósidos se pueden cribar por su capacidad para inhibir la actividad de polimerasa de Flaviviridae in vitro según los métodos de detección establecidos más particularmente en este documento. Puede fácilmente determinarse el espectro de actividad evaluando el compuesto en las pruebas descritas en este documento o con otra prueba confirmatoria.

En una realización la eficacia del compuesto anti-Flaviviridae se mide según la concentración del compuesto necesaria para reducir el número de placas del virus in vitro, según los métodos establecidos más particularmente en este documento, en un 50% (o sea, el EC_{50} del compuesto). En realizaciones preferidas el compuesto original del profármaco muestra un EC_{50} menor de 25, 15, 10, 5, o 1 micromolar. En realizaciones preferidas el compuesto muestra un EC_{50} menor de 15 o 10 micromolar, cuando se mide según el ensayo de la polimerasa descrito en Ferrari et al., Jnl. of Vir., 73:1649-1654, 1999; Ishii et al., Hepatology, 29:1227-1235, 1999; Lohmann et al., Jnl. of Bio. Chem., 274:10807-10815, 1999; o Yamashita et al., Jnl. of Bio. Chem., 273:15479-15486, 1998.

En otra realización, se proporciona una terapia de combinación y/or alternancia. En la terapia de combinación, se administra una dosis eficaz de dos o más agentes, mientras que durante la terapia de alternancia se administra una dosis eficaz de cada agente serialmente. Las dosis dependerán de las velocidades de absorción, inactivación, y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Es de señalar que los valores de la dosis también variarán con la gravedad de la condición a aliviar. Ha de entenderse además que para

cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

La invención proporciona combinaciones de al menos dos de los profármacos descritos en el presente documento. La invención proporciona además al menos uno de los descritos 3'-profármacos en combinación o alternancia con un segundo nucleósido que muestra actividad contra un Flaviviridae, incluyendo pero no limitado a un fármaco matriz de cualquiera de los profármacos definidos en este documento, es decir, β -D-2',6-dimetil-citidina, β -D-2',6-dimetil-timidina, β -D-2',8-dimetil-adenosina, β -D-2',8-dimetil-guanosina, β -D-2',6-dimetil-5-fluorocitidina y/o β -D-2',6-dimetil-uridina. Alternativamente, los 3'-profármacos pueden administrarse en combinación o alternancia con otros agentes anti-Flaviviridae que muestren un EC₅₀ menor de 10 o 15 micromolar, o sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos no limitativos de agentes antivíricos que pueden usarse en combinación con los compuestos descritos en este documento incluyen: (1) un interferón y/o la ribavirina; (2) inhibidores de la proteasa NS3 basados en el sustrato; (3) inhibidores no basados en el sustrato; (4) derivados de la tiazolidina; (5) tiazolidinas y benzanilidas; (6) una fenantrenequinona; (7) inhibidores de NS3; (8) inhibidores de la helicasa de VHC; (9) inhibidores de la polimerasa, incluyendo inhibidores de la ARN-polimerasa dependiente de ARN; (10) oligodesoxinucleótidos antisentido; (11) inhibidores de la traducción dependiente de IRES; (12) ribozimas resistentes a la nucleasa; y (13) otros compuestos que muestren actividad contra un flaviviridae. La invención incluye además la administración del profármaco en combinación o alternancia con un modulador inmune u otro modificador farmacéuticamente activo de replicación vírica, incluyendo un material biológico tal como una proteína, péptido, oligonucleótido, o gamma globulina, incluyendo pero no limitado al interferón, interleucina, o un oligonucleótido antisentido a los genes que expresan o regulan la replicación de Flaviviridae.

El profármaco puede administrarse en combinación o alternancia con un modulador inmune u otro modificador farmacéuticamente activo de la replicación vírica, incluyendo un material biológico tal como una proteína, péptido, oligonucleótido, o gamma globulina, incluyendo pero no limitado al interferón, interleucina, o un oligonucleótido antisentido a los genes que expresan o regulan la replicación de Flaviviridae.

En particular, la presente invención proporciona lo siguiente:

(a) composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una infección de Flaviviridae en un anfitrión que comprende un compuesto de fórmula (IX), o su sal farmacéuticamente aceptable, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

(b) composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una infección de Flaviviridae en un anfitrión que comprende un compuesto de fórmula (IX), o su sal farmacéuticamente aceptable, con uno o más de otros agentes antivíricos eficaces, opcionalmente con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

(c) un compuesto de fórmula (IX), o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para su uso en métodos para el tratamiento de una infección de Flaviviridae en un anfitrión.

(d) un compuesto de fórmula (IX), o su sal farmacéuticamente aceptable, con uno o más de otros agentes antivíricos eficaces, opcionalmente con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para su uso en métodos para el tratamiento de una infección de Flaviviridae en un anfitrión.

En una realización alternativa, el compuesto de nucleósido matriz de cualquiera de los 3'-profármacos (es decir, los nucleósidos sin los restos 3'-escindibles) se proporcionala para su uso en métodos para el tratamiento de una infección de Flaviviridae y en particular una infección de hepatitis C.

La Figura 1 proporciona la estructura de varios nucleósidos, en particular FIAU y ribavirina.

La Figura 2 proporciona un ejemplo no limitativo de los pasos involucrados en la esterificación del nucleósido 1', 2', 3' o 4'-ramificado β -D o β -L para obtener un 2'-profármaco (no según la invención). El mismo procedimiento general puede usarse para obtener el 3'-profármaco mediante la protección selectiva de los 2' y 5'- grupos hidroxilo o la protección de los grupos 2', 3' y 5'-hidroxilo y la desprotección selectiva del grupo 3'-hidroxilo.

La Figura 3 proporciona un ejemplo no limitativo de los pasos involucrados en la esterificación del nucleósido 1', 2', 3' o 4'-ramificado β -D o β -L para obtener un 2'-profármaco (no según la invención).

La Figura 4 proporciona un ejemplo no limitativo de los pasos involucrados en la esterificación del nucleósido 1', 2', 3' o 4'-ramificado β -D o β -L para obtener un 2',3'-profármaco (no según la invención).

La invención como se describe en este documento es un compuesto, una composición, y el compuesto para uso en un método para el tratamiento de una infección de Flaviviridae en seres humanos y otros animales anfitriones. El método incluye la administración de una cantidad eficaz para el tratamiento anti-Flaviviridae de un compuesto como

se define en las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de esta invención o bien poseen actividad antivírica (es decir, anti-VHC), o son metabolizados a un compuesto que muestra dicha actividad. El VHC es un miembro de la familia Flaviviridae. El VHC se ha colocado en un nuevo género monotípico, los hepacivirus. Por lo tanto, en una realización, el Flaviviridae es el VHC. En una realización alternativa, el Flaviviridae es un flavivirus o pestivirus.

Los 3'-profármacos de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L son derivados de acilo de un alcohol alfa secundario o terciario a un carbono secundario o terciario. Debido al impedimento estérico de estos profármacos comparado con los 5'-profármacos, derivados de acilo de un alcohol primario, estos profármacos modulan diferencialmente las propiedades biológicas de la molécula in vivo. Se ha descubierto que los 3'-profármacos de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L pueden proporcionar un fármaco con un aumento de la semivida y un perfil farmacocinético mejorado.

El 3'-profármaco en una realización preferida es un grupo acilo escindible, y más particularmente, un resto de aminoácido, preparado a partir de cualquier aminoácido de origen natural o sintético α , β y o δ , incluyendo pero no limitado a, la glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En una realización preferida, el aminoácido está en la configuración L. Alternativamente, el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroilo, β -lisinilo, β -argininilo, β -histidinilo, β -alanilo, β -valinilo, β -leucinilo, β -isoleucinilo, β -prolinilo, β -fenilalaninilo, β -triptofanilo, β -metioninilo, β -glicinilo, β -serinilo, β -treoninilo, β -cisteinilo, β -tirosinilo, β -asparaginilo, β -glutaminilo, β -aspartoilo, β -glutaroilo, β -lisinilo, β -argininilo o β -histidinilo. En una realización específica, el resto es un éster de la valina. Un compuesto particularmente preferido es el 3'-valina éster de 2',6-dimetil-ribocitidina.

La biodisponibilidad oral de los nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L como base neutra y la sal de HCl es baja en los roedores y los primates no humanos. Se ha descubierto que existe una competencia significativa del nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L con otros nucleósidos o análogos de nucleósidos para la absorción, o transporte, desde el tracto gastrointestinal y una competencia de otros nucleósidos o análogos de nucleósidos para la absorción con los nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad oral y reducir el potencial para la interacción fármaco-fármaco, se obtuvieron 3'-profármacos de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L con una biodisponibilidad oral mayor que la molécula original y con un efecto reducido sobre la biodisponibilidad de otros nucleósidos o análogos de nucleósido usados en combinación.

Los 3' y/o 5'-mono o divalina ésteres de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L tienen una biodisponibilidad oral mayor que la molécula original de nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L y una interacción reducida con otros nucleósidos o análogos de nucleósidos cuando se usan en combinación comparado con los nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L.

El 3' y/o 5'-mono o divalina éster de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L se puede convertir en la molécula original de nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L a través de la desesterificación en la mucosa gastrointestinal, la sangre o el hígado. El 3' y/o 5'-mono o divalina éster de nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L puede ser transportado activamente desde el lumen gastrointestinal después de la administración oral al torrente sanguíneo por una función de transporte de aminoácidos en la mucosa del tracto gastrointestinal. Esto explica el aumento de la biodisponibilidad oral comparado con el nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L original que es transportado primariamente por una función de transporte de nucleósidos. También hay reducción de la competencia para la captación del 3' y/o 5'-mono o divalina éster de los nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L con otros nucleósidos o análogos de nucleósido que son transportados por la función de transporte de los nucleósidos y no la función de transporte de los aminoácidos. Como la desesterificación parcial del divalina éster de los nucleósidos 2'-ramificados β -D o β -L se produce antes de completar la absorción, el monoéster continúa siendo absorbido usando la función de transporte de aminoácidos. Por lo tanto, el resultado deseado de una mejor absorción, o biodisponibilidad, y de competencia reducida con otros nucleósidos o análogos de nucleósido para la absorción en el torrente sanguíneo se puede mantener.

En resumen, la presente invención incluye las siguientes características:

(a) un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, como se describe en este documento, y sus sales farmacéuticamente aceptables y sus composiciones farmacéuticamente aceptables;

(b) un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, como se describe en este documento, y sus sales farmacéuticamente aceptables y sus composiciones farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o profilaxis de una infección de Flaviviridae, especialmente en individuos diagnosticados con una infección de Flaviviridae o que están en riesgo de ser infectados con la hepatitis C;

(c) un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, o sus sales y composiciones farmacéuticamente aceptables como se describe en este documento sustancialmente sin los enantiómeros opuestos del nucleósido descrito, o sustancialmente aislado de otras entidades químicas;

(d) procedimientos para la preparación de un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, como se describe en más detalle a continuación;

(e) formulaciones farmacéuticas que comprenden un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

5 (f) formulaciones farmacéuticas que comprenden un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con uno o más de otros agentes anti-VHC eficaces, opcionalmente en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

10 (g) formulaciones farmacéuticas que comprenden un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con la molécula original de un nucleósido diferente 1', 2', 3' o 4'-ramificado β -D o β -L, opcionalmente en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

(h) un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, su sal o composición farmacéuticamente aceptable para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de un anfitrión infectado por Flaviviridae;

15 (i) un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, su sal o composición farmacéuticamente aceptable en combinación y/o alternancia con uno o más agentes anti-VHC eficaces para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de un anfitrión infectado por Flaviviridae;

(j) un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-ramificado β -D o β -L, o su sal o composición farmacéuticamente aceptable junto con la molécula original de un nucleósido diferente 1', 2', 3' o 4'-ramificado β -D o β -L, para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de un anfitrión infectado por Flaviviridae;

20 (k) un 3'-profármaco de β -D-2'-metilcitidina, o su sal o composición farmacéuticamente aceptable para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de un anfitrión infectado por Flaviviridae;

(l) un 3'-valilo o acetil éster, de β -D-2'-metilcitidina, o su sal o composición farmacéuticamente aceptable para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de un anfitrión infectado por Flaviviridae;

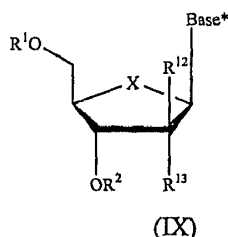
Flaviviridae incluidos dentro del alcance de esta invención se discuten generalmente en Fields Virology, editores: Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, Pensilvania, 1996, capítulo 31.

25 En una realización particular de la invención, el Flaviviridae es el VHC. En una realización alternativa de la invención, el Flaviviridae es un flavivirus o pestivirus. Flavivirus específicos incluyen, sin limitación: Absettarov, Alfuy, Apoi, Aroa, Bagaza, Banzi, Bouboui, Bussuquara, Cacipacore, Carey Island, del murciélago de Dakar, Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3, Dengue 4, Edge Hill, del murciélago de Entebbe, Gadgets Gully, Hanzalová, Hypr, TRHI, Ilheus, meningoencefalitis del pavo de Israel, encefalitis japonesa, Jugra, Jutiapa, Kadam, Karshi, Kedougou, Kokobera, Koutango, Kumlinge, Kunjin, enfermedad del bosque de Kyasanur, Langat, enfermo de Louping, Meaban, Modoc, leucoencefalitis de Montana miótica, encefalitis del valle de Murray, Naranjal, Negishi, Ntaya, la fiebre hemorrágica de Omsk, murciélago de Phnom-Penh, Powassan, Rio Bravo, Rocio, Royal Farm, la encefalitis rusa de primavera-verano, Saboya, encefalitis de St. Louis, Sal Vieja, San Perlita, Saumarez Reef, Sepik, Sokuluk, Spondweni, Stratford, Tembusu, Tyuleny, Uganda S, Usutu, Wesselsbron, del Nilo occidental, Yaounde, de la fiebre amarilla, y Zika.

Los pestivirus incluidos dentro del alcance de esta invención se describen generalmente en in Fields Virology, editores: Fields, B. N., Knipe, D. M., y Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, Pensilvania, Capítulo 33, 1996. Pestivirus específicos, incluyen sin limitación: virus de la diarrea vírico bobina "VDVB"), el virus de la peste porcina clásica (virus de "PPC," también llamado virus del cólera porcino), y el virus de la enfermedad de la frontera ("BDV").

1. Compuestos activos

En una realización principal, se proporcionará un compuesto de fórmula (IX) o una sal farmacéuticamente aceptable, o una forma tautómera, o polimorfa del mismo, así como el compuesto para uso en un método para el tratamiento de un anfitrión infectado con un Flaviviridae que comprende administrar una cantidad de tratamiento eficaz del compuesto de fórmula (IX):



o una sal farmacéuticamente aceptable o una forma tautómera o polimorfa del mismo, en donde:

R^1 , R^2 , Y^3 y X son como se define en las reivindicaciones.

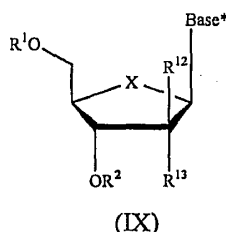
la Base* es una base de purina o pirimidina;

R^{12} es $C(Y^3)_3$ y

R^{13} es flúor;

5 X is O.

En una realización principal, se proporciona un compuesto de fórmula (IX) o una sal farmacéuticamente aceptable, o una forma tautómera, o polimorfa del mismo, así como el compuesto para uso en un método para el tratamiento de un anfitrión infectado con un Flaviviridae que comprende administrar una cantidad de tratamiento eficaz del compuesto de fórmula (IX):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una forma tautómera o polimorfa del mismo, en donde:

R^1 y R^2 son independientemente H; fosfato; alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica; acilo; CO-alquilo; CO-arilo; CO-alcoxialquilo; CO-ariloxialquilo; arilo CO-sustituido; éster de sulfonato; bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; alquilsulfonilo; arilsulfonilo; aralquilsulfonilo; un lípido; un aminoácido; un hidrato de carbono; un péptido; o colesterol;

X es O;

la Base* es una base de purina o pirimidina;

R^{12} es $C(Y^3)_3$;

Y^3 es H; y

R^{13} es flúor.

En una subrealización, R^1 y R^2 son H.

II. Estereoquímica

Se aprecia que los nucleósidos de la presente invención tienen varios centros quirales y pueden existir como y ser aislados como formas ópticamente activas y en forma racémica. Algunos compuestos pueden exhibir polimorfismo. Debe entenderse que la presente invención abarca cualquier forma racémica, ópticamente activa, diastereomérica, polimórfica, o estereoisomérica, o sus mezclas, de un compuesto de la invención, que posea las propiedades útiles descritas en este documento. Siendo bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas (por ejemplo, por resolución de la forma racémica con técnicas de recristalización, por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, por síntesis quiral, o por separación cromatográfica usando una fase estacionaria quiral).

En particular, ya que los carbonos 1' y 4' del nucleósido son quirales, sus sustituyentes diferentes del hidrógeno (la base y los grupos CHOR, respectivamente) pueden ser o cis (en el mismo lado) o trans (en lados opuestos) con respecto al sistema de anillo del azúcar. Los cuatro isómeros ópticos por lo tanto están representados por las siguientes configuraciones (cuando se orienta el resto de azúcar en un plano horizontal tal que el átomo de oxígeno está en la parte de atrás): cis (con ambos grupos "arriba", lo que corresponde a la configuración de β -D nucleósidos de origen natural), cis (con ambos grupos "abajo", que es una configuración β -L que no ocurre naturalmente), trans (con el C2' sustituyente "arriba" y el C4' sustituyente "abajo"), y trans (con el C2' sustituyente "abajo" y el C4' sustituyente "arriba"). Los "D-nucleósidos" son cis nucleósidos en una configuración natural y los "L-nucleósidos" son cis nucleósidos en la configuración que no ocurre naturalmente.

Del mismo modo, la mayoría de los aminoácidos son quirales (designados como L o D, en donde el enantiómero L está en la configuración de origen natural) y pueden existir como enantiómeros separados.

Ejemplos de métodos para obtener materiales ópticamente activos son conocidos en la técnica, e incluyen al menos lo siguiente.

