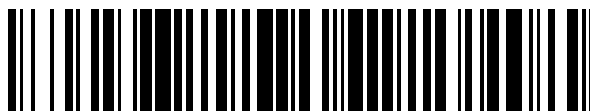


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 598**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)
C07H 19/10 (2006.01)
C07H 19/067 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
C07D 493/10 (2006.01)
C07H 15/18 (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)
C07D 201/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010 E 12176402 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2511282**

54 Título: **Espironucleósidos oxetánicos uracilicos**

30 Prioridad:

14.05.2009 EP 09160215

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

17.07.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JONCKERS, TIM HUGO MARIA;
RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD;
VANDYCK, KOEN;
VAN HOOF, STEVEN MAURICE PAULA;
HU, LILI y
TAHRI, ABDELLAH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 477 598 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

Espironucleósidos oxetánicos uracilicos

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a espironucleósidos oxetánicos uracilicos que son inhibidores del virus de la hepatitis C (HCV – siglas en inglés).

10 HCV es un virus de ARN de cadena sencilla y de sentido positivo que pertenece a la familia de virus *Flaviviridae* en el género hepacivirus. La región NS5B del poligén de ARN codifica una ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp), que es esencial para la replicación viral. Después de la infección aguda inicial, una mayoría de los individuos infestados desarrolla hepatitis crónica, debido a que el HCV se replica preferentemente en hepatocitos, pero no es directamente citotático. En particular, parece ser que la carencia de una respuesta a linfocitos T vigorosa y la elevada propensión del virus a mutar fomentan una elevada tasa de infección crónica. La hepatitis crónica puede progresar a fibrosis hepática, conduciendo a cirrosis, enfermedad hepática en fase terminal y HCC (carcinoma hepatocelular), haciendo que dicha hepatitis sea la causa principal de trasplantes de hígado. Existen seis genotipos principales de HCV y más de 50 subtipos, los cuales están distribuidos geográficamente de manera diferente. El genotipo 1 de HCV es el genotipo predominante en Europa y en los Estados Unidos de América. La amplia heterogeneidad genética de HCV tiene importantes implicaciones diagnósticas y clínicas, que quizás expliquen las dificultades en el desarrollo de la vacuna y la carencia de respuesta a la terapia actual.

La transmisión de HCV puede producirse a través del contacto con sangre o productos de la sangre contaminados, por ejemplo después de una transfusión de sangre o el uso intravenoso de un fármaco. La introducción de ensayos diagnósticos utilizados en el rastreo de la sangre ha conducido a una tendencia descendente en la incidencia de HCV post-transfusión. Sin embargo, dado el lento progreso a la enfermedad hepática de fase terminal, las infecciones existentes continuarán presentando una seria carga médica y económica durante décadas.

La actual terapia contra el HCV se basa en interferón-alfa (IFN- α) (pegilado) en combinación con ribavirina. Esta terapia de combinación proporciona una respuesta virológica sostenida en más del 40% de los pacientes infestados por el genotipo 1 de HCV, y en aproximadamente el 80% de los infestados por los genotipos 2 y 3. Además de la eficacia limitada contra el genotipo 1 de HCV, esta terapia de combinación tiene importantes efectos secundarios y es deficientemente tolerada en muchos pacientes. Efectos secundarios principales incluyen síntomas similares a la influenza, anomalías hematológicas y síntomas neuropsiquiátricos. Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos más eficaces, convenientes y mejor tolerados.

La experiencia con fármacos contra el HIV, en particular con inhibidores de la proteasa del HIV, ha enseñado que farmacocinéticas sub-óptimas y regímenes de dosificación complejos resultan rápidamente en fracasos de conformidad involuntarios. A su vez, esto significa que el punto mínimo de concentración durante 24 horas (concentración en plasma mínima) para los fármacos respectivos en un régimen de HIV cae frecuentemente por debajo del umbral de CI_{90} o DE_{90} durante grandes partes del día. Se considera que un nivel de punto mínimo de concentración durante 24 horas de al menos la CI_{50} y, de manera más realista, la CI_{90} o DE_{90} , es esencial para ralentizar el desarrollo de mutantes de escape de fármacos. El conseguir la farmacocinética necesaria y el metabolismo de fármacos para permitir niveles de punto mínimo de concentración de este tipo proporciona un reto riguroso al diseño del fármaco.