- i) separación física de cristales - una técnica mediante la cual los cristales macroscópicos de los enantiómeros individuales se separan manualmente. Esta técnica se puede usar si existen cristales de los enantiómeros separados, es decir, el material es un conglomerado, y los cristales se distinguen visualmente;
- ii) cristalización simultánea - una técnica mediante la cual los enantiómeros individuales se cristalizan por separado a partir de una solución del racemato, posible solo si este es un conglomerado en estado sólido;
- iii) resolución enzimática - una técnica mediante la cual la separación completa o parcial de un racemato se consigue en virtud de diferentes velocidades de reacción de los enantiómeros con una enzima;
- iv) síntesis asimétrica enzimática - una técnica sintética mediante la cual al menos un paso de la síntesis usa una reacción enzimática para obtener un precursor sintético enantioméricamente puro o enriquecido del enantiómero deseado;
- v) síntesis asimétrica química - una técnica sintética mediante la cual el enantiómero deseado se sintetiza a partir de un precursor aquiral bajo condiciones que producen asimetría (es decir, quiralidad) en el producto, que puede conseguirse usando catalizadores quirales o auxiliares quirales;
- vi) separaciones diastereoméricas - una técnica mediante la cual se hace reaccionar un compuesto racémico con un reactivo enantioméricamente puro (el auxiliar quiral) que convierte los enantiómeros individuales a diastereómeros. Los diastereómeros obtenidos se separan entonces por cromatografía o cristalización en virtud de sus diferencias estructurales ahora más distintas y el auxiliar quiral se elimina más tarde para obtener el enantiómero deseado;
- vii) transformaciones asimétricas de primer y segundo orden - una técnica mediante la cual los diastereómeros a partir del racemato se equilibran para producir una preponderancia en solución del diastereómero a partir del enantiómero deseado o donde la cristalización preferencial del diastereómero a partir del enantiómero deseado perturba el equilibrio de tal manera que, finalmente, en principio todo el material se convierte en el diastereómero cristalino a partir del enantiómero deseado. El enantiómero deseado se libera entonces desde el diastereómero;
- viii) resoluciones cinéticas - esta técnica se refiere al logro de la resolución parcial o completa de un racemato (o de una resolución adicional de un compuesto parcialmente resuelto) en virtud de las velocidades de reacción desiguales de los enantiómeros con un reactivo o catalizador quiral, no racémico bajo condiciones cinéticas;
- ix) síntesis enantioespecífica a partir de precursores no racémicos - una técnica sintética mediante la cual el enantiómero deseado se obtiene a partir de materiales de partida no quirales y donde la integridad estereoquímica no está o está sólo mínimamente comprometida en el curso de la síntesis;
- x) cromatografía líquida quiral - una técnica mediante la cual los enantiómeros de un racemato se separan en una fase móvil líquida en virtud de sus diferentes interacciones con una fase estacionaria. La fase estacionaria puede estar hecha de material quiral o la fase móvil puede contener un material quiral adicional para provocar las diferentes interacciones;
- xi) cromatografía de gases quiral - una técnica mediante la cual el racemato se volatiliza y los enantiómeros se separan en virtud de sus diferentes interacciones en la fase móvil gaseosa con una columna que contiene una fase adsorbente quiral no racémica fija;
- xii) extracción con disolventes quirales - una técnica mediante la cual los enantiómeros se separan en virtud de la solubilidad preferencial de un enantiómero en un disolvente quiral específico;
- xiii) transporte a través de membranas quirales - una técnica mediante la cual un racemato se pone en contacto con una barrera de membrana fina. La barrera típicamente separa dos fluidos miscibles, uno que contiene el racemato, y una fuerza direccional tal como una diferencial de concentración o presión causa el transporte preferencial a través de la barrera de la membrana. La separación se produce como resultado de la naturaleza no racémica quiral de la membrana que permite que solamente un enantiómero del racemato pase a su través.

III. Definiciones

El término "alquilo", como se usa en este documento, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal, ramificado, o cíclico, primario, secundario, o terciario de normalmente C₁ a C₁₀, y específicamente incluye el grupo metilo, CF₃, CCl₃, CFCl₂, CF₂Cl, etilo, CH₂CF₃, CF₂CF₃, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye tanto grupos alquilo sustituidos como no sustituidos, y en particular incluye grupos alquilo halogenados, e incluso más particularmente grupos alquilo fluorados. Ejemplos no limitativos de restos con los que el grupo alquilo puede estar sustituido se seleccionan del grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, ya estén desprotegidos, o

protegidos según sea necesario, como es conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, que se incorpora aquí como referencia.

5 El término "alquilo inferior", como se usa en este documento, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal, ramificado, C₁ a C₄, o si es apropiado, un grupo alquilo cíclico (por ejemplo, ciclopropilo), incluyendo tanto restos sustituidos como no sustituidos.

10 El término "alquilamino" o "arilamino" se refiere a un grupo amino que tiene uno o dos sustituyentes de alquilo o arilo, respectivamente. A menos que se indique específicamente otra cosa en esta solicitud, cuando el alquilo es un resto adecuado, se prefiere alquilo inferior. De manera similar, cuando el alquilo o alquilo inferior es un resto adecuado, se prefiere alquilo no sustituido o alquilo inferior no sustituido.

El término "protegido" tal como se usa en el presente documento y a menos que se defina de otro modo se refiere a un grupo que se añade a un oxígeno, nitrógeno, o un átomo de fósforo para prevenir su reacción adicional o para otros propósitos. Una amplia variedad de grupos protectores de nitrógeno y oxígeno son conocidos para aquellos versados en la técnica de la síntesis orgánica.

15 El término "arilo", como se usa en este documento, y a menos que se especifique de otro modo, se refiere a un resto fenilo, bifenilo, o naftilo, y preferiblemente fenilo. El término incluye tanto a restos sustituido como no sustituidos. El grupo arilo puede estar sustituido con cualquier resto descrito, que incluye, pero no está limitado a, uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en halógeno (fluor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, protegidos, o no
20 protegidos, según sea necesario, como es conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

El término "alcarilo" o "alquilarilo" se refiere a un grupo alquilo con un sustituyente arilo. El término aralquilo o arilalquilo se refiere a un grupo arilo con un sustituyente alquilo.

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

25 El término base de "purina" o "pirimidina" incluye, pero no se limita a, adenina, N⁶-alquilpurinas, N⁶-acilpurinas (en donde acilo es C(O)(alquilo, arilo, alquilarilo, o arilalquilo), N⁶-bencilpurina, N⁶-halopurina, N⁶-vinilpurina, N⁶-acetilpurina, N⁶-acilpurina, N⁶-hidroxialquilpurina, N⁶-alquilaminopurina, N⁶-tioalquilpurina, N²-alquilpurinas, N²-alquil-6-tiopurinas, timina, citosina, 5-fluorocitosina, 5-metilcitosina, 6-azapirimidina, que incluye 6-azacitosina, 2- y/o 4-mercaptopirimidina, uracilo, 5-halouracilo, que incluye 5-fluorouracilo, C⁵-alquilpirimidinas, C⁵-bencilpirimidinas, C⁵-halopirimidinas, C⁵-vinilpirimidina, C⁵-acetilpirimidina, C⁵-acilpirimidina, C⁵-hidroxialquilpurina, C⁵-amidopirimidina, C⁵-cianopirimidina, C⁵-yodopirimidina, C₆-yodo-pirimidina, C⁵-Br-vinilpirimidina, C₆-Br-vinilpirimidina, C⁵-nitropirimidina, C⁵-amino-pirimidina, N²-alquilpurinas, N²-alquil-6-tiopurinas, 5-azacitidinilo, 5-azauracilo, triazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo, y pirazolopirimidinilo. Las bases de purina incluyen, pero no están limitadas a, guanina, adenina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, y 6-cloropurina. Grupos oxígeno y nitrógeno funcionales sobre la base pueden ser protegidos cuando sea necesario o deseado. Grupos protectores adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo, y t-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo y grupos acilo tal como acetilo y propionilo, metanosulfonilo, y p-toluensulfonilo.

40 El término "acilo" o "éster O-ligado" se refiere a un grupo de la fórmula C(O)R', en donde R' es una cadena de alquilo lineal, ramificada, o cíclica (incluyendo alquilo inferior), aminoácido, arilo incluyendo fenilo, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxialquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo; o alquilo sustituido (que incluye alquilo inferior), arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido con cloro, bromo, flúor, yodo, alquilo C₁ a C₄ alcoxi C₁ a C₄, ésteres de sulfonato tal como alquil o aralquilsulfonilo incluyendo metanosulfonilo, el éster de mono, di o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxialquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden de manera óptima un grupo fenilo. En particular, los grupos acilo incluyen acetilo, trifluoroacetilo, metilacetilo, ciclopropilacetilo, ciclopropilcarboxi, propionilo, butirilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, neoheptanoilo, fenilacetilo, 2-acetoxi-2-fenilacetilo, difenilacetilo, α-metoxi-α-trifluorometil-fenilacetilo, bromoacetilo, 2-nitrobencenoacetilo, 4-clorobencenoacetilo, 2-cloro-2,2-difenilacetilo, 2-cloro-2-fenilacetilo, trimetilacetilo, clorodifluoroacetilo, perfluoroacetilo, fluoroacetilo, bromodifluoroacetilo, metoxiacetilo, 2-tiofenoacetilo, clorosulfonilacetilo, 3-metoxifenilacetilo, fenoxiacetilo, terc-butilacetilo, tricloroacetilo, monocloroacetilo, dicloroacetilo, 7H-dodecafluoro-heptanoilo, perfluoroheptanoilo, 7H-dodeca-fluoroheptanoilo, 7-clorododecafluoro-heptanoilo, 7H-dodecafluoroheptanoilo, 7-clorododecafluoroheptanoilo, nonafluoro-3,6-dioxo-heptanoilo, nonafluoro-3,6-dioxoheptanoilo, perfluoroheptanoilo, metoxibenzoilo, metil 3-amino-5-feniltiofeno-2-carboxilo, 3,6-dicloro-2-metoxibenzoilo, 4-(1,1,2,2-tetrafluoro-etoxi)-benzoilo, 2-bromo-propionilo, omega-aminocaprililo, decanoilo, n-pentadecanoilo, estearilo, 3-ciclopentilpropionilo, 1-benceno-carboxilo, O-acetilmandelilo, pivaloilacetilo, 1-adamantano-carboxilo, ciclohexano-carboxilo, 2,6-piridinodicarboxilo, ciclopropano-carboxilo, ciclobutano-carboxilo, perfluorociclohexil-carboxilo, 4-metilbenzoilo, clorometil isoxazolil carbonilo, perfluorociclohexil carboxilo, crotonilo, 1-metil-1H-indazol-3-carbonilo, 2-propenilo, isovalerilo, 1-pirrolidinocarbonilo, y 4-fenilbenzoilo. Cuando se

utiliza el término acilo, significa que es una divulgación específica e independiente de acetilo, trifluoroacetilo, metilacetilo, ciclopropilacetilo, propionilo, butirilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, neoheptanoilo, fenilacetilo, difenilacetilo, α -trifluorometil-fenilacetilo, bromoacetilo, 4-cloro-bencenoacetilo, 2-cloro-2,2-difenilacetilo, 2-cloro-2-fenilacetilo, trimetilacetilo, clorodifluoroacetilo, perfluoroacetilo, fluoroacetilo, bromodifluoroacetilo, 2-tiofenoacetilo, 5 terc-butilacetilo, tricloroacetilo, monocloro-acetilo, dicloroacetilo, metoxibenzoilo, 2-bromo-propionilo, decanoilo, n-pentadecanoilo, estearilo, 3-ciclopentil-propionilo, 1-benceno-carboxilo, pivaloilacetilo, 1-adamantano-carboxilo, ciclohexanocarboxilo, 2,6-piridinodicarboxilo, ciclopropano-carboxilo, ciclobutanocarboxilo, 4-metilbenzoilo, crotonilo, 1-metil-1H-indazol-3-carbonilo, 2-propenilo, isovalerilo, y 4-fenilbenzoilo.

El término "aminoácido" incluye aminoácidos α , β y δ naturales y sintéticos, e incluye, pero no está limitado a, 10 aminoácidos encontrados en las proteínas, es decir, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina, e histidina. En una realización preferida, el aminoácido está en la configuración L. Alternativamente, el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, 15 metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroilo, lisinilo, argininilo, histidinilo, 3-alanilo, β -valinilo, β -leucinilo, β -isoleucinilo, β -prolinilo, β -fenilalaninilo, β -triptofanilo, β -metioninilo, β -glicinilo, β -serinilo, β -treoninilo, β -cisteinilo, β -tirosinilo, β -asparaginilo, β -glutaminilo, β -aspartoilo, β -glutaroilo β -lisinilo, β -argininilo o β -histidinilo. Las tablas 1-24 muestran ejemplos de las especies dentro de la presente invención. Cuando se utiliza el término aminoácido, se considera que es una divulgación independiente y específica de cada uno de los ésteres de α , β y δ glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, 20 fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina en la configuración D y L.

Como se usa en este documento, el término "sustancialmente libre de" o "sustancialmente en ausencia de" se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos 85 o 90% en peso, preferiblemente 95%, 98%, 99% o 100% 25 en peso, del enantiómero designado de ese nucleósido. En una realización preferida, en los métodos y compuestos de esta invención, los compuestos están sustancialmente libres de enantiómeros.

Del mismo modo, el término "aislado" se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% en peso, del nucleósido, el resto comprende otras especies químicas o enantiómeros.

El término "anfitrión", como se usa en este documento, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el que el virus puede replicarse, incluyendo líneas celulares y animales, y preferiblemente un ser humano. 30 Alternativamente, el anfitrión puede estar llevando una parte del genoma vírico Flaviviridae, cuya replicación o función puede ser alterada por los compuestos de la presente invención. El término anfitrión se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma Flaviviridae y animales, en particular, primates (incluyendo chimpancés) y seres humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el anfitrión es un paciente humano. Las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, sin embargo, están claramente anticipadas por la presente invención (tal como en chimpancés). 35

El término "sal o profármaco farmacéuticamente aceptable" se utiliza en todo el documento para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable (tal como un éster, éster de fosfato, sal de un éster o un grupo relacinado) de un compuesto de nucleósido, que, tras la administración a un paciente, proporciona el compuesto nucleósido. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos orgánicos o inorgánicos 40 farmacéuticamente aceptables. Sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, y metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros ácidos numerosos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Profármacos farmacéuticamente aceptables se refiere a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo se hidroliza o se oxida en el anfitrión para para formar el compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente 45 lábiles en un resto funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que pueden ser oxidados, reducidos, aminados, desaminados, hidroxilados, deshdroxilados hidrolizados, deshdroxilados, alquilados, desalquilados, acilados, desacilados, fosforilados, y desfosforilados para producir el compuesto activo. Los compuestos de esta invención poseen actividad antivírica contra los Flaviviridae, o se metabolizan a un compuesto que muestra dicha actividad.

50 **IV. Profármacos y derivados**

El compuesto activo se puede administrar como cualquier sal o profármaco que tras la administración al receptor, es capaz de proporcionar directa o indirectamente el compuesto original, o que muestra actividad por sí mismo. Los ejemplos no limitantes son las sales farmacéuticamente aceptables (denominadas alternativamente como "sales fisiológicamente aceptables"), y un compuesto que ha sido alquilado, acilado, o modificado de otro modo en la 55 posición 5', o en la base de purina o pirimidina (un tipo de "profármaco farmacéuticamente aceptable"). Además, las modificaciones pueden afectar a la actividad biológica del compuesto, en algunos casos incrementando la actividad sobre el compuesto original. Esto puede evaluarse fácilmente mediante la preparación de la sal o profármaco y control de su actividad antivírica de acuerdo con los métodos descritos en este documento, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

A. Sales farmacéuticamente aceptables

En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas no tóxicas estables, la administración del compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable puede ser apropiado. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácidos orgánicos formadas por adición del

- 5 ácido, que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorato, α -cetoglutarato, α -glicerofosfato, formiato, fumarato, propionato, glicolato, lactato, piruvato, oxalato, maleato, y salicilato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, incluyendo, sulfato, nitrato, bicarbonato, sales de carbonato, bromhidrato y ácido fosfórico. En una realización preferida, la sal es una sal mono o diclorhidrato.
- 10 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado produciendo un anión fisiológicamente aceptable. Sales de metales alcalinos (por ejemplo, de sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo de calcio) o de ácidos carboxílicos también se puede hacer. En una realización, la sal es una sal de clorhidrato del compuesto. En otra realización, la sal farmacéuticamente
- 15 aceptable es una sal de diclorhidrato.

B. Formulaciones de profármacos de nucleótidos

Los nucleósidos descritos en el presente documento se pueden administrar como un profármaco de nucleótido para aumentar la actividad; biodisponibilidad, estabilidad o de otro modo alterar las propiedades del nucleósido. Se conoce un número de ligandos de profármacos de nucleótido. En general, la alquilación, acilación u otra

- 20 modificación lipófila del mono-, di- o trifosfato del nucleósido reduce la polaridad y permite el paso a las células. Ejemplos de grupos sustituyentes que pueden reemplazar uno o más hidrógenos en el resto fosfato son alquilo, arilo, esteroides, carbohidratos, incluyendo azúcares, 1,2-diacilglicerol y alcoholes. Muchos se describen en R. Jones y N. Bischoferger, Antiviral Research, 1995, 27:1-17. Cualquiera de estos puede usarse en combinación con los nucleósidos descritos para conseguir un efecto deseado.
- 25 En una realización alternativa, el nucleósido se proporciona como un fosfonato o un derivado SATE.

El nucleósido activo también se puede proporcionar como un lípido de 3' y/o 5'-fosfoéster o un lípido de 3' y/o 5'-éter. Los ejemplos no limitativos que se describen incluyen las siguientes referencias: Kucera, L.S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.K., D.L.W., y C. Piantadosi. 1990. "Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation." AIDS Res. Hum. Retro Viruses. 6: 491-501;

- 30 Piantadosi, C., J. Marasco C.J., S.L. Morris-Natschke, K.L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surles, K.S. Ishaq, L.S. Kucera, N. Iyer, C.A. Wallen, S. Piantadosi, y E.J. Modest. 1991. "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity." J. Med. Chem. 34:1408.1414; Hosteller, K.Y., D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M. T. van Wijk, y H. van den Bosch. 1992, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3,-deoxythymine." Antimicrob. Agents Chemother. 36:2025.2029; Hosettler, K.Y., L.M. Stuhmiller, H.B. Lenting, H. van den Bosch, y D.D. Richman, 1990. "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymine and other antiviral nucleosides." J. Biol. Chem. 265:6112.6117.
- 35

Ejemplos no limitantes de patentes de los Estados Unidos que describen sustituyentes lipófilos adecuados que pueden incorporarse covalentemente en el nucleósido, preferentemente en las posiciones 3' y/o 5'-OH de las preparaciones de nucleósido o preparaciones lipófilas, incluyen los documentos de patente de Estados Unidos N°s. 5.149.794 (Setiembre 22, 1992, Yatvin et al.); 5.194.654 (Marzo 16, 1993, Hostettler et al.); 5.223.263 (Junio 29, 1993, Hostettler et al.); 5.256.641 (Octubre 26, 1993, Yatvin et al.); 5.411.947 (Mayo 2, 1995, Hostettler et al.); 5.463.092 (Octubre 31, 1995, Hostettler et al.); 5.543.389 (Agosto 6, 1996, Yatvin et al.); 5.543.390 (Agosto 6, 1996, Yatvin et al.); 5.543.391 (Agosto 6, 1996, Yatvin et al.); y 5.554.728 (Setiembre 10, 1996; Basava et al.). Solicitudes

- 40 de patentes extranjeras que describen sustituyentes lipófilos que se pueden unir a los nucleósidos de la presente invención, o preparaciones lipófilas, incluyen los documentos de patente internacional WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, de patente europea EP 0 350 287, EP 93917054.4, y patente internacional WO 91/19721.
- 45

Se proporcionan también ésteres de arilo, especialmente ésteres de fenilo. Ejemplos no limitativos se describen en DeLambert et al., J. Med. Chem. 37: 498 (1994). También se proporcionan ésteres de fenilo que contienen un éster carboxílico en orto para el fosfato. Khamnei y Torrence, J. Med. Chem.; 39: 4109-4115, (1996). En particular, se proporcionan los ésteres bencílicos, que generan el compuesto original, en algunos casos usando sustituyentes en la posición orto o para para acelerar la hidrólisis. Ejemplos de esta clase de profármacos se describen por Mitchell et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 2345 (1992); y Glazier et al. documento de patente internacional WO 91/19721.

- 50 También se incluyen ésteres de fosfonato cíclico y no cíclico. Ejemplos no limitantes se describen en Hunston et al., J. Med. Chem. 27: 440-444 (1984) y Starrett et al. J. Med. Chem. 37: 1857-1864 (1994)). Además se proporcionan los ésteres 3',5'-cíclicos de fosfato. Ejemplos no limitativos se describen en Meier et al. J. Med. Chem. 22: 811-815 (1979)). Se proporcionan ésteres de fosfonato y fosfato de 1',3'-propanilo cíclico, tales como los que contienen un
- 55

anillo arilo fusionado, por ejemplo el éster de ciclosaligenilo. (Meier et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 7: 99-104 (1997)). Se proporcionan también ésteres de monofosfatos 1',3'-propanilo cíclico no sustituido (Farquhar et al., J. Med. Chem. 26: 1153 (1983); Farquhar et al., J. Med. Chem. 28: 1358 (1985)). Además se proporcionan, ésteres de 1',3'-propanilo cíclico sustituido con un grupo pivaloiloximetiloxi en C-1' (Freed et al., Biochem. Pharmac. 38: 3193 (1989); Biller et al., documento de patente de Estados Unidos. N° 5.157.027).