La RdRp de NS5B es esencial para la replicación del genoma de ARN de HCV de cadena sencilla y de sentido positivo. Esta enzima ha adquirido un interés importante entre los químicos medicinales. Se conocen tanto inhibidores nucleósidos como no nucleósidos de NS5B. Los inhibidores nucleósidos pueden actuar como un terminador de la cadena o como un inhibidor competitivo, o como ambos. Con el fin de ser activos, los inhibidores de nucleósidos han de ser absorbidos por la célula y convertidos *in vivo* en un trifosfato. Esta conversión en el trifosfato es mediada habitualmente por quinasas celulares que imparten requisitos estructurales adicionales a un potencial inhibidor nucleósido de la polimerasa. Además, esto limita la evaluación directa de nucleósidos en calidad de inhibidores de la replicación de HCV a ensayos basados en células capaces de fosforilación *in situ*.

Se han realizado varios intentos para desarrollar nucleósidos en calidad de inhibidores de RdRp de HCV, pero mientras que un puñado de compuestos ha entrado en desarrollo clínico, ninguno de ellos ha proseguido todo el camino hasta su registro. Entre los problemas con los que se han topado hasta la fecha los nucleósidos que fijan como objetivo HCV se encuentran la toxicidad, mutagenicidad, carencia de selectividad, deficiente eficacia, deficiente biodisponibilidad, regímenes de dosificación sub-óptimos, resultando en una elevada carga para las píldoras y en los costes de los artículos.

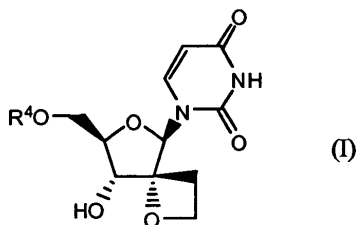
Existe la necesidad de inhibidores de HCV que puedan superar las desventajas de la actual terapia de HCV tales como efectos secundarios, eficacia limitada, la emergencia de resistencia y fracasos de conformidad, así como la mejora de la respuesta viral sostenida.

5 La presente invención se refiere a un grupo de derivados de 1-(8-hidroxi-7-(hidroximetil)-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-5-il)pirimidina-2,4-diona inhibidores de HCV con propiedades útiles en relación con uno o más de los siguientes parámetros: eficacia antiviral, perfil favorable de desarrollo de resistencia, carencia de toxicidad y genotoxicidad, farmacocinética y farmacodinámica favorables y facilidad de formulación y administración. Espironucleósidos oxetánicos, en particular 1-(2-O,2-C-etano-β-D-ribofuranosil)timina y 1-(2-O,2-C-etano-β-D-ribofuranosil)uracilo se han descrito en Org. Biomol. Chem. 2003, 3514-3526. Estos compuestos fueron sometidos a ensayo contra el HIV, pero no se encontró actividad alguna.

15 Otros profármacos de nucleósidos fosfatos se describen en los documentos WO 2006/012078, WO 2007/095269 o US 2007/004298. Compuestos de la invención también pueden ser atractivos debido al hecho de que carecen de actividad frente a otros grupos, en particular frente a HIV. Pacientes infestados con el HIV padecen, a menudo, coinfecciones tales como HCV. El tratamiento de este tipo de pacientes con un inhibidor de HCV, que también inhibe HIV, puede conducir al brote de cepas de HIV resistentes.

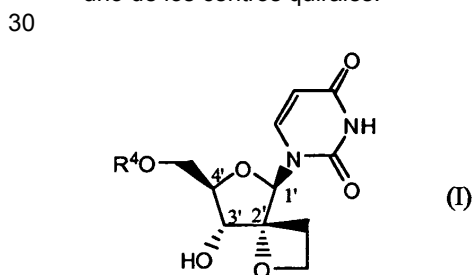
20 Descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos que pueden representarse por la fórmula I:



incluidos cualesquiera estereoisómeros posibles de los mismos, en donde:
R⁴ es un éster monofosfato, difosfato o trifosfato;

25 Los compuestos de fórmula I tienen varios centros de quiralidad, en particular en los átomos de carbono 1', 3' y 4'. A pesar de que la estereoquímica en estos átomos de carbono es fija, los compuestos pueden exhibir al menos un 75%, preferiblemente al menos un 90% tal como un exceso de 95% o de 98% de pureza enantiomérica en cada uno de los centros quirales.