Se sabe que los fosforamidatos cíclicos se escinden in vivo por un mecanismo oxidativo. Se proporcionan una variedad de fosforamidatos cíclicos de 1'3' propanilo. Ejemplos no limitativos se describen por Zon, Progress in Med. Chem. 19, 205 (1982). Además, se proporcionan una serie de proésteres 2'- y 3'-sustituídos. 2'-Sustituyentes incluyen metilo, dimetilo, bromo, trifluorometilo, cloro, hidroxilo, y metoxi; 3'-sustituyentes incluyen fenilo, metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, i-propilo, y ciclohexilo. Se proporciona también una variedad de análogos 1'-sustituídos.

Se proporcionan también ésteres cíclicos de compuestos que contienen fósforo. Se describen a continuación ejemplos no limitativos:

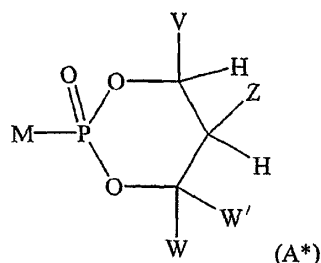
- [1] di and tri ésteres de ácidos fosfóricos como se informa por Nifantsev et al., Phosphorus, Sulfur Silicon and Related Elements, 113: 1 (1996); Wijnberg et al., documento de patente europea EP-180276 A1;

- [2] ésteres ácidos de fosforo (III). Kryuchkov et al., Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. 6: 1244 (1987). Se reivindica que algunos de los compuestos son útiles para la síntesis asimétrica de precursores de L-Dopa. Sylvain et al., documento de patente alemana DE3512781 A1;

- [3] fosforamidatos. Shih et al., Bull. Inst. Chem. Acad. Sin, 41: 9 (1994); Edmundson et al., J. Chem. Res. Synop. 5: 122 (1989); y

- [4] fosfonatos. Neidlein et al., Heterocycles 35: 1185 (1993).

Además los ejemplos no limitativos de los solicitudes de patentes de Estados Unidos y patentes internacionales que describen profármacos de fosforamidato cíclicos adecuados incluyen el documento de patente de Estados Unidos N° 6.312.662; documentos de patente internacional WO 99/45016; WO 00/52015; WO 01/47935; y WO 01/18013 de Erion, et al. de Metabasis Therapeutics, Inc. Específicamente, se proporcionan profármacos de la fórmula a continuación:



en donde

- juntos V y Z están conectados conjuntamente a través de 3-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico que contiene 5-7 átomos, opcionalmente 1 heteroátomo, sustituido con hidroxilo, aciloxi, alcocarboniloxi, o ariloxycarboniloxi unido a un átomo de carbono que está a tres átomos de ambos grupos O unidos al fósforo; o

- juntos V y Z están conectados a través de 3-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico, que contiene opcionalmente 1 heteroátomo, que está condensado con un grupo arilo en la posición beta y gamma del O unido al fósforo;

- juntos V y W están conectados a través de 3 átomos de carbono adicionales para formar un grupo cíclico opcionalmente sustituido que contiene 6 átomos de carbono y que está sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, aciloxi, alcocarboniloxi, alquiliocarboniloxi, y ariloxycarboniloxi, unido a uno de dichos átomos de carbono que está a tres átomos de un O unido al fósforo;

- juntos Z y W están conectados a través de 3-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico, opcionalmente que contiene un heteroátomo, y V tiene que ser arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

- juntos W y W' están conectados a través de 2-5 átomos adicionales para formar un grupo cíclico, que opcionalmente contiene de 0 a 2 heteroátomos, y V tiene que ser arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

• Z se selecciona del grupo que consiste en $-\text{CHR}^2 \text{OH}$, $-\text{CHR}^2 \text{OC(O)R}^3$, $-\text{CHR}^2 \text{OC(S)R}^3$, $-\text{CHR}^2 \text{OC(S)OR}^3$, $-\text{CHR}^2 \text{OC(O)SR}^3$, $-\text{CHR}^2 \text{OCO}_2 \text{R}^3$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{CHR}^2 \text{N}_3$, $-\text{CH}^2 \text{arilo}$, $-\text{CH}(\text{aril})\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{CH}=\text{CR}^2_2)\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{C.ident.CR}^2)\text{OH}$, $-\text{R}^2$, $-\text{NR}^2_2$, $-\text{OCOR}^3$, $-\text{OCO}_2 \text{R}^3$, $-\text{SCOR}^3$, $-\text{SCO}_2 \text{R}^3$, $-\text{NHCOR}^2$, $-\text{NHCO}_2 \text{R}^3$, $-\text{CH}_2 \text{NH arilo}$, $-(\text{CH}_2)_p -\text{OR}^{12}$, y $-(\text{CH}_2)_p -\text{SR}^{12}$;

5 • p es un número entero 2 o 3;

• con la condición de que:

o a) V, Z, W, W' no son todos -H; y

o b) cuando Z es $-\text{R}^2$, entonces al menos uno de V, W, y W' no es-H, alquilo, aralquilo, o alicíclico;

• R^2 se selecciona del grupo que consiste en R^3 y -H;

10 • R^3 se selecciona del grupo que consiste en alquilo, arilo, alicíclico, y aralquilo;

• R^{12} se selecciona del grupo que consiste en -H, y acilo inferior;

• M es el agente biológicamente activo, que está unido al fósforo en la fórmula I a través de 3' y/o 5'-hidroxilo.

V. Terapia de combinación o alternancia

15 Los compuestos activos de la presente invención se pueden administrar en combinación o alternancia con otro agente anti-flavivirus o pestivirus, o, en particular, un agente anti-VHC para tratar cualquiera de las condiciones descritas en el presente documento. En la terapia de combinación, dosis eficaces de dos o más agentes se administran juntas, mientras que en la alternancia o la terapia de pasos secuencial, una dosis eficaz de cada agente se administra en serie o secuencialmente. Las dosis administradas dependerán de los índices de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Es de señalar que los valores de la dosis también variarán con la gravedad del trastorno a aliviar. Ha de entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. En realizaciones preferidas, un compuesto anti-VHC (o anti-pestivirus o anti-flavivirus) que exhibe una EC_{50} de 10-15 μM , o preferiblemente menos de 1-5 μM , es deseable.

25 Se ha reconocido que variantes resistentes a los fármacos de flavivirus, pestivirus or VHC pueden surgir después de un tratamiento prolongado con un agente antivírico. La resistencia a fármacos más típicamente se produce por mutación de un gen que codifica para una enzima usada en la replicación vírica. La eficacia de un fármaco contra la infección vírica puede prolongarse, aumentarse, o restaurarse mediante la administración del compuesto en combinación o alternancia con un segundo, y quizás tercer compuesto antivírico que induce una mutación diferente de la causada por el fármaco principal. Alternativamente, la farmacocinética, biodistribución u otros parámetros del fármaco pueden alternarse por tal terapia de combinación o alternancia. En general, la terapia de combinación normalmente se prefiere sobre la terapia de alternancia porque induce múltiples tensiones simultáneas sobre el virus.

35 Cualquiera de los tratamientos víricos descritos en los antecedentes de la invención se pueden usar en combinación o alternancia con los compuestos descritos en esta memoria descriptiva. Ejemplos no limitativos incluyen:

1) Inhibidores de proteasa

Ejemplos incluyen inhibidores de la proteasa NS3 basados en el sustrato (Attwood et al., Antiviral peptide derivatives, documento de patente internacional PCT WO 98/22496, 1998; Attwood et al., Antiviral Chemistry and Chemotherapy 1999, 10, 259-273; Attwood et al., Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents, documento de patente alemana DE 19914474; Tung et al. Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease, documento PCT de patente internacional WO 98/17679), incluyendo alfacetoamidas e hidrazinoureas, e inhibidores que terminan en un electrófilo tal como un ácido borónico o fosfonato (Llinas-Brunet et al, Hepatitis C inhibitor peptide analogues, documento PCT de patente internacional WO 99/07734); también se están investigando inhibidores de la proteasa NS3 no basados en sustrato tales como derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitro-benzamida (Sudo K. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 238, 643-647; Sudo K. et al. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 1998, 9, 186), incluyendo RD3-4082 y RD3-4078, el primero sustituido en la amida con una cadena de 14 carbonos y el segundo procesando un grupo para-fenoxifenil; Sch 68631, una fenantrenoquinona, es un inhibidor de la proteasa del VHC (Chu M. et al., Tetrahedron Letters 37:7229-7232, 1996).

50 Sch 351633, aislado del hongo *Penicillium griseofulvum*, fue identificado como un inhibidor de la proteasa (Chu M. et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9:1949-1952). Eglin c, aislado de la sanguijuela, es un potente inhibidor de varias proteasas de serina como S. griseus proteasas A y B, α -quimotripsina, quimasa y subtilisina. Qasim M.A. et al., Biochemistry 36:1598-1607, 1997.

- Documentos de patente de Estados Unidos que describen inhibidores de las proteasas para el tratamiento de VHC incluyen, por ejemplo, el documentos de patente de Estados Unidos N° 6.004.933 para Spruce et al. que describe una clase de inhibidores de la cisteína proteasa para inhibir la endopeptidase VHC 2; el documento de patente de Estados Unidos N° 5.990.276 para Zhang et al. El cual describe inhibidores sintéticos de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C. Documento de patente de Estados Unidos N° 5.538.865 para Reyes et al; Documento de patente internacional WO 02/008251 para Corvas International, Inc, y documentos de patente internacional WO 02/08187 y WO 02/008256 para Schering Corporation. Tripéptidos inhibidores de VHC se describen en las patentes de Estados Unidos N°s 6.534.523, 6.410.531, y 6.420.380 de Boehringer Ingelheim y el documento de patente internacional WO 02/060926 de Bristol Myers Squibb. Péptidos diarílicos como inhibidores de la serina proteasa NS3 de VHC se describen en el documento de patente internacional WO 02/48172 de Schering Corporation. Imidazoleidinonas como inhibidores de la serina proteasas NS3 de VHC se describen en los documentos de patente internacional WO 02/08198 de Schering Corporation y WO 02/48157 de Bristol Myers Squibb. Los documentos de patente internacional WO 98/17679 de Vertex Pharmaceuticals y WO 02/48116 de Bristol Myers Squibb también describen inhibidores de la proteasa de VHC.
- 2) Derivados de la tiazolidina que muestran inhibición relevante en un ensayo de HPLC de fase inversa con una proteína de fusión NS3/4A y un sustrato NS5A/5B (Sudo K. et al., Antiviral Research, 1996, 32, 9-18), específicamente el compuesto RD-1-6250, que posee un resto cinamóilo fusionado sustituido con una cadena larga de alquilo, RD4 6205 y RD4 6193;
- 3) Tiazolidinas and benzanilidas identificadas por Kakiuchi N. et al. J. EBS Letters 421, 217-220; Takeshita N. et al. Analytical Biochemistry, 1997, 247, 242-246;
- 4) Una fenantrenoquinona que posee actividad contra la proteasa en un ensayo de SDS-PAGE y un ensayo de autoradiografía, aislada del caldo de cultivo de fermentación de especies de Streptomyces, Sch 68631 (Chu M. et al., Tetrahedron Letters, 1996, 37, 7229-7232), y Sch 351633, aislado del hongo *Penicillium griseofulvum*, que demuestra actividad en un ensayo de proximidad de centelleo (Chu M. et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9, 1949-1952);
- 5) Inhibidores de helicasa (Diana G.D. et al., Compounds, compositions and methods for the treatment of hepatitis C, documento de patente de Estados Unidos N° 5.633.358; Diana G.D. et al., Piperidine derivatives, pharmaceutical compositions thereof and their use in the treatment of hepatitis C, documento PCT de patente internacional WO 97/36554);
- 6) Inhibidores de la polimerasa de nucleótidos y gliotoxina (Ferrari R. et al. Journal of Virology, 1999, 73, 1649-1654), y el producto natural cerulenina (Lohmann V. et al., Virology, 1998, 249, 108-118);
- 7) Oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido (S-ODN) complementarios a la secuencia que se extiende en la región 5' no codificante (NCR) del virus (Alt M. et al., Hepatology, 1995, 22, 707-717), o los nucleótidos 326-348 que comprende el extremo 3' del NCR y los nucleótidos 371-388 situados en la región de codificación de núcleo de ARN del VHC (Alt M. et al., Archives of Virology, 1997, 142, 589-599; Galderisi U. et al., Journal of Cellular Physiology, 1999, 181, 251-257);
- 8) Los inhibidores de la traducción dependiente de IRES (Ikeda N et al., Agent for the prevention and treatment of hepatitis C, documento de patente japonesa JP-08268890; Kai Y. et al. Prevention and treatment of viral diseases, documento de patente japonesa JP-10101591);
- 9) Ribozimas, tales como ribozimas resistentes a la nucleasa (Maccjak, D. J. et al., Hepatology 1999, 30, resumen 995) y las descritas en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.043.077 para Barber et al., y los documentos de patente de Estados Unidos N°s 5.869.253 y 5.610.054 para Draper et al.; y
- 10) Análogos de nucleósidos también se han desarrollado para el tratamiento de infecciones por Flaviviridae.
- 11) cualquiera de los compuestos descritos por Idenix Pharmaceuticals en los documentos de patente internacional. WO 01/90121 y WO 01/92282; .
- 12) Compuestos en otras solicitudes de patentes que describen el uso de ciertos análogos de nucleósidos para tratar el virus de la hepatitis C incluyen: el documento PCT/CA00/01316 (documento de patente internacional WO 01/32153; presentado el 3 de noviembre de 2000) y el documento PCT/CA01/00197 (documento de patente internacional WO 01/60315; presentado el 19 de Febrero de 2001) registrado por BioChem Pharma, Inc. (actualmente Shire Biochem, Inc.); El documento PCT/US02/01531 (documento de patente internacional WO 02/057425; presentado el 18 de Enero de 2002) y el documento PCT de la patente de Estados Unidos US02/03086 (documento de patente internacional WO02/057287; presentada el 18 de Enero de 2002) presentada por Merck & Co., Inc., PCT/EP01/09633 (documento de patente internacional WO 02/18404; publicado el 21 de Agosto de 2001) presentado por Roche, y la publicaciones PCT del documento de patente internacional WO 01/79246 (presentada el 13 de Abril de 2001), los documentos de patente internacional WO 02/32920 (presentada el 18 de Octubre de 2001) y WO 02/48165 por Pharmasset, Ltd.

13) La publicación PCT del documento de patente internacional WO 99/43691 para la universidad de Emory, titulada "2'-Fluoronucleosides" describe el uso de ciertos 2'-fluoronucleósidos para el tratamiento de VHC.

14) Otros compuestos misceláneos que incluyen 1-amino-alkilciclohexanos (documento de patente de Estados Unidos Nº 6.034.134 para Gold et al.), alquilípidos (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.922.757 de Chojkier et al.), vitamina E y otros antioxidantes (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.922.757 de Chojkier et al.), escualeno, amantadina, ácidos biliares (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.846.964 de Ozeki et al.), N-(ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico, (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.830.905 para Diana et al.), bencenodicarboxamidas (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.633.388 para Diana et al.), derivados del ácido poliadenílico (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.496.546 para Wang et al.), 2',3'-didesoxiinosina (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.026.687 para Yarchoan et al.), bencimidazoles (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.891.874 para Colacino et al.), extractos de planta (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.837.257 para Tsai et al., documento de patente de Estados Unidos Nº 5.725.859 para Omer et al., y documento de patente de Estados Unidos Nº 6.056.961), y piperidenos (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.830.905 para Diana et al.).

15) Otros compuestos actualmente en desarrollo preclínico o clínico para el tratamiento del virus de la hepatitis C incluyen: Interleucina-10 de Schering-Plough, IP-501 de Interneuron, Merimebodib (VX-497) de Vertex, AMANTADINE® (Symmetrel) de Endo Labs Solvay, HEPTAZYME® de RPI, IDN-6556 de Idun Pharma., XTL-002 de XTL., HCV/MF59 de Chiron, CIVACIR® (inmunoglobulina para hepatitis C) de NABI, LEVOVIRIN® de ICN/Ribapharm, VIRAMIDINE® de ICN/Ribapharm, ZADAXIN® (timosina alfa-1) de Sci Clone, timosina más interferón pegilado de Sci Clone, CEPLINE® (dihidrocloreto de histamina) de Maxim, VX 950 / LY 570310 de Vertex/Eli Lilly, ISIS 14803 de Isis Pharmaceutical/Elan, IDN-6556 de Idun Pharmaceuticals, Inc., JTK 003 de AKROS Pharma, BILN-2061 de Boehringer Ingelheim, CellCept (micofenolato de mofetilo) de Roche, T67, un inhibidor de β -tubulina, de Tularik, una vacuna terapéutica dirigida a E2 de Innogenetics, FK788 de Fujisawa Healthcare, Inc., IdB 1016 (Siliphos, fitosoma de silibina-fosfatidilcolina oral), inhibidores de la replicación de ARN (VP50406) de ViroPharma/Wyeth, vacuna terapéutica de Intercell, de Epimmune/Genencor, inhibidor IRES de Anadys, ANA 245 y ANA 246 de Anadys, inmunoterapia (Therapore) de Avant, inhibidor de proteasa de Corvas/Schering, inhibidor de helicasa de Vertex, inhibidor de fusión de Trimeris, terapia de células T de CellExSys, inhibidor de polimerasa de Biocryst, química del ARN dirigida de PTC Therapeutics, Dication por Immtech, Int., inhibidor de proteasa de Agouron, inhibidor de proteasa de Chiron/Medivir, terapia antisentido de AVI BioPharma, terapia antisentido de Hybridon, hemopurificador de Aethlon Medical, vacuna terapéutica por Merix, inhibidor de proteasa de Bristol-Myers Squibb/Axys, Chron-VacC, una vacuna terapéutica, de Tripep, UT 231B de United Therapeutics, inhibidores de proteasa, helicasa y polimerasa de Genelabs Technologies, inhibidores de IRES de Immusol, R803 de Rigel Pharmaceuticals, INFERGEN® (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON® (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON® de Human Genome Sciences, REBIF® (interferón beta-1a) de Ares-Serono, Omega Interferon de BioMedicine, Oral Interferon Alpha de Amarillo Biosciences, interferón gamma, interferón tau, e Interferón gamma-1b de InterMune.

VI Composiciones farmacéuticas

Los anfitriones, incluyendo seres humanos, infectados con pestivirus, flavivirus, infección por el VHC, o cualquier otra condición descrita en este documento, o con otro organismo que se replique a través de una polimerasa vírica dependiente del ARN, o para el tratamiento de cualquier otro trastorno descrito en este documento, pueden ser tratados mediante la administración al paciente de una cantidad eficaz del compuesto activo o su profármaco o sal farmacéuticamente aceptable en presencia de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los materiales activos se pueden administrar por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea, o tópica, en forma líquida o sólida.