35 En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de fórmula I o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento o la profilaxis (o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis) de una infección por HCV. Genotipos de HCV representativos en el contexto del tratamiento o la profilaxis de acuerdo con la invención incluyen el genotipo 1b (que predomina en Europa) o 1a (que predomina en Norte América). La invención proporciona también un método para el tratamiento o la profilaxis de una infección por HCV, en particular del genotipo 1a o 1b.

40 Los compuestos de fórmula I se representan como un estereoisómero definido, excepto el estereoisomerismo en el átomo de fósforo del grupo fosfoamidato. La configuración absoluta de este tipo de compuestos se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, difracción por rayos X o RMN y/o implicación a partir de materiales de partida de estereoquímica conocida. Composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención comprenderán preferiblemente formas estereoisoméricamente puras del estereoisómero indicado del compuesto de fórmula I particular.

45 Formas estereoisoméricas puras de los compuestos y compuestos intermedios según se mencionan en esta

memoria se definen como isómeros esencialmente exentos de otras formas enantioméricas o diastereoméricas de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o compuestos intermedios. En particular, la expresión “estereoisoméricamente puros” concierne a compuestos o compuestos intermedios con un exceso estereoisomérico de al menos 80% (es decir, un mínimo del 90% de un isómero y un máximo del 10% de los otros posibles isómeros) hasta un exceso estereoisomérico del 100% (es decir, 100% de un isómero y ninguno de los otros), más en particular compuestos o compuestos intermedios con un exceso estereoisomérico de 90% hasta 100%, incluso más en particular con un exceso estereoisomérico de 94% hasta 100% y, lo más particularmente, con un exceso estereoisomérico de 97% hasta 100%, o de 98% hasta 100%. Las expresiones “enantioméricamente puros” y “diastereoméricamente puros” deberían entenderse de una manera similar, pero con respecto al exceso enantiomérico y al exceso diastereomérico, respectivamente, de la mezcla en cuestión.

Formas estereoisoméricas puras de los compuestos y compuestos intermedios de esta invención se pueden obtener mediante la aplicación de procesos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enantiómeros se pueden separar uno de otro mediante la cristalización selectiva de sus sales diastereoméricas con ácidos o bases ópticamente activos. Ejemplos de los mismos son ácido tartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido ditoluitartárico y ácido canfosulfónico. Alternativamente, los enantiómeros se pueden separar por técnicas cromatográficas utilizando capas estacionarias quirales. Dichas formas estereoquímicamente isoméricas puras también se pueden derivar de las correspondientes formas estereoquímicamente isoméricas puras de los materiales de partida apropiados, con la condición de que la reacción se produzca de manera estereoespecífica. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetiza por métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

Los racematos diastereoméricos de los compuestos de fórmula I se pueden obtener por separado por métodos convencionales. Métodos de separación física apropiados que se pueden emplear ventajosamente son, por ejemplo, cristalización selectiva y cromatografía, p. ej. cromatografía en columna.

Las sales por adición farmacéuticamente aceptables comprenden el ácido no tóxico terapéuticamente activo y las formas de sales de adición de bases de los compuestos de fórmula I. De interés son las formas libres, es decir, no salinas, de los compuestos de fórmula I, o de cualquier subgrupo de compuestos de fórmula I especificados en esta memoria.

Las sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente tratando la forma de base con un ácido apropiado de este tipo. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálicos p. ej. ácido clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propiónico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir, ácido hidroxilbutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, cicláxico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y similares. A la inversa, dichas formas de sal se pueden convertir mediante tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

Los compuestos de fórmula I que contienen un protón de carácter ácido también se pueden convertir en sus formas de sales por adición de metales no tóxicos o de aminas mediante tratamiento con bases orgánicas e inorgánicas apropiadas. Formas de sales de bases apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, p. ej., las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares, sales con bases orgánicas, p. ej. las sales benzatina, *N*-metil-D-glucamina, hidrabamina, y sales con aminoácidos tales, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término “solvato” cubre cualesquiera solvatos farmacéuticamente aceptables que sean capaces de formar los compuestos de fórmula I así como las sales de los mismos. Solvatos de este de este tipo son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos, p. ej. etanolatos, propanolatos y similares.