Una dosis preferida del compuesto para pestivirus, flavivirus o VHC estará en el intervalo de aproximadamente 1 a 50 mg/kg, preferiblemente 1 a 20 mg/kg, de peso corporal por día, más generalmente de 0,1 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. Dosis más bajas pueden ser preferibles, por ejemplo dosis de 0,5-100 mg, 0,5-50 mg, 0,5-10 mg, o 0,5-5 mg por kilogramo de peso corporal por día. Incluso dosis más bajas pueden ser útiles, y por lo tanto los intervalos pueden incluir de 0,1-0,5 mg por kilogramo de peso corporal por día. El intervalo de dosis eficaz de las sales y profármacos farmacéuticamente aceptables puede calcularse en base al peso del nucleósido matriz a suministrar. Si la sal o profármaco exhibe actividad en sí mismo, la dosis eficaz se puede estimar como anteriormente usando el peso de la sal o profármaco, o por otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

El compuesto se administra convenientemente en cualquier unidad y forma de dosificación adecuada, incluyendo pero no limitado a una que contenga de 7 a 3000 mg, preferiblemente de 70 a 1400 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Una dosis oral de 50-1000 mg es generalmente conveniente, incluida en una o múltiples formas de dosificación de 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg. Dosis más bajas pueden ser preferibles, por ejemplo de 10-100 o 1-50 mg. También se contemplan dosis de 0,1-50 mg, o 0,1-20 mg o 0,1-10,0 mg. Además, pueden usarse dosis más bajas en el caso de administración por una vía no oral, como, por ejemplo, por inyección o inhalación.

Idealmente el ingrediente activo debería administrarse para alcanzar concentraciones plasmáticas máximas del compuesto activo de desde aproximadamente 0,2 a 70 μM , preferiblemente aproximadamente 1,0 a 10 μM . Esto puede conseguirse, por ejemplo, por la inyección intravenosa de una solución de 0,1 a 5% del ingrediente activo, opcionalmente en solución salina, o administrada como un bolo del ingrediente activo.

5 La concentración de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Es de señalar que los valores de la dosis también variarán con la gravedad de la condición a aliviar. Se ha de entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la
10 administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son a modo de ejemplo solamente y no están destinados a limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo se puede administrar de una vez, o puede dividirse en un número de dosis más pequeñas para ser administradas a intervalos variables de tiempo.

15 Un modo preferido de administración del compuesto activo es el oral. Las composiciones orales generalmente incluirán un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos, grageas o cápsulas. Agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles pueden incluirse como parte de la composición.

20 Los comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como el ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener,
25 además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, las formas de dosificación unitarias pueden contener otros materiales diversos que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca, u otros agentes entéricos.

30 El compuesto se puede administrar como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como un agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y sabores.

35 El compuesto o un profármaco o sales farmacéuticamente aceptables del mismo también se puede mezclar con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada, tales como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, u otros antiviricos, incluyendo otros compuestos nucleósidos. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea, o tópica pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites de fijación, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como el alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como el ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro sódico o dextrosa. La preparación parental puede
40 encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Si se administra por vía intravenosa, los vehículos preferidos son solución salina fisiológica o solución salina tamponada de fosfato (PBS).

45 En una realización preferida, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, y polímeros biocompatibles, como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation.

50 Las suspensiones de liposomas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) son también preferidas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 4.522.811. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones de liposomas disolviendo lípido(s) apropiados (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, fosfatidil colina araquidilo, y colesterol) en un disolvente inorgánico de donde se evaporan después, dejando una película delgada de lípido seco sobre la superficie del recipiente. Una solución acuosa del compuesto activo o sus derivados
55 monofosfato, difosfato, y/o trifosfato se introduce entonces en el recipiente. El recipiente se agita entonces manualmente para liberar el material lipídico libre de las paredes del recipiente y para dispersar los agregados de lípido, formando de este modo la suspensión de liposomas.

VII. Procedimientos para la preparación de compuestos activos

Los nucleósidos de la presente invención se pueden sintetizar por cualquier medio conocido en la técnica. En particular, la síntesis de los nucleósidos presentes se puede conseguir por medio de la alquilación del azúcar apropiadamente modificado, seguido de glicosilación o por glicosilación seguido de alquilación del nucleósido. Las siguientes realizaciones no limitativas ilustran algunas metodologías generales para obtener los nucleósidos de la presente invención.

A. Síntesis general de nucleósidos 1'-C-ramificados (no según la invención)

1) Modificación a partir de la lactona

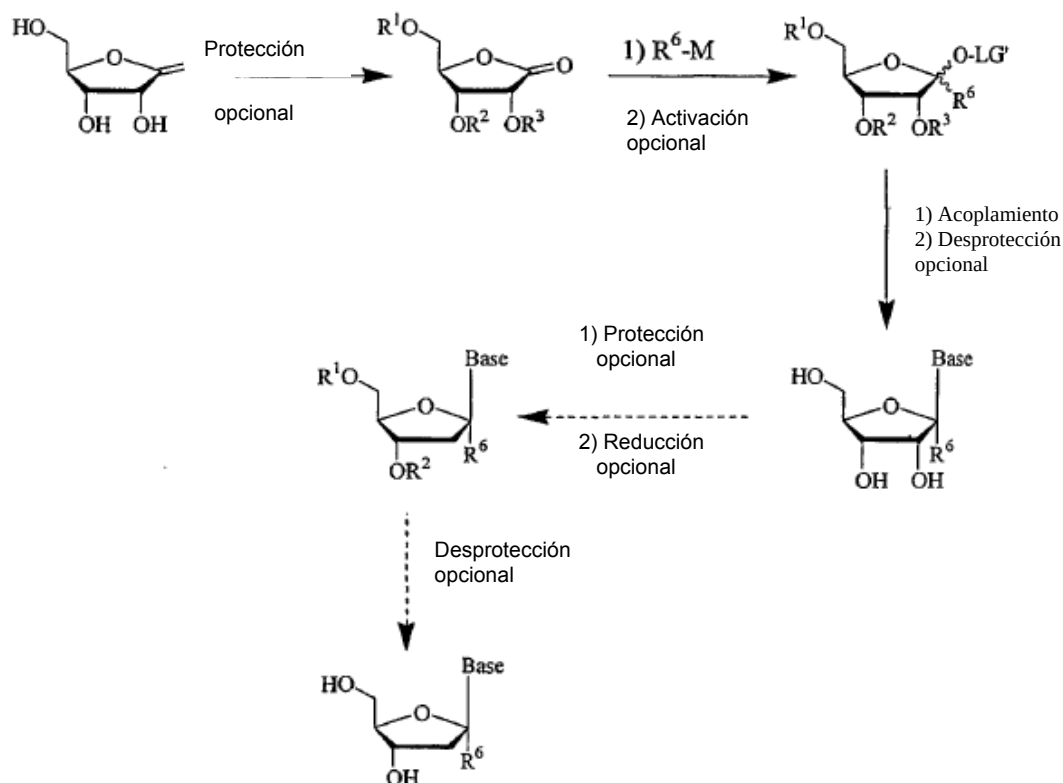
El material inicial clave para este proceso es una lactona apropiadamente sustituida. La lactona puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas de epimerización, sustitución y ciclización estándar. La lactona puede estar opcionalmente protegida con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los mostrados por Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. La lactona protegida puede a continuación ser acoplada con un agente de acoplamiento adecuado, tal como un nucleófilo organometálico de carbono, tal como un reactivo de Grignard, un organolitio, dialquilcobre de litio o R^6-SiMe_3 en TBAF con el disolvente no prótico apropiado a una temperatura adecuada, para dar el azúcar 1'-alquilado.

El azúcar opcionalmente activado puede ser entonces acoplado a la base mediante métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Townsend *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Plenum Press, 1994. Por ejemplo, un azúcar acilado puede acoplarse a una base sililada con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o triflato de trimetilsililo en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

En una realización particular, se desea el ribonucleósido 1'-C-ramificado. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el esquema 1. Alternativamente, se desea el desoxiribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado puede opcionalmente protegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, y después el 2'-OH puede reducirse con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton.

Esquema 1



2. Método alternativo para la preparación de nucleósidos 1'-C-ramificados

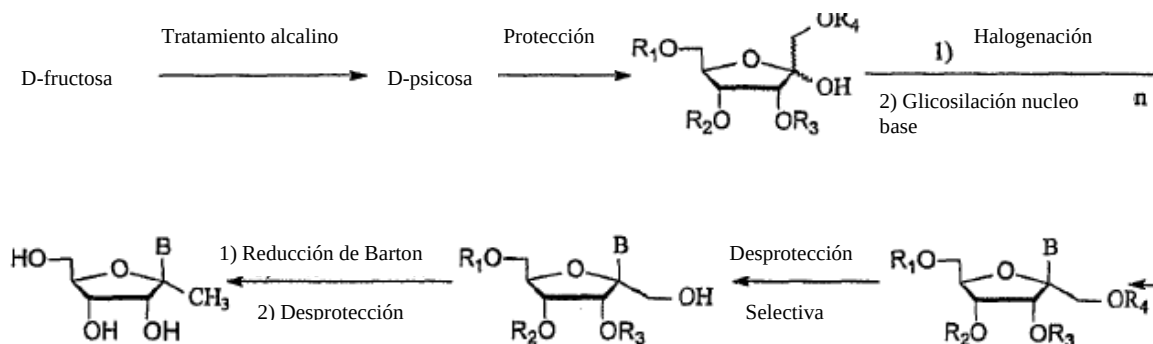
El material inicial clave para este proceso es una hexosa apropiadamente sustituida. La hexosa puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas de epimerización (por ejemplo, por medio de tratamiento alcalino), sustitución y acoplamiento. La hexosa puede ser protegida selectivamente para dar la hexafuranosa apropiada, como se enseña en Townsend Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Plenum Press, 1994.

El 1'-hidroxilo puede ser opcionalmente activado como un grupo saliente adecuado tal como un grupo acilo o un halógeno por medio de acilación o halogenación, respectivamente. El azúcar opcionalmente activado puede ser entonces acoplado a la base mediante métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Townsend Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Plenum Press, 1994. Por ejemplo, un azúcar acilado puede acoplarse a una base sililada con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o triflato de trimetilsililo en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada. Alternativamente, un halo-azúcar puede acoplarse con una base sililada en presencia del triflato de trimetilsililo.

El 1'-CH₂-OH, si está protegido, se puede desproteger selectivamente por métodos bien conocidos en la técnica. El hidroxilo primario resultante se puede funcionalizar para dar varios nucleósidos C-ramificados. Por ejemplo, el hidroxilo primario puede reducirse para dar el metilo, usando un agente reductor adecuado. Alternativamente, el hidroxilo puede activarse antes de la reducción para facilitar la reacción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton. En una realización alternativa, el hidroxilo primario se puede oxidar al aldehído, después acoplarse con un agente de acoplamiento adecuado, tal como un nucleófilo de carbono, tal como un reactivo de Grignard, un organolitio, dialquilocobre de litio o R⁶-SiMe₃ en TBAF con el disolvente no prótico apropiado a una temperatura adecuada.

En una realización particular, se desea el ribonucleósido 1'-C-ramificado. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el esquema 2. Alternativamente, se desea el desoxiribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado puede opcionalmente protegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, y después el 2'-OH puede reducirse con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton.

Esquema 2



Además, los L-enantiómeros correspondientes a los compuestos de la invención se pueden preparar siguiendo los mismos métodos generales (1 o 2), comenzando con el correspondiente L-azúcar o nucleósido L-enantiómero como material de partida.

B. Síntesis general de nucleósidos 2'-C-ramificados

1. Glicosilación de la base del núcleo con un azúcar apropiadamente modificado

El material inicial clave para este proceso es un azúcar apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H, con el grupo saliente apropiado (LG), por ejemplo un grupo acilo o un halógeno. El azúcar puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas de epimerización, sustitución, oxidación y reducción estándar. El azúcar sustituido puede ser entonces oxidado con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para dar el azúcar 2'-modificado. Agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), reactivo de Collins (dipiridina Cr(VI) óxido), reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO₂, tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como el ácido crómico o el permanganato soportados sobre un polímero, Cl₂-piridina, H₂O₂-molybdato de amonio, NaBrO₂-CAN, NaOCl en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre,

níquel de Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (t-butoxido de aluminio con otra cetona) y N-bromosuccinimida.

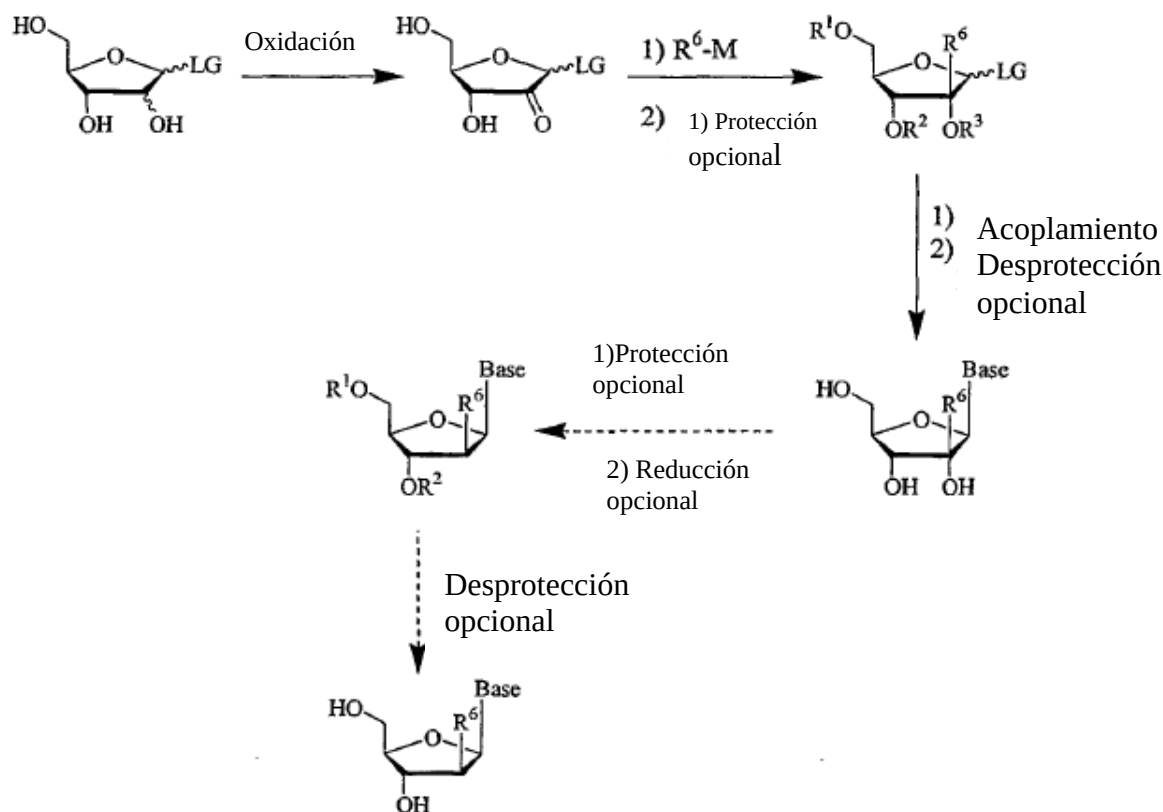
Después el acoplamiento de un nucleófilo organometálico de carbono, tal como un reactivo de Grignard, un organolitio, dialquilcobre de litio o R^6-SiMe_3 en TBAF con la cetona en el disolvente no prótico apropiado a una temperatura adecuada, da el azúcar 2'-alquilado. El azúcar alquilado puede estar opcionalmente protegido con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los mostrados por Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

El azúcar opcionalmente protegido puede ser entonces acoplado a la base mediante métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Townsend *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Plenum Press, 1994. Por ejemplo, un azúcar acilado puede acoplarse a una base sililada con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o triflato de trimetilsililo en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada. Alternativamente, un halo-azúcar puede acoplarse con una base sililada en presencia de triflato de trimetilsililo.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

En una realización particular, se desea el ribonucleósido 2'-C-ramificado. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el esquema 3. Alternativamente, se desea el desoxiribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado puede opcionalmente protegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, y después el 2'-OH puede reducirse con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton.

Esquema 3



2. Modificación de un nucleósido preformado

El material inicial clave para este proceso es un nucleósido apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H. El nucleósido puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas de acoplamiento estándar. El nucleósido puede estar opcionalmente protegido con grupos protectores adecuados, preferiblemente

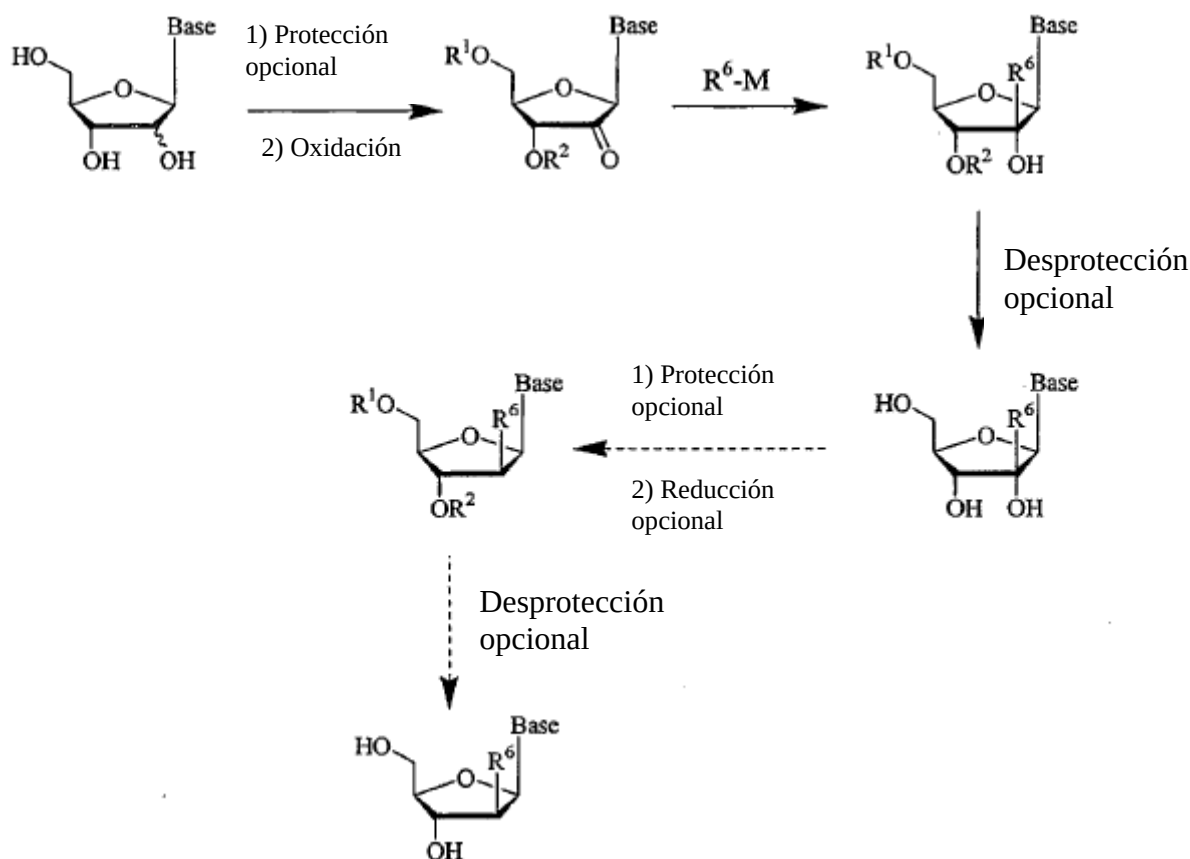
con grupos acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los mostrados por Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

El nucleósido apropiadamente protegido puede ser entonces oxidado con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para dar el azúcar 2'-modificado. Agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), reactivo de Collins (dipiridina Cr(VI) óxido), reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO₂, tetraóxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como el ácido crómico o el permanganato soportados sobre un polímero, Cl₂-piridina, H₂O₂-molybdato de amonio, NaBrO₂-CAN, NaOCl en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel de Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (t-butoxido de aluminio con otra cetona) y N-bromosuccinimida.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

En una realización particular, se desea el ribonucleósido 2'-C-ramificado. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el esquema 4. Alternativamente, se desea el desoxirribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado puede opcionalmente protegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, y después el 2'-OH puede reducirse con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton.