Algunos de los compuestos de fórmula I también pueden existir en su forma tautomérica. Por ejemplo, formas tautoméricas de grupos amida (-C(=O)-NH-) son iminoalcoholes (-C(OH)=N-), que pueden ser estabilizados en anillos con carácter aromático. La base uridina es un ejemplo de una forma de este tipo. Formas de este tipo, aunque no se indica explícitamente en las fórmulas estructurales representadas en esta memoria, pretender ser incluidas dentro del alcance de la presente invención.

Tal como se utiliza en esta memoria, “alquilo C₁-C₄”, como un grupo o parte de un grupo, define radicales hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada, saturados, con 1 a 4 átomos de carbono tales como, por ejemplo, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo. “Alquilo C₁-C₆” abarca radicales alquilo C₁-C₄ y sus homólogos superiores con 5 ó 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 2-metil-1-butilo, 2-metil-1-pentilo, 2-etil-1-butilo, 3-metil-2-pentilo y

similares. De interés entre alquilo C₁-C₆ es alquilo C₁-C₄. "Alquilo C₁-C₁₀" comprende radicales C₁-C₆ y sus homólogos superiores con 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono tales como, por ejemplo, heptilo, 2-heptilo, 3-heptilo, 2-metilhexilo, octilo, 2-octilo, 3-octilo, nonilo, 2-nonilo, 3-nonilo, 2-butilpentilo, decilo, 2-decilo y similares. De interés entre alquil C₁-C₁₀ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₂ define metilo y etilo.

5 "Alcoxi C₁-C₆" significa un radical -O-alquilo C₁-C₆, en donde alquilo C₁-C₆ es como se define arriba. Ejemplos de alcoxi C₁-C₆ son metoxi, etoxi, n-propoxi o isopropoxi.

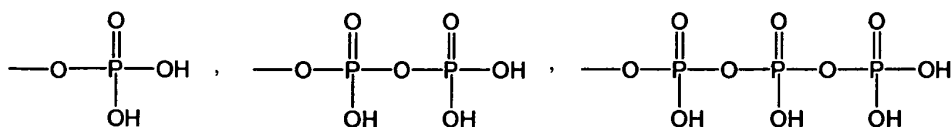
10 "Cicloalquilo C₃-C₆" incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. De interés es ciclopropilo.

El término "alqueno C₃-C₆", como un grupo o parte de un grupo, define radicales hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada con enlaces carbono-carbono saturados y al menos un doble enlace y que tienen de 3 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, 1-propenilo, 2-propenilo (o alilo), 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-metil-2-propenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 2-metil-2-butenilo, 2-metil-2-pentenilo y similares. De interés entre alqueno C₃-C₆ es alqueno C₃-C₄. De interés entre alqueno C₃-C₆ o alqueno C₃-C₄ son aquellos radicales con un doble enlace.

El término "halo" es genérico para flúor, cloro, bromo y yodo. En una realización, el término "fenil-alquilo C₁-C₆" es bencilo.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "(=O)" u "oxo" forma un resto carbonilo cuando está fijado a un átomo de carbono. Debe señalarse que un átomo sólo puede estar sustituido con un grupo oxo cuando la valencia de ese átomo así lo permite.