Esquema 4



En otra realización de la invención, se desea los L-enantiómeros. Por lo tanto, los L-enantiómeros pueden ser correspondientes a los compuestos de la invención y se pueden preparar siguiendo los mismos métodos generales anteriores, comenzando con el correspondiente L-azúcar o nucleósido L-enantiómero como material de partida.

C. Síntesis general de nucleósidos 3'-C-ramificados (no según la invención)

1 Glicosilación de la base del núcleo con un azúcar apropiadamente modificado

El material inicial clave para este proceso es un azúcar apropiadamente sustituido con un 3'-OH y 3'-H, con el grupo saliente apropiado (LG), por ejemplo un grupo acilo o un halógeno. El azúcar puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas de epimerización, sustitución, oxidación y reducción estándar. El

azúcar sustituido puede ser entonces oxidado con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para dar el azúcar 3'-modificado. Agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), reactivo de Collins (dipiridina Cr(VI) óxido), reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO_2 , tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como el ácido crómico o el permanganato soportados sobre un polímero, Cl_2 -piridina, H_2O_2 -molybdato de amonio, NaBrO_2 -CAN, NaOCl en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel de Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (t-butoxido de aluminio con otra cetona) y N-bromosuccinimida.

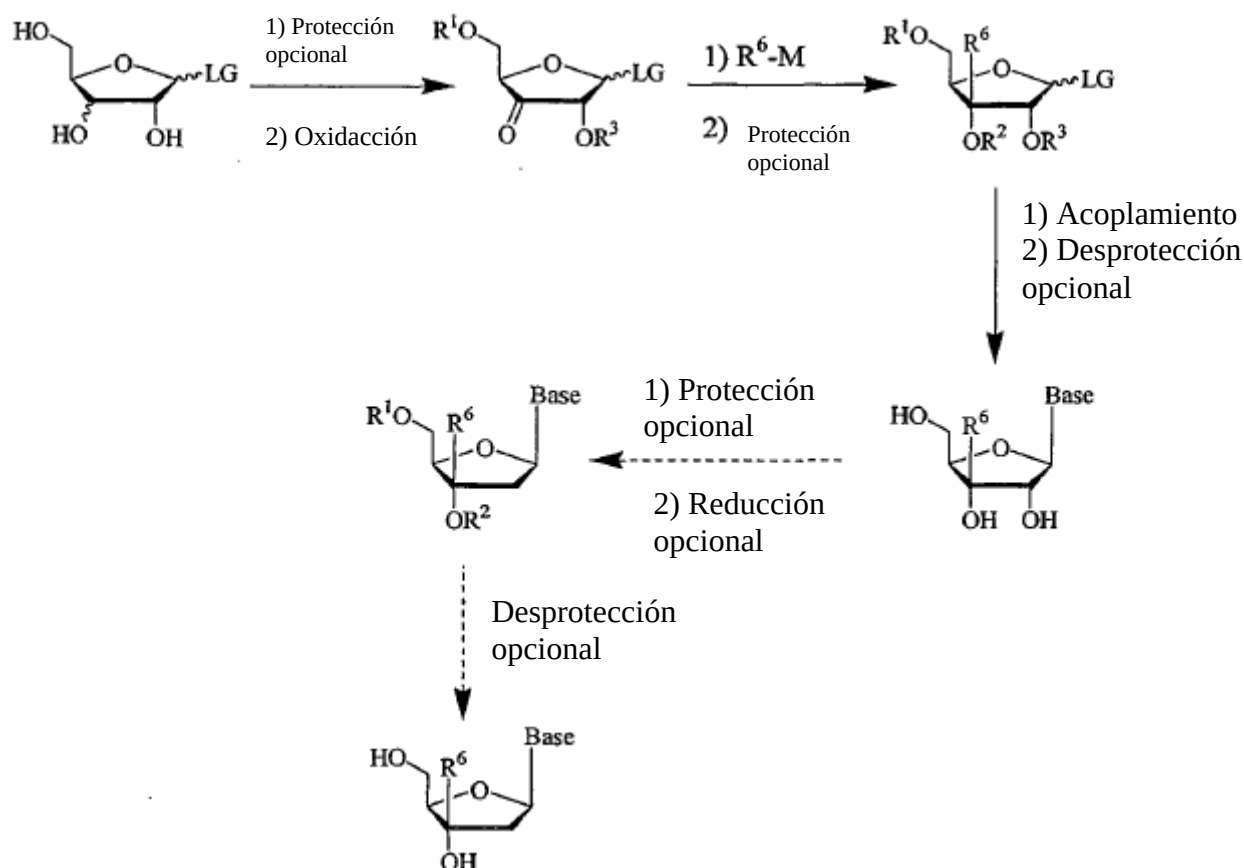
Después el acoplamiento de un nucleófilo organometálico de carbono, tal como un reactivo de Grignard, un organolitio, dialquilcobre de litio o $\text{R}^6\text{-SiMe}_3$ en TBAF con la cetona en el disolvente no prótico apropiado a una temperatura adecuada, da el azúcar 3'-C-ramificado. El azúcar 3'-C-ramificado puede estar opcionalmente protegido con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los mostrados por Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

El azúcar opcionalmente protegido puede ser entonces acoplado a la base mediante métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Townsend *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Plenum Press, 1994. Por ejemplo, un azúcar acilado puede acoplarse a una base sililada con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o triflato de trimetilsililo en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada. Alternativamente, un halo-azúcar puede acoplarse con una base sililada en presencia del triflato de trimetilsililo.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

En una realización particular, se desea el ribonucleósido 3'-C-ramificado. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el esquema 5. Alternativamente, se desea el desoxirribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado puede opcionalmente protegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, y después el 2'-OH puede reducirse con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton.

Esquema 5



2. Modificación de un nucleósido preformado

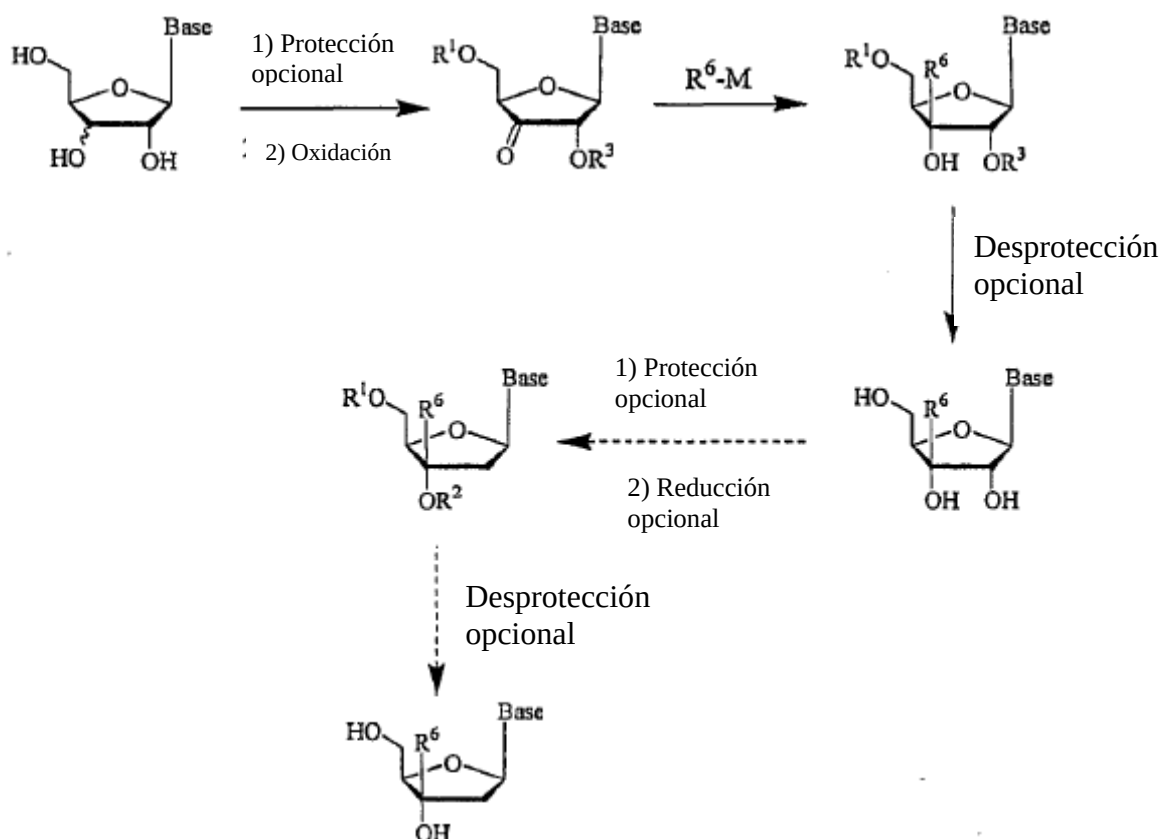
El material inicial clave para este proceso es un nucleósido apropiadamente sustituido con un 3'-OH y 3'-H. El nucleósido puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas de acoplamiento estándar. El nucleósido puede estar opcionalmente protegido con grupos protectores adecuados, preferiblemente con grupos acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los mostrados por Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

El nucleósido apropiadamente protegido puede ser entonces oxidado con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para dar el azúcar 2'-modificado. Agentes oxidantes posibles son el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), reactivo de Collins (dipiridina Cr(VI) óxido), reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO_2 , tetróxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como el ácido crómico o el permanganato soportados sobre un polímero, Cl_2 -piridina, H_2O_2 -molybdato de amonio, NaBrO_2 -CAN, NaOCl en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel de Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (t-butoxido de aluminio con otra cetona) y N-bromosuccinimida.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

En una realización particular, se desea el ribonucleósido 3'-C-ramificado. La síntesis de un ribonucleósido se muestra en el esquema 6. Alternativamente, se desea el desoxirribonucleósido. Para obtener estos nucleósidos, el ribonucleósido formado puede opcionalmente protegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, y después el 2'-OH puede reducirse con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton.

Esquema 6



En otra realización de la invención, se desea los L-enantiómeros. Por lo tanto, los L-enantiómeros pueden ser correspondientes a los compuestos de la invención y se pueden preparar siguiendo los mismos métodos generales anteriores, comenzando con el correspondiente L-azúcar o nucleósido L-enantiómero como material de partida.

*D. Síntesis general de nucleósidos 4'-C-ramificados (no según la invención)**1. Modificación de la pentodialdo-furanosa*

El material inicial clave para este proceso es una pentodialdo-furanosa apropiadamente sustituida. La pentodialdo-furanosa puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas de epimerización, sustitución y ciclación estándar.

En una realización preferida, la pentodialdo-furanosa se prepara a partir de la hexosa apropiadamente sustituida. La hexosa puede comprarse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo técnicas estándar de epimerización (por ejemplo, por medio de tratamiento alcalino), sustitución y de acoplamiento. La hexosa puede estar ya sea en forma de furanosa, o ciclarse a través de cualquier medio conocido en la técnica, tal como la metodología enseñada por Townsend Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Plenum Press, 1994, preferiblemente mediante la protección selectiva de la hexosa, para dar la hexafuranosa apropiada.

El 4'-hidroximetileno de la hexafuranosa puede ser entonces oxidado con el agente apropiado oxidante en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para dar el azúcar 4'-aldo-modificado. Agentes oxidantes posibles son el reactivo de Swern, el reactivo de Jones (una mezcla de ácido crómico y ácido sulfúrico), reactivo de Collins (dipiridina Cr(VI) óxido), reactivo de Corey (clorocromato de piridinio), dicromato de piridinio, dicromato ácido, permanganato de potasio, MnO₂, tetraóxido de rutenio, catalizadores de transferencia de fase tales como el ácido crómico o el permanganato soportados sobre un polímero, Cl₂-piridina, H₂O₂-molybdato de amonio, NaBrO₂-CAN, NaOCl en HOAc, cromito de cobre, óxido de cobre, níquel de Raney, acetato de paladio, reactivo de Meerwin-Pondorf-Verley (t-butoxido de aluminio con otra cetona) y N-bromosuccinimida, aunque preferiblemente usando H₃PO₄, DMSO y DCC en una mezcla de benceno/piridina a temperatura ambiente.

Entonces, la pentodialdo-furanosa puede ser opcionalmente protegida con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los mostrados por Greene et al. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. En presencia de una base, tal como hidróxido de sodio, la pentodialdo-furanosa protegida puede entonces acoplarse con un electrófilo adecuado alquilo, halógeno-alquilo (es decir CF₃), alqueno o alquino (por ejemplo alilo), para obtener el azúcar 4'-alquilado. Alternativamente, la pentodialdo-furanosa protegida puede acoplarse con el carbonilo correspondiente, tal como formaldehído, en presencia de una base, tal como el hidróxido de sodio, con el disolvente polar apropiado, tal como dioxano, a una temperatura adecuada, que puede entonces reducirse con un agente reductor apropiado para dar el azúcar 4'-alquilado. En una realización, la reducción se lleva a cabo usando PhOC(S)Cl, DMAP, preferiblemente en acetonitrilo a temperatura ambiente, seguido de tratamiento por ACCN y TMSS con reflujo en tolueno.

El azúcar opcionalmente activado puede ser entonces acoplado a la base mediante métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Townsend Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Plenum Press, 1994. Por ejemplo, un azúcar acilado puede acoplarse a una base sililada con un ácido de Lewis, tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio o triflato de trimetilsililo en el disolvente apropiado a una temperatura adecuada.

Posteriormente, el nucleósido puede desprotegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

En una realización particular, se desea el ribonucleósido 4'-C-ramificado. Alternativamente, se desea el desoxirribonucleósido. Para obtener estos desoxirribonucleósidos, el ribonucleósido formado puede opcionalmente protegerse por métodos bien conocidos por expertos en la técnica, como se enseña en Greene et al. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991, y después el 2'-OH puede reducirse con un agente reductor adecuado. Opcionalmente, el 2'-hidroxilo puede activarse para facilitar la reducción; por ejemplo por medio de la reducción de Barton.

En otra realización de la invención, se desea los L-enantiómeros. Por lo tanto, los L-enantiómeros pueden ser correspondientes a los compuestos de la invención y se pueden preparar siguiendo los mismos métodos generales anteriores, comenzando con la correspondiente L-pentodialdo-furanosa como material de partida.

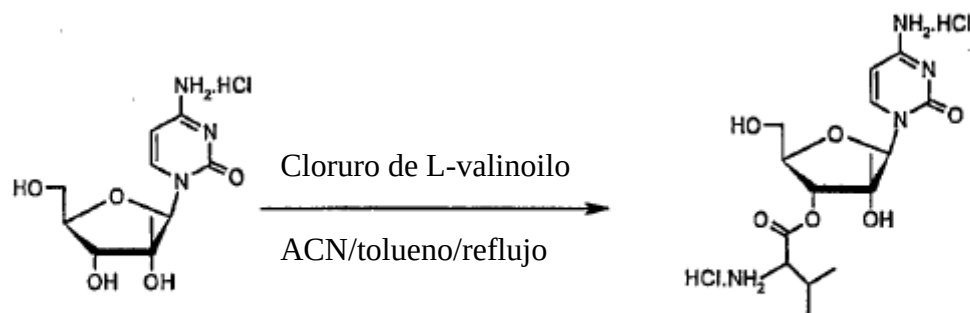
E. Síntesis general de 2' y/o 3'-Profármacos

El material de partida clave para este procedimiento son nucleósidos 1', 2', 3' o 4'-ramificados β-D o β-L apropiadamente sustituidos. Los nucleósidos ramificados pueden comprarse o pueden prepararse por cualquier medio conocido incluyendo las técnicas descritas en este documento. El nucleósido ramificado puede estar opcionalmente protegido con un grupo protector adecuado, preferiblemente con un grupo sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como los mostrados por Greene et al. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991. El nucleósido ramificado protegido puede entonces acoplarse con un donante de acilo adecuado, tal como un cloruro de acilo y/o un anhídrido de acilo con el disolvente prótico o aprótico apropiado a una temperatura adecuada, para dar el 2' y/o 3' profármaco de nucleósidos 1', 2', 3' o 4'-ramificados β-D o β-L. Alternativamente, el nucleósido ramificado protegido puede entonces acoplarse con un

acilo adecuado, tal como un ácido carboxílico, tal como un resto de ácido alcanoico y/o aminoácido, opcionalmente con un agente de acoplamiento adecuado, en el disolvente aprótico apropiado a una temperatura adecuada, para dar los 2' y/o 3' profármacos de los nucleósidos 1', 2', 3' o 4'-ramificados β -D o β -L. Posibles reactivos de acoplamiento son los reactivos que promueven el acoplamiento, que incluyen pero no se limitan a, reactivos de Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con trifenilfosfina o varias carbodiimidas.

Por ejemplo, simples aminoalcoholes pueden ser esterificados con cloruros de ácido en mezcla de acetonitrilo-benceno a reflujo (véase el esquema 7 a continuación: Synthetic Communications, 1978, 8(5), 327-333; se incorpora aquí como referencia). Alternativamente, la esterificación se puede lograr utilizando un anhídrido, tal como se describe en J. Am. Chem. Soc., 1999, 121(24), 5661-5664, que se describe en este documento como referencia. Véase las figuras 2, 3 y 4.

Esquema 7



ACN: Acetonitrilo

La presente invención se describe a modo de ilustración, en los siguientes ejemplos.

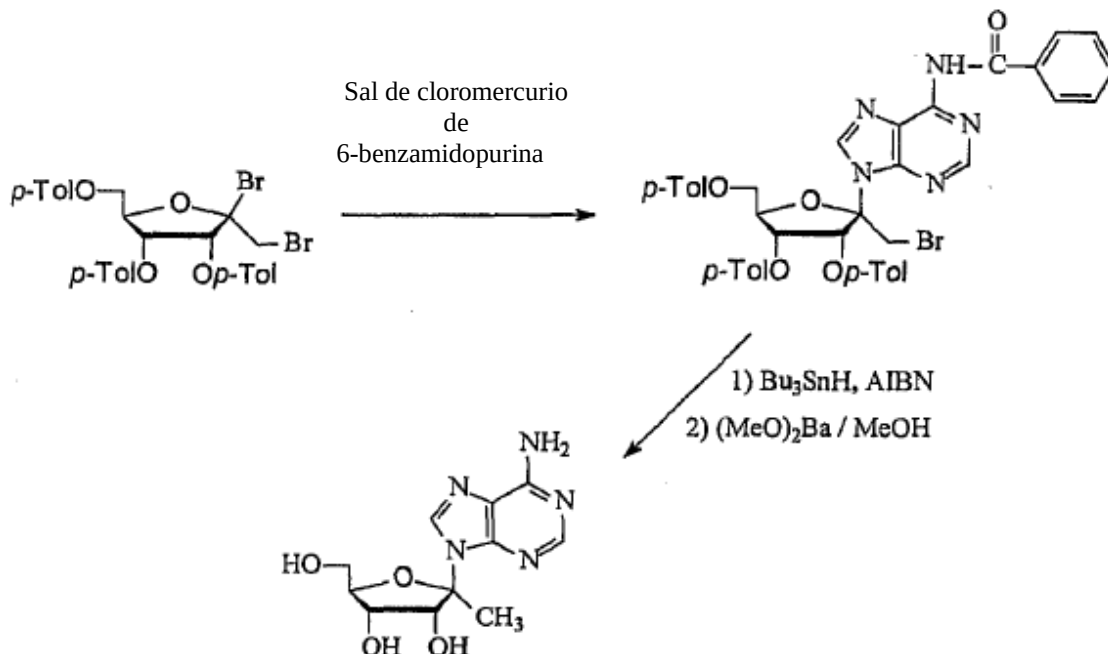
Ejemplo 1 de referencia: Preparación de 1'-C-metilriboadenina vía 6-amino-9-(1-desoxi- β -D-psicofuranosil)purina

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Mel-temp II y no están corregidos. Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker 400 AMX a 400 MHz para ^1H RMN y 100 MHz para ^{13}C RMN con TMS como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm), y las señales se indican como s (singlete), d (doblete), t (triplete), q cuartete, m (multiplete), o bs (singlete ancho). Los espectros IR fueron medidos en un espectrómetro Nicolet 510P FT-IR. Los espectros de masas fueron realizados en un espectrómetro de masas de alta resolución Micromass Autospec. CCF se llevó a cabo en Uniplates (gel de sílice) compradas a Analtech Co. La cromatografía en columna se llevó a cabo usando o gel de sílice 60 (220-440 de criba) para cromatografía de flash o gel de sílice G (grado CCF, > 440 de criba) para cromatografía en columna flash de vacío. Los espectros UV fueron obtenidos en un espectrómetro Beckman DU 650. Los análisis elementales se llevaron a cabo por Atlantic Microlab, Inc., Norcross, Georgia, o Galbraith Laboratories, Inc., Knoxville, Tennessee. HPLC se llevó a cabo con un sistema de Waters HPLC (Millipore Corporation, Milford, Massachusset) equipado con un controlador Modelo 600, un detector de fotodiode array Modelo 996 y un muestreador automático Modelo 717 plus. El software Millennium 2010 fue usado como controlador del sistema, adquisición y procesamiento de datos. Un detector polarimétrico chiralyser, Perkin-Elmer modelo 241MC (Wilton, CT), se usó para la determinación de las rotaciones ópticas.