25 La expresión "éster monofosfato, difosfato o trifosfato" se refiere a grupos:



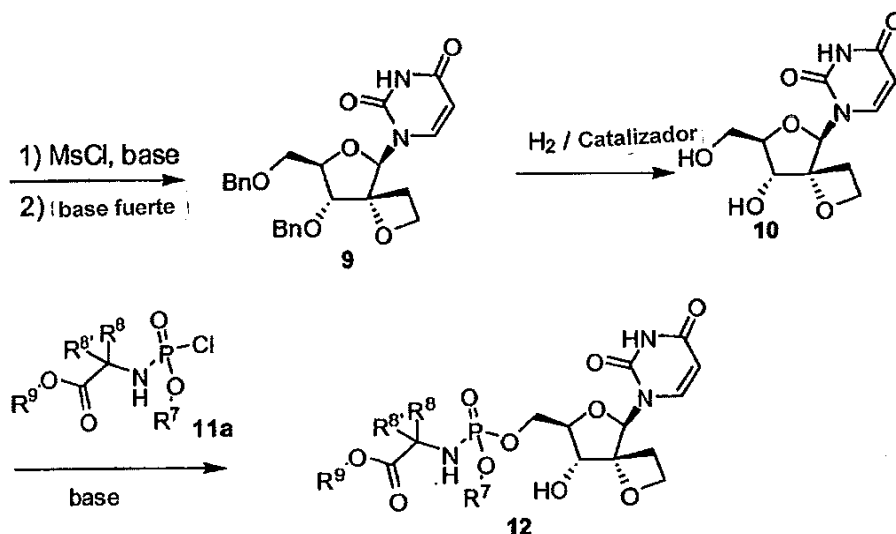
En los casos en los que la posición de un radical en un resto molecular no se especifica (por ejemplo un sustituyente en fenilo) o se representa por enlaces flotantes, dicho radical puede estar situado en cualquier átomo de un resto de este tipo, siempre que la estructura resultante sea químicamente estable. Cuando cualquier variable está presente más de una vez en la molécula, cada una de las definiciones es independiente.

Siempre que se utilice en esta memoria, la expresión "compuestos de fórmula I" o "los presentes compuestos" o términos o expresiones similares pretenden dar a entender que incluyen los compuestos de fórmula I, incluidas las posibles formas estereoquímicamente isoméricas y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

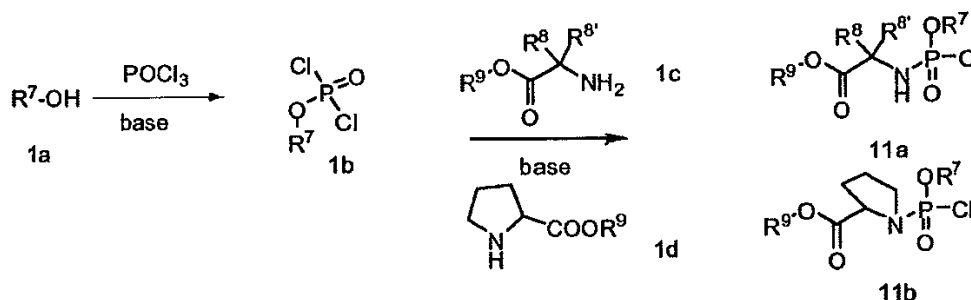
35 La presente invención incluye también compuestos de fórmula I marcados con isótopos o cualquier subgrupo de fórmula I, en donde uno o más de los átomos está reemplazado por un isótopo que difiere del o de los típicamente encontrados en la naturaleza. Ejemplos de isótopos de este tipo incluyen isótopos de hidrógeno tales como ²H y ³H; carbono tales como ¹¹C, ¹³C y ¹⁴C; nitrógeno tales como ¹³N y ¹⁵N; oxígeno tales como ¹⁵O, ¹⁷O y ¹⁸O; fósforo tales como ³¹P y ³²P, azufre tal como ³⁵S, flúor tal como ¹⁸F; cloro tal como ³⁶Cl; bromo tal como ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br y ⁸²Br y yodo tal como ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I y ¹³¹I. Compuestos marcados con isótopos de la invención se pueden preparar por procedimientos análogos en los descritos en esta memoria al utilizar los reactivos o materiales de partida marcados con isótopos apropiados o por técnicas conocidas en la técnica. La elección del isótopo incluido en un compuesto marcado con isótopos depende de la aplicación específica de ese compuesto. Por ejemplo, para ensayos de distribución en tejidos, se incorpora un isótopo radiactivo tal como ³H o ¹⁴C. Para aplicaciones de radio-imagen, será útil un isótopo que emita positrones tal como ¹¹C, ¹⁸F, ¹³N u ¹⁵O. La incorporación de deuterio puede proporcionar una mayor estabilidad metabólica, dando como resultado, p. ej., una semivida in vivo incrementada del compuesto o requisitos de dosificación reducidos.

50 Procesos de síntesis

El material de partida 1-[(4R,5R,7R,8R)-8-hidroxi-7-(hidroximetil)-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-5-il]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **10** se puede preparar como sigue. El compuesto intermedio **4** se puede obtener según se describe en *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3009-3012 y se hace reaccionar con bromuro de alil-magnesio para formar el compuesto intermedio **5**. El grupo hidroxí en este último se benzoila con cloruro de benzoilo en presencia de una base, por ejemplo una trialquilamina tal como trietilamina o *N,N*-dimetilpiridin-4-amina (DMAP), dando como resultado el compuesto intermedio **6**. Este último compuesto intermedio se activa con un ácido de Lewis, en



5 El éster del ácido fosforoamidoclorhídrico **11a** u **11b** se puede preparar haciendo reaccionar un alcohol **1a** con POCl₃ en presencia de una base, obteniendo así dicloruro de fosforilo **1b**, el cual se hace reaccionar adicionalmente con el aminoácido **1c** o **1d**.



10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I según se especifica en esta memoria, y un soporte farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede contener de 1% a 50%, o de 10% a 40% de un compuesto de fórmula I y el resto de la composición es dicho soporte. Una cantidad terapéuticamente eficaz en este contexto es una cantidad suficiente para actuar de un modo profiláctico frente a una infección por HCV, para inhibir HCV, para estabilizar o para reducir una infección por HCV, en sujetos infestados o sujetos que están en riesgo de ser infestados. Todavía en un aspecto adicional, esta invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición farmacéutica según se especifica en esta memoria, que comprende mezclar íntimamente un soporte farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I según se especifica en esta memoria.

20 Los compuestos de fórmula I o cualquier subgrupo de los mismos se pueden formular en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. En calidad de composiciones apropiadas se pueden citar todas las composiciones habitualmente empleadas para administrar sistémicamente fármacos. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal por adición o complejo metálico, en calidad de ingrediente activo se combina en mezcla íntima con un soporte farmacéuticamente aceptable, soporte que puede adoptar una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en forma de dosificación unitaria adecuada, particularmente para la administración por vía oral, rectal, percutánea, o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, cualquiera de los medios farmacéuticos habituales se puede emplear como tal, por ejemplo agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparados líquidos orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y disoluciones; o soportes sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas de dosificación unitarias orales más ventajosas, en cuyo caso se emplean obviamente soportes farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el soporte comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, a pesar de que pueden estar incluidos otros ingredientes, por ejemplo para ayudar a la solubilidad. Se pueden preparar, por ejemplo,

disoluciones inyectables en las que el soporte comprende una disolución salina, disolución de glucosa o una mezcla de disolución salina y de glucosa. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear soportes líquidos, agentes de suspensión y similares apropiados. También se incluyen preparados en forma sólida previstos para convertirse, poco antes del uso, en preparados en forma líquida. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el soporte comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, opcionalmente combinado con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no introducen un efecto perjudicial significativo en la piel. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar a través de inhalación oral o insuflación en forma de una disolución, una suspensión o un polvo seco utilizando cualquier sistema de suministro conocido en la técnica.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas antes mencionadas en forma de dosificación unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada una de las unidades una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosificación unitaria de este tipo son comprimidos (incluidos comprimidos con muesca o revestidos), cápsulas, píldoras, supositorios, paquetes de polvo, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables y similares, y múltiples segregados de los mismos.

Los compuestos de fórmula I muestran actividad frente a HCV y se pueden utilizar en el tratamiento y la profilaxis de una infección por HCV o enfermedades asociadas con el HCV. Éstas últimas incluyen fibrosis hepática progresiva, inflamación y necrosis que conduce a cirrosis, enfermedad hepática de fase terminal y HCC. Además, se piensa que un cierto número de los compuestos de esta invención son activos frente a cepas mutadas de HCV. Adicionalmente, muchos de los compuestos de esta invención muestran un perfil farmacocinético favorable y tienen propiedades atractivas en términos de biodisponibilidad, que incluyen una semivida aceptable, valores de AUC (área bajo la curva) y pico y que carecen de fenómenos desfavorables tales como un inicio rápido insuficiente y una retención en los tejidos.