Síntesis de 1'-C-metilribo-8-metiladenina

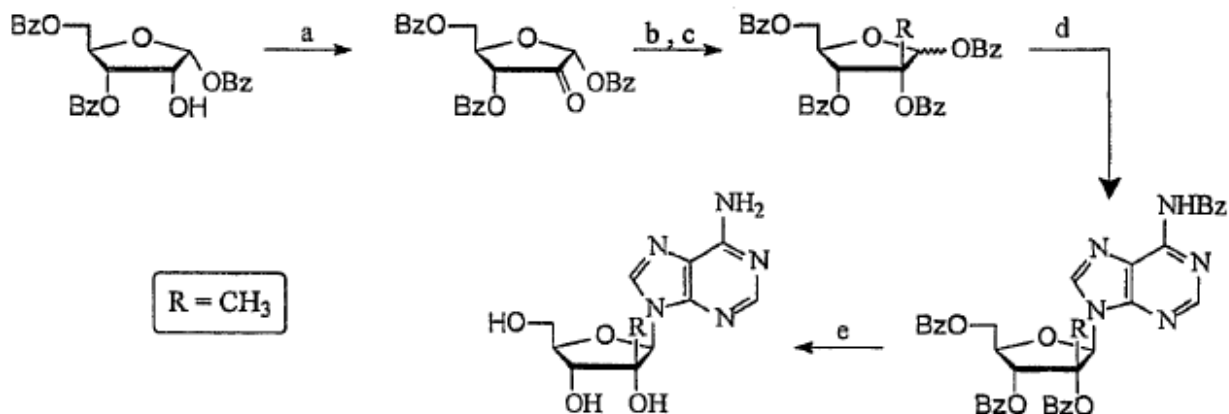
El compuesto del título también podría prepararse según el procedimiento publicado (J. Farkas, y F. Sorm, "Nucleic acid components and their analogues. XCIV. Synthesis of 6-amino-9-(1-deoxy- β -D-psicofuranosyl)purine" Collect. Czech. Chem. Commits. 1967, 32, 2663-2667; J. Farkas", Collect. Czech. Chem. Commun. 1966, 31, 1535) (esquema 8).

Esquema 8

**Ejemplo 2: Preparación de 2'-C-metilribo-8-metiladenina**

El compuesto del título se preparó según un procedimiento publicado (R.E. Harry-O'kuru, J.M. Smith, y M.S. Wolfe, "A short, flexible route toward 2'-C-branched ribonucleosides", J. Org. Chem. 1997, 62, 1754-1759) (esquema 9). (Ejemplo de referencia)

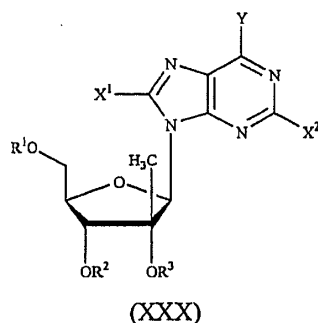
Esquema 9



- 10 (a) Periodano de Dess-Martin; (b) MeMgBr/TiCl₄; (c) BzCl, DMAP, Et₃N; (d) bis(trimetilsilil)acetamida, N⁶-benzoadenina, TMSOTf; (e) NH₃(MeOH)

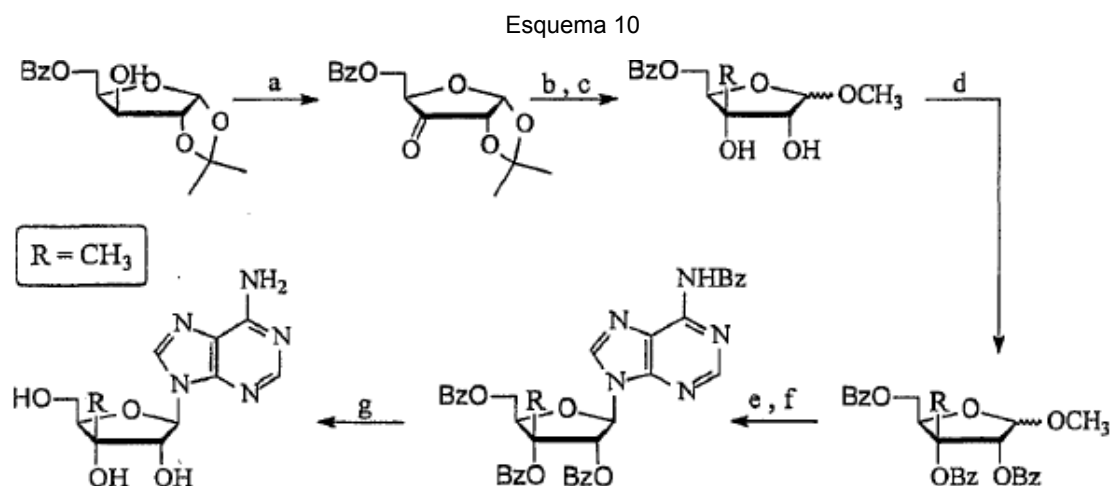
El 3'-profármaco del nucleósido 2'-ramificado se preparó según el procedimiento publicado (Synthetic Communications, 1978, 8(5), 327-333; J. Am. Chem. Soc., 1999, 121(24), 5661-5664). Alternativamente, el nucleósido 2'-ramificado puede ser esterificado sin protección (esquema 9b). Carbonildiimidazol (377 mg, 2,33 mmoles) se añadió a una solución de N-(terc-butoxicarbonil)-L-valina (507 mg, 2,33 mmoles) en 15 ml de tetrahidrofurano anhidro. La mezcla se agitó a 20° C durante una hora y a 50° C durante 10 minutos y después se añadió a una solución de 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahydro-furan-2-il)-1H-pirimidin-2-ona (500 mg, 1,95 mmoles), 4-(dimetilamino)piridina (25 mg, 0,195 mmoles), y trietilamina (5 ml) en N,N-dimetilformamida (10 ml), que se agitó también a 50° C. La mezcla de reacción se agitó a 50° C durante una hora y después se examinó por HPLC. El análisis por HPLC indicó la formación del 52% del éster deseado, y 17% del material de partida en

adición a productos secundarios indeseados. El 3'-OH del 4-amino-1-(3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-3-metil-tetrahidrofuran-2-il)-1H-pirimidin-2-ona tiende a reaccionar selectivamente cuando se acopla con BOC-Val.



Ejemplo 3 de referencia: Preparación de 3'-C-Metilribo-8-Metiladenina

- 5 El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado (R.F. Nutt, M.J. Dickinson, F.W. Holly, y E. Walton, "Branched-chain sugar nucleosides. III. 3'-C-methyladenine", J. Org. Chem. 1968, 33, 1789-1795) (esquema 10).



- 10 (a) RuO₂/NaIO₄; (b) MeMgI/TiCl₄; (c) HCl/MeOH / H₂O; (d) BzCl / piridina; € AcBr, Hbr / AcOH; (f) cloromercurio-6-benzamidopurina; (g) NH₃ / MeOH

Ejemplo 4 de referencia: Preparación de 1-O-metil-2,3-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosa - (1)

- 15 El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado (Leonard, N. J.; Carraway, K. L. "5-Amino-5-deoxyribose derivatives. Synthesis and use in the preparation of "reversed" nucleosides" J. Heterocycl. Chem. 1966, 3, 485-489).

Se agitó durante la noche a temperatura ambiente una solución de 50,0 g (0,34 moles) de D-ribose seca en 1,0 l de acetona, 100 ml de 2,2-dimetoxipropano, y 200 ml de metanol que contenía 20 ml de metanol saturado con ácido clorhídrico a 0° C. La solución resultante se neutralizó con piridina y se evaporó a presión reducida. El aceite resultante se dividió entre 400 ml de agua y 400 ml de cloruro de metileno. La capa acuosa se extrajo dos veces con cloruro de metileno (400 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (1-2%) en cloruro de metileno] para dar 1 puro (52,1 g, 75%) como un jarabe amarillo. 1H-RMN (CDCl₃): δ 5,00 (s, 1H, H-1), 4,86 (d, 1H, H-2, J₂₋₃ = 5,9 Hz), 4,61 (d, 1H, H-3, J₃₋₂ = 5,9 Hz), 4,46 (t, 1H, H-4, J₄₋₅ = 2,7 Hz), 3,77-3,61 (m, 2H, H-5 y H-5'), 3,46 (s, 1H, OCH₃), 3,0-2,4 (s ancho, 1H, OH-5), 1,51 (s, 3H CH₃), 1,34 (s, 3H CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 173 (M-OCH₃)⁺.

Ejemplo 5 de referencia: Preparación de 1-O-metil-2,3-O-isopropiliden-β-D-pentodialdo-ribofuranosa - (2)

- 30 El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado (Jones, G. H.; Moffatt, J. G. Oxidation of carbohydrates by the sulfoxide-carbodiimide and related methods. Oxidation with dicyclohexylcarbodiimide-DMSO, diisopropylcarbodiimide-DMSO, acetic anhydride-DMSO, and phosphorus pentoxide-DMSO: en Methods in Carbohydrate Chemistry; Whisler, R. L. y Moffatt, J. L. Editores; Academic Press: Nueva York, 1972; 315-322).

El compuesto 1 se evaporó dos veces conjuntamente con piridina anhidra. Diciclohexilcarbodiimida (DCC, 137,8 g, 0,67 moles) se añadió a una solución de 1 (68,2 g, 0,33 moles) en benceno anhidro (670 ml), DMSO (500 ml) y piridina (13,4 ml). A la solución resultante, enfriada a 0° C, se añadió una solución de ácido ortofosfórico cristalino anhidro (16,4 g, 0,167 mmoles) en DMSO anhidro (30 ml). La mezcla se agitó durante 1,5 horas a 0° C y 18 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y se diluyó con acetato de etilo (1000 ml). Se añadió una solución del dihidrato del ácido oxálico (63,1 g, 0,38 moles) en DMSO (30 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se filtró para eliminar la diciclohexilurea (DCU) precipitada. El filtrado se concentró a un volumen de alrededor de 600 ml bajo presión reducida y se neutralizó con una solución acuosa de bicarbonato sódico saturada (400 ml). Se añadió salmuera (200 ml) y la capa orgánica se extrajo con acetato de etilo (4x 1000 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron hasta un volumen de alrededor de 2000 ml, se lavaron con una solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (2x 700 ml), y con salmuera (2x 700 ml) antes de secarlas con sulfato sódico y evaporarlas a presión reducida. Una pequeña fracción del residuo bruto fue purificado por cromatografía de gel de sílice [eluyente: cloroformo/éter etílico, 8:2] para confirmar la estructura de 2 que fue obtenido como un sólido amarillo pálido. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 9,61 (s, 1H, H-5), 5,12 (s, 1H, H-1), 5,08 (d, 1H, H-2, J₂₋₃ = 5,9 Hz), 4,53 (d, 1H, H-3, J₃₋₂ = 6,0 Hz), 4,51 (s, 1H, H-4), 3,48 (s, 1H, OCH₃), 1,56 (s, 3H CH₃), 1,36 (s, 3H CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 203 (M+H)⁺, 171 (M-OCH₃)⁺.

Ejemplo 6 de referencia: Preparación de 4-C-hidroximetil-1-O-metil-2,3-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosa - (3)

El compuesto del título puede prepararse según un procedimiento publicado (Leland, D. L.; Kotick, M. P. "Studies on 4-C-(hydroxymethyl)pentofuranoses. Synthesis of 9-[4-C-(hydroxymethyl)-α-L-threo-pentofuranosyl]adenine" Carbohydr. Res. 1974, 38, C9-C11; Jones, G. H.; Taniguchi, M.; Tegg, D.; Moffatt, J. G. "4'-substituted nucleosides. 5. Hydroxylation of nucleoside 5'-aldehydes" J. Org. Chem. 1979, 44, 1309-1317; Gunic, E.; Girardet, J.-L.; Pietrkowski, Z.; Esler, C.; Wang, G. "Synthesis and cytotoxicity of 4'-C- and 5'-C-substituted Toyocamycins" Bioorg. Med. Chem. 2001, 9, 163-170).

A una solución del material bruto (2) obtenido anteriormente y 37% de formaldehído acuoso (167 ml) en dioxano (830 ml) se añadió hidróxido sódico acuoso (2N, 300 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y se neutralizó por adición de Dowex 50 W X 2 (forma H⁺). La resina se filtró, se lavó con metanol, y los filtrados combinados se concentraron a sequedad y coevaporaron varias veces con etanol absoluto. Se eliminó por filtración el formiato sódico que fue precipitado con etanol absoluto, el filtrado se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (0-4%) en cloroformo] para dar 3 puro (42,2 g, 54% de 1), que fue recristalizado de ciclohexano. P.F. = 94-95 (descomposición) (literatura 94-96,5; 97-98 : Referencias :3,4), ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 4,65 (s, 1H, H-1), 4,44-4,37 (m, 3H, H-2, H-3 y OH-6), 4,27 (t, 1H, OH-5, J = 5,6 Hz, J = 6,0 Hz), 3,42-3,34 (m, 2H, H-5 y H-6) 3,29 (dd, 1H, H-5', J_{5'-OH} = 5,4 Hz, J_{5-5'} = 11,4 Hz), 3,11 (dd, 1H, H-6', J_{6'-OH} = 5,7 Hz, J_{6-6'} = 10,9 Hz), 3,03 (s, 3H, OCH₃), 1,48 (s, 3H CH₃), 1,05 (s, 3H CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 469 (2M+H)⁺, 235 (M+H)⁺, 203 (M-OCH₃)⁺ FAB<0 m/z 233 (M-H)⁻.

Ejemplo 7 de referencia: Preparación de 6-O-monometoxitritil-4-C-hidroximetil-1-O-metil-2,3-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosa - (4)

El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado (Gunic, E.; Girardet, J.-L.; Pietrkowski, Z.; Esler, C.; Wang, G. "Synthesis and cytotoxicity of 4'-C- and 5'-C-substituted Toyocamycins" Bioorg. Med. Chem. 2001, 9, 163-170).

A una a solución de 3 (41,0 g, 175 mmoles) en piridina (700 ml) se añadió por porciones cloruro de dimetoxitritilo (60,5 g, 178 mmoles) a +4° C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de la adición del metanol, la mezcla de reacción se concentró (200 ml) y después se disolvió con acetato de etilo (2 l). La capa orgánica se lavó con una solución acuosa de bicarbonato sódico al 5%, con agua, y se secó sobre sulfato sódico y después se evaporó a sequedad. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: acetato de etilo / hexano 15/85] proporcionó 4 puro (63,0 g, 68%) como un jarabe. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 7,5-6,9 (m, 13H, MMTr), 4,89 (s, 1H, H-1), 4,72-4,62 (m, 3H, H-2, H-3 y OH-5), 3,82 (dd, 1H, H-5, J_{5-OH} = 5,5 Hz, J_{5-5'} = 10,5 Hz), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,54 (dd, 1H, H-5', J_{5'-OH} = 4,9 Hz, J_{5'-5} = 10,5 Hz), 3,31 (s, 3H, OCH₃), 3,24 (d, 1H, H-6, J_{6-6'} = 9,2 Hz), 3,13 (d, 1H, H-6', J₆₋₆ = 9,2 Hz), 1,24 (s, 3H CH₃), 1,15 (s, 3H CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 303 (DMTr)⁺.

Ejemplo 8 de referencia: Preparación de 5-O-benzoil-4-C-hidroximetil-1-O-metil-2,3-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosa - (5)

El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado (Gunic, E.; Girardet, J.-L.; Pietrkowski, Z.; Esler, C.; Wang, G. "Synthesis and cytotoxicity of 4'-C- and 5'-C-substituted Toyocamycins" Bioorg. Med. Chem. 2001, 9, 163-170).

A una solución de 4 (2,51 g, 4,68 mmoles) en piridina anhidra (37 ml) se añadió bajo argón cloruro de benzoilo (1,09 ml, 9,36 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 13 horas a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se enfrió a 0° C y se detuvo con agua enfriada con hielo (100 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces con cloruro de metileno (3x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de bicarbonato sódico (2x 150 ml), con agua (1x 150 ml) y después se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron

a presión reducida. El residuo se disolvió en ácido acético al 80% (70,2 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se concentró a sequedad. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: cloroformo] proporcionó 5 puro (1,40 g, 88%) como un jarabe. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 8,1-7,4 (m, 5H, C₆H₅CO), 5,08 (s, 1H, H-1), 4,77 (dd, 2H, H-2 y H-3, J = 6,1 Hz, J = 8,2 Hz), 4,51 (q, 2H, H-5 y H-5', J = 11,5 Hz, J_{5-5'} = 23,8 Hz), 3,91 (t, 2H, H-6 y H-6', J = 12,3 Hz), 4,38 (s, 1H, OCH₃), 2,2-1,8 (s ancho, 1H, OH-6), 1,57 (s, 3H CH₃), 1,38 (s, 3H CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 677 (2M+H)⁺, 339 (M+H)⁺, 307 (M-OCH₃)⁺, 105 (C₆H₅CO)⁺ FAB<0 m/z 121 (C₆H₅CO₂)⁻.

Ejemplo 9 de referencia: Preparación de 5-O-benzoil-4-C-metil-1-O-metil-2,3-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosa - (6)

El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado (Gunic, E.; Girardet, J.-L.; Pietrkowski, Z.; Esler, C.; Wang, G. "Synthesis and cytotoxicity of 4'-C- and 5'-C-substituted Toyocamycins" Bioorg. Med. Chem. 2001, 9, 163-170).

Se agitó una solución de 5 (37,6 g, 0,111 moles), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 40,7 g, 0,333 moles) y cloruro de fenoxitiocarbonilo en acetonitrilo anhidro (1000 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (500 ml) y se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico 0,2 M (2x 500 ml) y agua (500 ml) antes de secar sobre sulfato de sodio, se evaporó bajo presión reducida y se evaporó conjuntamente varias veces con tolueno anhidro. El material en bruto se disolvió en tolueno anhidro (880 ml) y tris(trimetilsilil)silano (TMSS, 42,9 ml, 0,139 moles), y se añadió 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ACCN, 6,8 g, 27,8 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 45 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de éter dietílico (5-20%) en éter de petróleo] para dar 6 puro (26,4 g, 74%) como un jarabe amarillo pálido. ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,0-7,5 (m, 5H, C₆H₅CO), 4,85 (s, 1H, H-1), 4,63 (dd, 2H, H-2 y H-3, J = 6,1 Hz, J = 11,6 Hz), 4,24 (d, 1H, H-5, J_{5-5'} = 11,1 Hz), 4,10 (d, 1H, H-5', J_{5'-5} = 11,1 Hz), 3,17 (s, 1H, OCH₃), 1,38 (s, 3H CH₃), 1,30 (s, 3H CH₃), 1,25 (s, 3H CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 291 (M-OCH₃)⁺, 105 (C₆H₅CO)⁺ FAB<0 m/z 121 (C₆H₅CO₂)⁻.

Ejemplo 10 de referencia: Preparación de 5-O-benzoil-4-C-metil-1,2,3-O-acetil-α,β-D-ribofuranosa - (7)

Se suspendió el compuesto 6 (22,5 g, 70 mmoles) en una solución acuosa de ácido acético al 80% (250 ml). La solución se calentó a 100° C durante 3 horas. A continuación, el volumen se redujo a la mitad y se evaporó conjuntamente con etanol absoluto y piridina. El residuo oleoso se disolvió en piridina (280 ml) y después se enfrió a 0° C. Se añadieron anhídrido acético (80 ml) y 4-dimetilamino-piridina (500 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió con acetato de etilo (1 l) y se lavó sucesivamente con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, ácido clorhídrico 1 M y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de éter dietílico (30-40%) en éter de petróleo] para dar 7 puro (16,2 g, 60%) como un jarabe amarillo pálido. Una pequeña fracción del material fue purificado de nuevo por cromatografía de gel de sílice [mismo sistema eluyente] para separar los anómeros α y β.

α anómero: ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,1-7,5 (m, 5H, C₆H₅CO), 6,34 (pt, 1H, H-1, J = 2,4 Hz, J = 2,1 Hz), 5,49 (m, 2H, H-2 y H-3), 4,33 (q, 2H, H-5 y H-5', J = 11,6 Hz, J = 18,7 Hz), 2,15 (s, 3H, CH₃CO₂), 2,11 (s, 3H, CH₃CO₂), 2,07 (s, 3H, CH₃CO₂), 1,37 (s, 3H, CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 335 (M-CH₃CO₂)⁺, 275 (M-CH₃CO₂+H)⁺, 105 (C₆H₅CO)⁺, 43 (CH₃CO)⁺ FAB<0 m/z 121 (C₆H₅CO₂)⁻, 59 (CH₃CO₂)⁻.

β anómero: ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,1-7,5 (m, 5H, C₆H₅CO), 5,99 (s, 1H, H-1), 5,46 (d, 1H, H-2, J₂₋₃ = 5,3 Hz), 5,30 (d, 1H, H-2, J₂₋₃ = 5,3 Hz), 4,39 (d, 1H, H-5, J_{5-5'} = 11,7 Hz), 4,19 (d, 1H, H-5', J_{5'-5} = 11,7 Hz), 2,10 (s, 3H, CH₃CO₂), 2,06 (s, 3H, CH₃CO₂), 2,02 (s, 3H, CH₃CO₂), 1,30 (s, 3H, CH₃); MS (matriz GT): FAB>0 m/z 335 (M-CH₃CO₂)⁺, 275 (M-CH₃CO₂+H)⁺, 105 (C₆H₅CO)⁺, 43 (CH₃CO)⁺ FAB<0 m/z 121 (C₆H₅CO₂)⁻, 59 (CH₃CO₂)⁻.

Ejemplo 11 de referencia: Preparación de O-6-difenilcarbamoil-N²-isobutiril-9-(2,3-di-O-acetil-5-O-benzoil-4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-8-metilguanina - (18)

Se añadió a una suspensión de O-6-difenilcarbamoil-8-metil-N²-isobutirilguanina en tolueno anhidro (20 ml) N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (1,92 ml, 7,9 mmoles). La mezcla de reacción se dejó calentar a reflujo durante 1 hora. Se disolvió el compuesto 7 (1,55 g, 3,93 mmoles) en tolueno (10 ml) y se añadió trimetilsililtrifluoro-metanosulfonato (TMSTf) (915 ml, 4,72 mmoles). Se calentó la mezcla a reflujo durante 30 minutos. Después, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5%. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml). La fase orgánica se lavó con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5% (150 ml) y con agua (2x 150 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de éter dietílico (70-90%) en éter de petróleo] para proporcionar 18.

Ejemplo 12 de referencia: Preparación de 9-(4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-8-metilguanina - (19)

El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado a partir de 18 (Waga, T.; Nishizaki, T.; Miyakawa, I.; Orhui, H.; Meguro, H. "Synthesis of 4'-C-methylnucleosides" Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993, 57, 1433-1438).

- 5 Se agitó una solución de 18 en amoníaco metanólico (previamente saturado a -10°C) (20 ml) a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (60 ml) y agua (60 ml). La capa acuosa se lavó con cloruro de metileno (2x 60 ml), y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna RP18 [eluyente agua/acetonitrilo 95/5] para proporcionar 19.

10 Ejemplo 13 de referencia: 9-(2,3-di-O-acetil-5-O-benzoil-4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-8-metiladenina - (20)

Se trató una solución de 7 (1,10 g, 2,79 mmoles) en acetonitrilo anhidro (50 ml) con 8-metiladenina y cloruro de estaño (SnCl₄, 660 µl, 5,58 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se concentró a presión reducida, se diluyó con cloroformo (100 ml) y se trató con una solución acuosa saturada fría de NaHCO₃ (100 ml). La mezcla se filtró sobre celita, y el precipitado se lavó con cloroformo caliente. Los filtrados se combinaron, se lavaron con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron (Na₂SO₄), y se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (3-5%) en diclorometano] para proporcionar 20.

Ejemplo 14 de referencia: Preparación de 9-(4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-8-metiladenina - (21)

- 20 El compuesto del título se puede preparar según el procedimiento publicado en 20 (Waga, T.; Nishizaki, T.; Miyakawa, I.; Orhui, H.; Meguro, H. "Synthesis of 4'-C-methylnucleosides" Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993, 57, 1433-1438).

- 25 Se agitó una solución de 20 en amoníaco metanólico (previamente saturado a -10° C) (50 ml) a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (100 ml) y agua (100 ml). La capa acuosa se lavó con cloruro de metileno (2x 100 ml), y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (10-30%) en acetato de etilo] para proporcionar 21.

Ejemplo 15 de referencia: Preparación de 1-(5-O-benzoil-4-C-metil-2,3-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-6-metiluracilo- (8)

- 30 Se trató una suspensión de 6-metiluracilo con hexametildisilazano (HMDS, 21 ml) y una cantidad catalítica de sulfato amónico durante 17 horas bajo reflujo. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se evaporó bajo presión reducida, y el residuo, obtenido como un aceite incoloro, se diluyó con 1,2-dicloroetano anhidro (7,5 ml). A la solución resultante se añadió 7 (0,99 g, 2,51 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (14 ml), seguido de la adición de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSTf, 0,97 ml, 5,02 mmoles). La solución se agitó durante 2,5 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, después se diluyó con cloroformo (150 ml), se lavó con el mismo volumen de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua (2x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y después se evaporó a presión reducida. El material en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (0-2%) en cloroformo] para proporcionar 8 puro.

Ejemplo 16 de referencia: Preparación de 1-(4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-6-metiluracilo - (9)

- 40 El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado en 8 (Waga, T.; Nishizaki, T.; Miyakawa, I.; Orhui, H.; Meguro, H. "Synthesis of 4'-C-methylnucleosides" Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993, 57, 1433-1438).

- 45 Se agitó una solución de 8 en amoníaco metanólico (previamente saturado a -10° C) (27 ml) a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (40 ml) y agua (40 ml). La capa acuosa se lavó con cloruro de metileno (2x 40 ml), se concentró a presión reducida y se evaporó varias veces conjuntamente con etanol absoluto. La recristalización en una mezcla de etanol absoluto/metanol dió 9.

Ejemplo 17 de referencia: Preparación de 1-(5-O-benzoil-4-C-metil-2,3-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-4-tio-6-metiluracilo- (10)

- 50 Se añadió reactivo de Lawesson (926 mg, 2,29 mmoles) bajo argón a una solución de 8 en 1,2-dicloroetano anhidro (65 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a reflujo. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (1-2%) en cloroformo] para proporcionar 10 puro.

Ejemplo 18 de referencia: Preparación de 1-(4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-4-tio-6-metiluracilo - (11)

Se agitó una solución de 10 en amoníaco metanólico (previamente saturado a -10° C) (27 ml) a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (40 ml) y agua (40 ml). La capa acuosa se lavó con cloruro de metileno (2x 40 ml), y se concentró bajo presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (5-7%) en cloruro de metileno] para dar 11, que se liofilizó.

Ejemplo 19 de referencia: Preparación de 1-(4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-6-metilcitosina, forma de clorhidrato - (12)

Se trató el compuesto 11 con amoníaco metanólico (previamente saturado a -10° C), (12 ml) a 100° C en una bomba de acero inoxidable durante 3 horas, después se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (40 ml) y agua (40 ml). La capa acuosa se lavó con cloruro de metileno (2x 40 ml), y se concentró bajo presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: cloruro de metileno/metanol/hidróxido amónico 65:30:5]. Las fracciones recogidas se evaporaron a presión reducida y en etanol absoluto (6,3 ml). Se añadió a la solución una solución 2N de ácido clorhídrico (1,5 ml) y la mezcla se agitó antes de ser concentrada bajo presión reducida. El procedimiento se repitió dos veces y 12 se precipitó en etanol absoluto.

Ejemplo 20 de referencia: Preparación de 1-(5-O-benzoil-4-C-metil-2,3-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-6-metiluracilo - (13)

Se trató una suspensión de 6-metiluracilo con hexametildisilazano (HMDS, 17 ml) y una cantidad catalítica de sulfato amónico durante la noche bajo reflujo. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se evaporó bajo presión reducida, y el residuo, obtenido como un aceite incoloro, se diluyó con 1,2-dicloroetano anhidro (6 ml). A la solución resultante se añadió 7 (1,0 g, 2,53 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (14 ml), seguido de la adición de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSf, 0,98 ml, 5,06 mmoles). La solución se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, después se diluyó con cloroformo (150 ml), se lavó con el mismo volumen de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua (2x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y después se evaporó a presión reducida. El material en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: 2% de metanol en cloroformo] para proporcionar 13 puro.

Ejemplo 21 de referencia: Preparación de 1-(4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-6-metiluracilo - (14)

El compuesto del título se puede preparar según un procedimiento publicado a partir de 13 (Waga, T.; Nishizaki, T.; Miyakawa, I.; Orhui, H.; Meguro, H. "Synthesis of 4'-C-methylnucleosides" Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993, 57, 1433-1438).

Se agitó una solución de 13 en amoníaco metanólico (previamente saturado a -10° C) (60 ml) a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (60 ml) y agua (60 ml). La capa acuosa se lavó con cloruro de metileno (2x 60 ml), se concentró a presión reducida y se evaporó varias veces conjuntamente con etanol absoluto. La recristalización de metanol dio 14.

Ejemplo 22 de referencia: Preparación de 1-(5,2,3-tri-O-acetil-4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-6-metiluracilo - (15)

Se trató una solución de 14 en piridina anhidra (7,4 ml) con anhídrido acético (1,2 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (0-5%) en diclorometano] para proporcionar 15.

Ejemplo 23 de referencia: Preparación de 1-(5,2,3-tri-O-acetil-4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-4-tio-6-metiluracilo - (16)

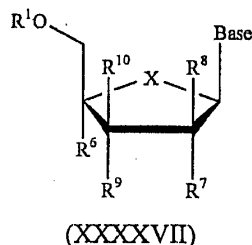
Se añadió reactivo de Lawesson (119 mg, 0,29 mmoles) bajo argón a una solución de 15 en 1,2-dicloroetano anhidro (11 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a reflujo. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente escalonado de metanol (1-2%) en cloroformo] para proporcionar 16.

Ejemplo 24: Preparación de 1-(4-C-metil-β-D-ribofuranosil)-5-metil-6-metilcitosina - (17), forma de clorhidrato (ejemplo de referencia)

Se trató el compuesto 16 con amoníaco metanólico (previamente saturado a -10°C), (10 ml) a 100° C en una bomba de acero inoxidable durante 3 horas, después se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se repartió entre cloruro de metileno (30 ml) y agua (30 ml). La capa acuosa se lavó con cloruro de metileno (2x 30 ml), y se concentró bajo presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente: 20% metanol en cloruro de metileno] para proporcionar 17. Este

compuesto se disolvió en EtOH 100 (1,5 ml), se trató con una solución de ácido clorhídrico 2N (0,3 ml), y la mezcla se agitó antes de ser concentrada bajo presión reducida. El procedimiento se repitió dos veces y 17 se precipitó en etanol absoluto.

- Alternativamente, se preparan los siguientes nucleósidos de fórmula XXXXVII, usando el azúcar apropiado y las bases de pirimidina o purina apropiadas, en donde los sustituyentes son como se definen en las reivindicaciones.



VIII. Ensayos biológicos

Un número de ensayos están disponibles para determinar la potencia de los compuestos de prueba frente a los virus. Varios de estos ensayos biológicos se describen en los ejemplos a continuación.

10 Ejemplo 25: Actividad anti-flavivirus o anti-pestivirus

Los compuestos pueden exhibir actividad anti-flavivirus o anti-pestivirus mediante la inhibición de la actividad de la polimerasa de los flavivirus o pestivirus, mediante la inhibición de otras enzimas necesarias en el ciclo de replicación, o por otras vías.

Ensayo de fosforilación de nucleósidos a trifosfato activo

- 15 Para determinar el metabolismo celular de los compuestos, las células HepG2 se obtienen a partir de the American Type Culture Collection (Rockville, MD), y se cultivan en frascos de cultivo celular de 225 cm² en medio esencial mínimo suplementado con aminoácidos no esenciales, y 1% penicilina-estreptomicina. El medio se renueva cada tres días, y las células se subcultivan una vez a la semana. Después de la separación de la monocapa adherente con una exposición de 10 minutos a 30 ml de tripsina-EDTA y tres lavados consecutivos con medio, las células HepG2
- 20 confluentes se siembran a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células por pocillo en una placa de 6 pocillos y son expuestas a 10 μ M del compuesto activo marcado con [³H] (500 dpm/pmol) por periodos de tiempo específicos. Las células se mantienen a 37° C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. En los puntos de tiempo seleccionados, las células se lavan tres veces con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo (PBS). El compuesto activo intracelular y sus metabolitos respectivos se extraen incubando la pellet celular durante la noche a -20° C con 60% de metanol
- 25 seguido por extracción con 20 μ l de metanol frío adicional durante una hora en un baño de hielo. Después los extractos se combinan, se secan bajo un flujo de aire filtrado suave y se almacenan a -20° C hasta el análisis por HPLC.

Ensayo de biodisponibilidad en monos Cynomolgus.

- 30 Dentro de una semana antes de la iniciación del estudio, al mono cynomolgus se le implanta quirúrgicamente un catéter venoso crónico y puerto de acceso venoso subcutáneo (VAP) para facilitar la recogida de sangre y se les somete a un examen físico incluyendo evaluaciones de hematología y química del suero y se registra el peso corporal. Cada mono (seis en total) recibe aproximadamente 250 μ Ci de actividad ³H con cada dosis de compuesto activo a un nivel de dosis de 10 mg/kg en una concentración de dosis de 5 mg/ml, ya sea a través de un bolo intravenoso (3 monos, IV), o a través de una sonda nosogástrica (3 monos, PO). Cada jeringa dosificadora se pesa
- 35 antes de la dosificación para determinar gravimétricamente la cantidad de formulación administrada. Las muestra de orina se recogen a través de la captura en los intervalos designados (aproximadamente 18-0 horas antes de la dosis, 0-4, 4-8 y 8-12 horas después de la dosis) y se procesan. Las muestras de sangre se recogen también (antes de la dosis, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8, 12 y 24 horas después de la dosis) vía el catéter venoso crónico y VAP o de un vaso periférico si el procedimiento del catéter venoso crónico no fuera posible. Las muestras de sangre y orina se
- 40 analizan para la concentración máxima (C_{max}), momento en el que la concentración máxima se alcanza (T_{max}), el área bajo la curva (AUC), la semivida de la concentración de dosificación (T_{1/2}), el aclaramiento (CL), el volumen en el estado de equilibrio y la distribución (V_{ss}) y la biodisponibilidad (F).

Ensayo de toxicidad de la médula ósea

- 45 Células de médula ósea humana se recogen de voluntarios sanos normales y la población mononuclear se separa por centrifugación de gradiente de Ficoll-Hypaque como se describió previamente por Sommadossi J-P, Carlisle R. "Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro" Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1987; 31: 452-454; y Sommadossi J-P, Schinazi RF, Chu CK, Xie M-Y. "Comparison of cytotoxicity of the (-)- and (+)-enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-

thiacytidine in normal human bone marrow progenitor cells" Biochemical Pharmacology 1992; 44:1921-1925. Los ensayos de cultivo para CFU-GM y BFU-E se llevaron a cabo usando un agar blando bicapa o por el método de la metilcelulosa. Los fármacos se diluyen en medio de cultivo tisular y se filtran. Después de 14 a 18 días a 37° C en un ambiente humidificado del 5% de CO₂ en el aire, las colonias de más de 50 células se cuentan usando un microscopio invertido. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de formación de colonias en presencia de fármacos en comparación con cultivos de control con disolvente.

Ensayo de toxicidad de mitocondria

Las células HepG2 se cultivan en placas de 12 pocillos como se ha descrito anteriormente y se expone a diversas concentraciones de fármacos como se enseña por Pan-Zhou X-R, Cui L, Zhou X-J, Sommadossi J-P, Darley-Usmer VM. "Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells" Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44:496-503. Los niveles de ácido láctico en el medio de cultivo después de la exposición al fármaco 4 días se miden usando un kit de ensayo de ácido láctico Boehringer. Los niveles de ácido láctico se normalizan para el número de células como se mide por conteo de hemocitómetro.

Ensayo de citotoxicidad

Las células se siembran a un ritmo de entre 5×10^3 y 5×10^4 /pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento durante la noche a 37° C en un ambiente de CO₂ (5%) humidificado. A continuación se añade medio de cultivo nuevo que contiene diluciones seriadas de los fármacos. Después de la incubación durante 4 días, los cultivos se fijan en TCA al 50% y se tiñen con sufurodamina B. La densidad óptica se leyó a 550 nm. La concentración citotóxica se expresó como la concentración requerida para reducir el número de células en un 50% (CC₅₀).

Ensayo de protección celular (CPA)

El ensayo se realiza esencialmente como se describe por Baginski, SG; Pevear, D. C.; Seipel, M.; Sun, S. C. C.; Benetatos, C. A.; Chunduru, S. K.; Rice, C. M. y M. S. Collett "Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound" PNAS USA 2000, 97(14), 7981-7986. Células MDBK (ATCC) se siembran en placas de cultivo de 96 pocillos (4.000 células por pocillo) 24 horas antes de su uso. Después de la infección con VDVB (cepa NADL, ATCC) en una multiplicidad de infección (MOI) de 0,02 unidades formadoras de placa (ufp) por célula, se añaden diluciones seriadas de los compuestos de prueba tanto para las células infectadas como las no infectadas en una concentración final de 0,5% de DMSO en medio de crecimiento. Cada dilución se ensaya por cuadruplicado. Las densidades celulares e inóculos de virus se ajustan para asegurar el crecimiento celular continuo durante todo el experimento y para lograr más del 90% de destrucción celular inducida por el virus en los controles no tratados después de cuatro días después de la infección. Después de cuatro días, las placas se fijan con TCA al 50% y se tiñen con sufurodamina B. La densidad óptica de los pocillos se lee en un lector de microplacas a 550nm. Los valores de concentración efectiva del 50% (EC₅₀) se definen como la concentración del compuesto que logra la reducción del 50% del efecto citopático del virus.

Ensayo de reducción de placas

Para cada compuesto la concentración eficaz se determina en placas de 24 pocillos en duplicado mediante ensayos de reducción de placas. Las monocapas de células se infectan con 100 ufp/pocillo de virus. Después diluciones en serie de compuestos de prueba en MEM suplementado con 2% de suero inactivado y 0,75% de metilcelulosa se añaden a las monocapas. Los cultivos se incuban adicionalmente a 37° C durante 3 días, después se fijan con etanol al 50% y violeta cristal al 0,8%, y se lavan y secan al aire. A continuación, las placas se cuentan para determinar la concentración para obtener el 90% de supresión del virus.

Ensayo de reducción del rendimiento de la carga vírica

Para cada compuesto se determina la concentración para obtener una reducción de 6-log en la carga vírica en placas de 24 pocillos por duplicado mediante ensayos de reducción del rendimiento. Los ensayos se llevan a cabo como se describió por Baginski, S. G; Pevear, D. C.; Seipel, M.; Sun, S. C. C.; Benetatos, C. A.; Chunduru, S. K.; Rice, C. M. y M. S. Collett "Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound" PNAS USA 2000, 97(14), 7981-7986, con modificaciones menores. Brevemente, las células MDBK se siembran en placas de 24 pocillos (2×10^5 células por pocillo) 24 horas antes de la infección con VDVB (cepa NADL) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 ufp por célula. Diluciones seriadas de los compuestos de prueba se añaden a las células en una concentración final de 0,5% DMSO en medio de crecimiento. Cada dilución se ensaya por triplicado. Después de tres días, los cultivos de células (monocapas de células y sobrenadantes) se lisan mediante tres ciclos de congelación-descongelación y el rendimiento de virus se cuantifica mediante el ensayo de placa. Brevemente, las células MDBK se siembran en placas de 6 pocillos (5×10^5 células por pocillo) 24 horas antes de su uso. Las células se inoculan con 0,2 ml de lisados de prueba durante 1 hora, se lavan y se cubren con 0,5% de agarosa en medio de crecimiento. Después de 3 días, las monocapas de células se fijan con 3,5% de formaldehído y se tiñen con 1% de violeta cristal (p/v en etanol al 50%) para visualizar las placas. Las placas se cuentan para determinar la concentración para obtener una reducción de 6-log en la carga vírica.

Ejemplo 26 de referencia: Actividad antivírica in vitro

5 La actividad antivírica ha sido probada en las siguientes líneas celulares: MT-4 para VIH; Vero 76, células de riñón de mono verde africano para el SARS; BHK para el virus de la diarrea vírica bovina; Sb-1 para el poliovirus tipo 1 Sabin; CVB-2, CVB-3, CVB-4, y CVA-9 para el virus Cocksackie B-2, B-3, B-4 y A-9; y REO-1 para los virus de ARN de doble cadena. Nota: BVDV = virus de la diarrea vírica bovina; YFV = virus de la fiebre amarilla; DENV = virus del dengue; WNV = virus del Nilo Occidental; CVB-2 = virus Cocksackie B-2 ; Sb-1 = virus de la poliomeilitis tipo Sabin 1; y REO = Reovirus de ARN de doble cadena.

Resultados CC₅₀ y EC₅₀ de la prueba para β-D-2'-C-metil-7-metil-6-fenil-3,3a,5,8a-tetrahidro-1,3,4,5,7a-penta-aza-s-indacen-8-ona (Compuesto F)

	CC ₅₀	CC ₅₀	CC ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀
Compuesto	MT-4	Vero 76	BHK	Sb-1	CVB-2	CVB-3	CVB-4	CVA-9	REO- 1
F	>100	>100	>100	43	37	49	39	60	2

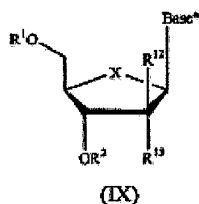
10

Resultados CC₅₀ de la prueba para β-D-2'-C-metil-7-metil-6-fenil-3,3a,5,8a-tetrahidro-1,3,4,5,7a-penta-aza-s-indacen-8-ona (Compuesto F)

	CC ₅₀							
Compuesto		BVDV	YFV	DENV 2	WNV	CVB-2	Sb-1	REO
F	>100	10	2,5	1,3	1	37	43	2

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (IX):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 5 R^1 y R^2 son independientemente H; fosfato; alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica; acilo; CO-alquilo; CO-arilo; CO-alcoxialquilo; CO-ariloxialquilo; arilo CO-sustituido; éster de sulfonato; bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; alquilsulfonilo; arilsulfonilo; aralquilsulfonilo; un lípido; un aminoácido; un hidrato de carbono; un péptido; o un colesterol;

X es O;

- 10 la Base* es una base de purina o pirimidina;

R^{12} es $C(Y^3)_3$;

Y^3 es H; y

R^{13} es flúor.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R^1 y R^2 son H.

- 15 3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

R^1 es H; fosfato; alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica; acilo; CO-alquilo; CO-arilo; CO-alcoxialquilo; CO-ariloxialquilo; arilo CO-sustituido; éster de sulfonato; bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; alquilsulfonilo; arilsulfonilo; aralquilsulfonilo; un lípido; un aminoácido; un hidrato de carbono; un péptido; o un colesterol; y

- 20 R^2 es fosfato; alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica; acilo; CO-alquilo; CO-arilo; CO-alcoxialquilo; CO-ariloxialquilo; arilo CO-sustituido; éster de sulfonato; bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; alquilsulfonilo; arilsulfonilo; aralquilsulfonilo; un lípido; un aminoácido; un hidrato de carbono; un péptido; o un colesterol.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

- 25 R^1 es H; fosfato; alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica; acilo; CO-alquilo; CO-arilo; CO-alcoxialquilo; CO-ariloxialquilo; arilo CO-sustituido; éster de sulfonato; bencilo, en donde el grupo fenilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; alquilsulfonilo; arilsulfonilo; aralquilsulfonilo; un lípido; un aminoácido; un hidrato de carbono; un péptido; o un colesterol;

R^2 es acilo; y

- 30 Base* es timina, uracilo, guanina, citosina, adenina, hipoxantina, 5-fluorouracilo, o 5-fluorocitosina.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde Base* es citosina, uracilo, guanina, adenina, o timina.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para el tratamiento de un anfitrión infectado con un virus Flaviviridae.

- 35 7. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde el virus es el de la hepatitis C.

8. El compuesto para uso de la reivindicación 6,

en donde el método comprende la administración del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación o alternancia con un segundo agente antivírico; o

- 40 en donde el método comprende la administración del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un segundo o más agentes antivíricos.

9. El compuesto para uso de la reivindicación 8, en donde el segundo agente antivírico se selecciona del grupo que consiste en un interferón, una ribavirina, una interleucina, un inhibidor de proteasa NS3, un inhibidor de proteasa de cisteína, una fenantrenoquinona, un derivado de tiazolidina, una tiazolidina, una benzanilida, una fenantrenoquinona, un inhibidor de helicasa, un inhibidor de polimerasa, un análogo de nucleótido, una gliotoxina, una cerulenina, un oligodesoxinucleótido de fosforotioato antisentido, un inhibidor de la traducción dependiente de IRES, y una ribozima.
10. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en donde el segundo agente antivírico es un interferón.
11. El compuesto para uso de la reivindicación 10, en donde el segundo agente antivírico se selecciona del grupo que consiste en interferón alfa 2a pegilado, interferón alfacon-1, interferón natural, albuferón, interferón beta-1a, interferón omega, interferón alfa, interferón gamma, interferón tau, interferón delta e interferón gamma-1b.
12. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo está en la forma de una dosificación unitaria.
13. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en donde la dosificación unitaria contiene de 50 a 1000 mg o de 0,1 a 50 mg del compuesto.
14. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en donde la dosificación unitaria es un comprimido o cápsula.
15. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde el anfitrión es un ser humano.
16. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo está en forma sustancialmente pura.
17. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es al menos 90% en peso del isómero β -D.
18. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es al menos 95% en peso del isómero β -D.
19. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde el compuesto está en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo que consiste en tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, α -glicerofosfato, formiato, fumarato, propionato, glicolato, lactato, piruvato, oxalato, maleato, salicilato, sulfato, nitrato, bicarbonato, sales de carbonato, bromhidrato, clorhidrato, di-clorhidrato, y sal de ácido fosfórico.
20. El compuesto para uso de la reivindicación 19, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de clorhidrato.
21. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz para tratar una infección por Flaviviridae de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el vehículo es adecuado para la administración oral.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, que comprende una cantidad eficaz del compuesto o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar a un anfitrión infectado con el virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla, el virus del dengue o VDVB.
24. La composición de la reivindicación 21, en donde el virus Flaviviridae es el de la hepatitis C.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está en la forma de una dosificación unitaria.
26. La composición de la reivindicación 25, en donde la dosis unitaria contiene de 0,1 a 50 mg o de 50 a 1000 mg del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
27. La composición de la reivindicación 25, en donde dicha dosificación unitaria es un comprimido o cápsula.
28. La composición farmacéutica de la reivindicación 21.
que además comprende un segundo agente antivírico; o
que además comprende un segundo o más agentes antivíricos.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, en donde el segundo agente antivírico se selecciona del grupo que consiste en un interferón, una ribavirina, una interleucina, un inhibidor de proteasa NS3, un inhibidor de proteasa de cisteína, una fenantrenoquinona, un derivado de tiazolidina, una tiazolidina, una benzanilida, una fenantrenoquinona, un inhibidor de helicasa, un inhibidor de polimerasa, un análogo de nucleótido, una gliotoxina, una cerulenina, un oligodesoxinucleótido de fosforotioato antisentido, un inhibidor de la traducción dependiente de IRES, y una ribozina.
30. La composición farmacéutica de la reivindicación 29, en donde el segundo agente antivírico es un interferón.
31. La composición farmacéutica de la reivindicación 30, en donde el segundo agente antivírico se selecciona del grupo que consiste en interferón alfa 2a pegilado, interferón alfacon-1, interferón natural, albuferón, interferón beta-1a, interferón omega, interferón alfa, interferón gamma, interferón tau, interferón delta e interferón gamma-1b.
32. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está en forma sustancialmente pura.
33. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es al menos 90% en peso del isómero β -D.
34. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es al menos 95% en peso del isómero β -D.
35. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administración oral, parenteral, por inhalación o intravenosa.
36. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en un tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, α -glicerofosfato, formiato, fumarato, propionato, glicolato, lactato, piruvato, oxalato, maleato, salicilato, sulfato, nitrato, bicarbonato, sales de carbonato, bromhidrato, clorhidrato, diclorhidrato, y sal de ácido fosfórico.
37. La composición farmacéutica de la reivindicación 36, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de clorhidrato.

Figura 1: Estructura química de nucleósidos ilustrativos

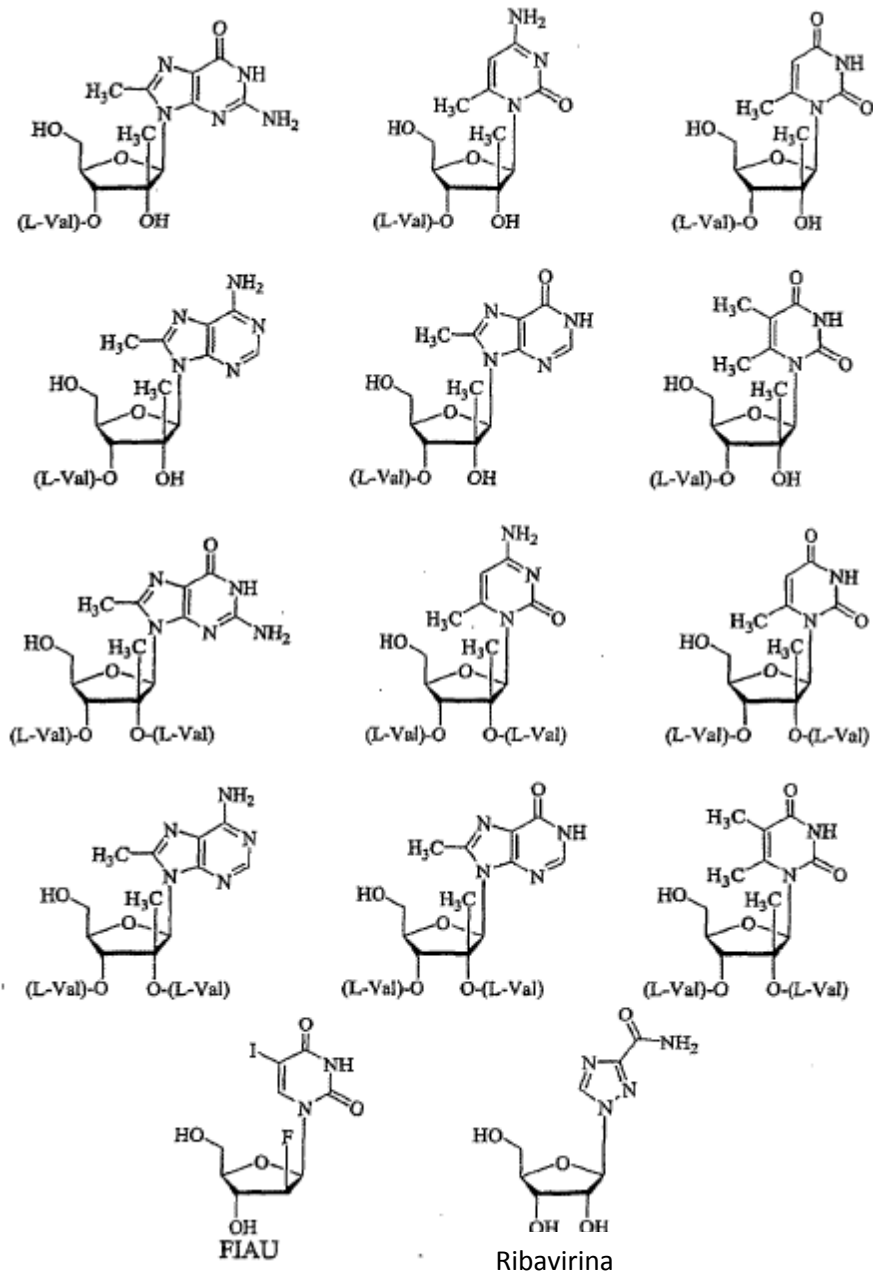


Figura 2

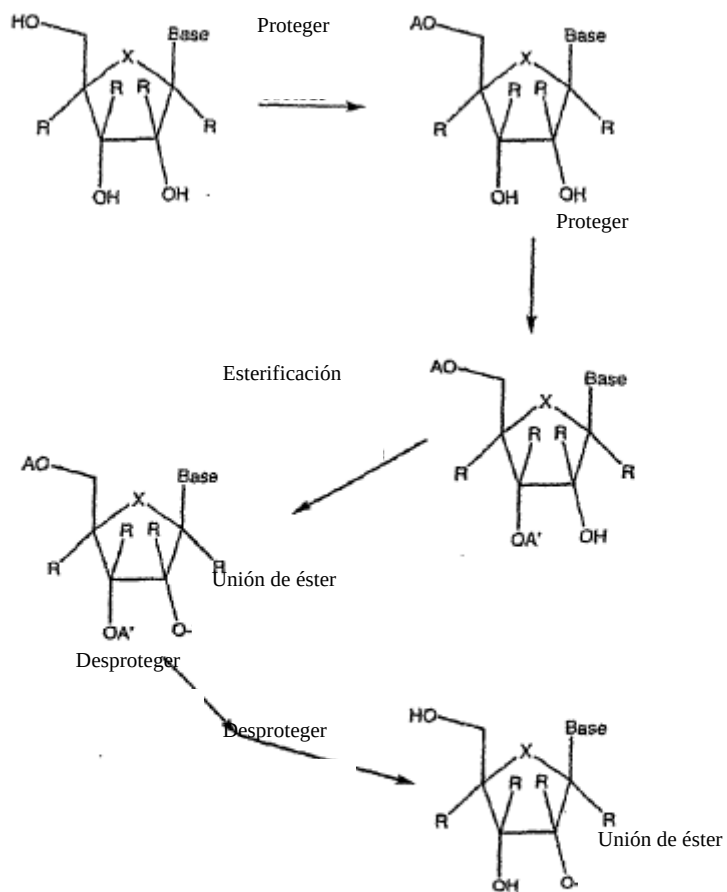


Figura 3

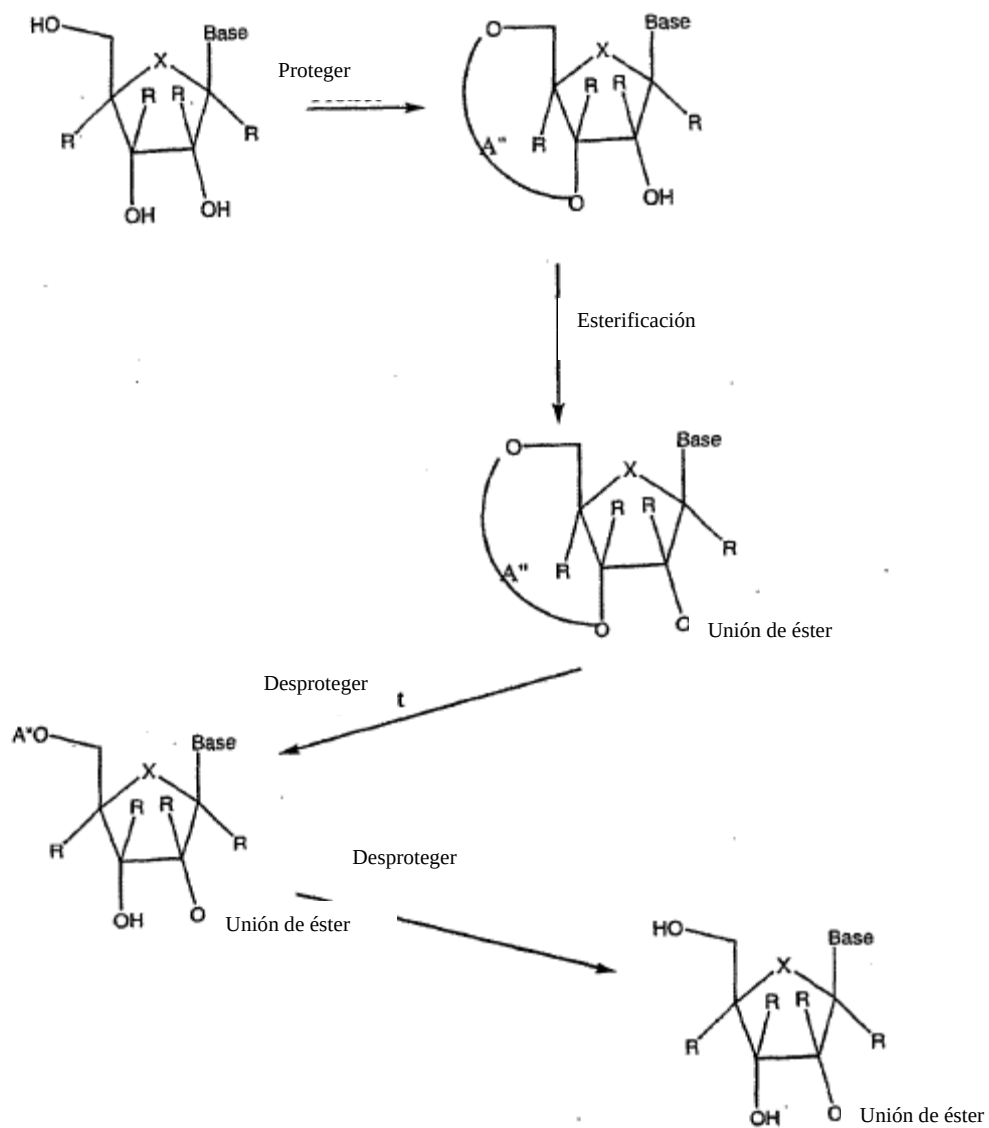


Figura 4