La actividad antiviral *in vitro* frente a HCV de los compuestos de fórmula I se puede someter a ensayo en un sistema de replicación de HCV celular basado en Lohmann et al. (1999) *Science* 285:110-113, con las modificaciones adicionales descritas por Krieger et al. (2001) *Journal of Virology* 75: 4614-4624 (incorporada en esta memoria como referencia) que se ejemplifica adicionalmente en la sección de ejemplos. Este modelo, aunque no es un modelo de infección completo para HCV, es ampliamente aceptado como el modelo más consistente y eficaz de replicación de ARN de HCV autónoma actualmente disponible. Se apreciará que es importante distinguir entre compuestos que interfieren específicamente con funciones de HCV de aquellos que ejercen efectos citotóxicos o citostáticos en el modelo de replicación de HCV y, como consecuencia, provocan una disminución en el ARN de HCV o en la concentración de enzima informadora enlazada. En el sector se conocen ensayos para la evaluación de la citotoxicidad celular basados, por ejemplo, en la actividad de enzimas mitocondriales utilizando colorantes redox fluorogénicos tales como resazurina. Además de ello, existen tamices de recuento celular para la evaluación de la inhibición no selectiva de la actividad del gen informador enlazado tal como la luciferasa de luciérnaga. Tipos de células apropiados pueden ser equipados, mediante transfección estable, con un gen informador de luciferasa, cuya expresión depende de un promotor de gen constitutivamente activo, y este tipo de células se puede utilizar como un tamiz antagonista para eliminar inhibidores no selectivos.

Debido a sus propiedades anti-HCV, los compuestos de fórmula I, incluidos cualesquiera posibles isómeros, las sales o solvatos por adición farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles en el tratamiento de animales homeotermos, en particular seres humanos, infestados con HCV, y en la profilaxis de infecciones por HCV. Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse, por lo tanto, como una medicina, en particular como una medicina anti-HCV o inhibidora de HCV. La presente invención se refiere también al uso de los presentes compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por HCV. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para tratar a un animal homeotermo, en particular un ser humano, infestado por HCV, o que está en riesgo de ser infestado por HCV, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad anti-HCV eficaz de un compuesto de fórmula I según se especifica en esta memoria. Dicho uso como medicina o método de tratamiento comprende la administración sistémica a sujetos infestados por HCV o a sujetos susceptibles de infección por HCV de una cantidad eficaz para combatir las condiciones asociadas con la infección por HCV.

En general, se contempla que una cantidad diaria antiviral efectiva sería de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 200 mg/kg, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 175 mg/kg, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 mg/kg o de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal. Dosis diarias medias pueden obtenerse multiplicando estas

cantidades diarias por aproximadamente 70. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida en forma de dos, tres, cuatro o más sub-dosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas sub-dosis se pueden formular como formas de dosificación unitaria, por ejemplo que contienen aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5000 mg, o aproximadamente 50 hasta aproximadamente 3000 mg, o aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 mg, o aproximadamente 200 hasta aproximadamente 600 mg, o aproximadamente 100 hasta aproximadamente 400 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" tiene el significado conocido por la persona experta en la técnica. En determinadas realizaciones, el término "aproximadamente" se puede obviar y se da a entender la cantidad exacta. En otras realizaciones el término "aproximadamente" significa que el valor numérico que sigue al término "aproximadamente" está en el intervalo de $\pm 15\%$, o de $\pm 10\%$, o de $\pm 5\%$, o de $\pm 1\%$ de dicho valor numérico.

Ejemplos comparativos

Los siguientes esquemas pretenden sólo ser ilustrativos y de modo alguno limitar el alcance.

El análisis LC-MS se realizó utilizando uno de los siguientes métodos. Los datos de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker de 400 MHz.

HPLC condición A

Sistema: Waters Alliance 2695

Columna: Waters XTerra 2,5 μm 4,6 x 50 mm; temperatura de la columna: 55°C; caudal: 2 mL/min

Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM + HCOOH al 0,1% en H₂O

Fase móvil B: CH₃CN

Tiempo	%A	%B
0,00	85	15
3,00	5	95
4,20	5	95
4,30	85	15
5,40	85	15

HPLC condición B

Sistema: Waters Alliance 2695

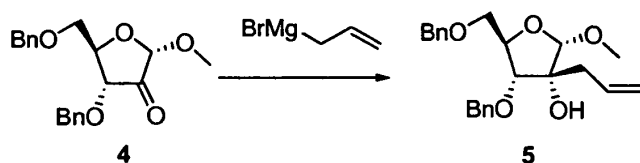
Columna: Hypercarb 3 μm 4,6 x 50 mm; temperatura de la columna: 50°C; caudal: 2 mL/min

Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM en H₂O/CH₃CN 1/9

Fase móvil B: acetato de amonio 10 mM en H₂O/CH₃CN 9/1

Tiempo	%A	%B
0,00	0	100
3,00	100	0
4,20	100	0
4,30	0	100
5,40	0	100

Ejemplo 1: (2S,3R,4R,5R)-3-alil-4-(benciloxi)-5-(benciloximetil)-2-metoxitetrahidrofuran-3-ol (**5**)

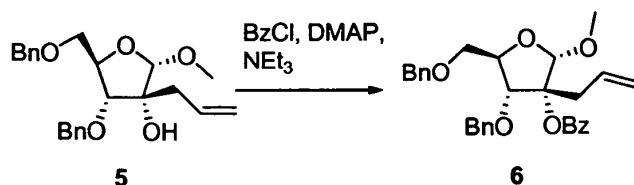


Bajo una atmósfera de argón, a una disolución de **4** (obtenida como en *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3009-3012) en tetrahidrofurano seco (THF; 400 mL) a -78°C se añadió bromuro de alil-magnesio (400 mL, 400 mmol; 1,0 M en dietiléter). Después de agitar la mezcla de reacción a -78°C durante 4 horas, se dejó que la mezcla de reacción se agitara a la temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se enfrió rápidamente con cuidado con cloruro de amonio acuoso saturado. La mezcla se extrajo con diclorometano y la capa orgánica se lavó con salmuera. El disolvente se separó y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (600 g de sílice) mediante elución de gradiente con acetato de etilo al 15% a 20% en hexano para dar el producto de reacción **5** en forma de un aceite incoloro (32,9 g, 70%).

HPLC Condición A, Rt: 2,97 min, $m/z = 402$ ($M+NH_4$)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,38-7,20 (m, 10H), 5,84-5,97 (m, 1H), 5,12 (d, 1H, J = 10,2 Hz), 5,01 (d, 1H, J = 17,2 Hz), 4,74 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 4,56 (s, 1H), 4,53-4,40 (m, 3H), 4,05-4,11 (m, 1H), 3,32-3,53 (m, 4H), 3,44 (s, 3H), 2,37 (dd, 1H, J = 14,3, 6,7 Hz), 2,25 (dd, 1H, J = 14,3, 7,6 Hz).

5

Ejemplo 2: Benzoato de (2S,3R,4R,5R)-3-alil-4-(benciloxi)-5-(benciloximetil)-2-metoxitetrahidrofuran-3-ilo (**6**)



A una disolución de **5** (26,6 g, 69,2 mmol) en diclorometano seco (500 mL) a la temperatura ambiente se añadieron *N,N*-dimetilpiridin-4-amina (DMAP; 2,113 g, 17,30 mmol), trietilamina (217 mL, 1557 mmol) y cloruro de benzoilo (18,05 mL, 156 mmol). Después de 1 hora, se añadieron cloruro de benzoilo (6 mL) y DMAP (2,1 g) adicionales. La mezcla se agitó durante 5 días.

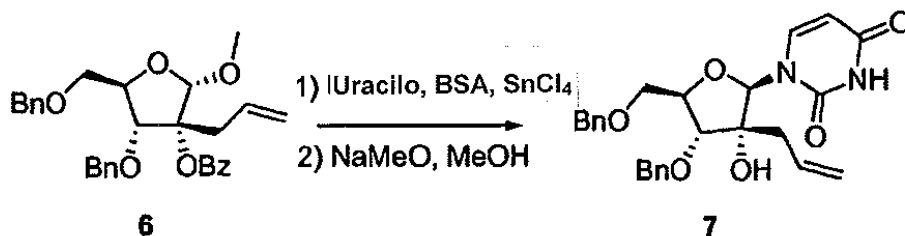
10

La mezcla de reacción se agitó luego con HCl 1 N y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con NaHCO₃ acuoso saturado, seguido de salmuera. Después de secar con MgSO₄, de la filtración y evaporación de los componentes volátiles, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (400 g de sílice) eluyendo con heptano a acetato de etilo al 15% en heptano para dar un producto de reacción en forma de un aceite (como una mezcla con el compuesto **5**). La mezcla se purificó de nuevo con CH₂Cl₂ como eluyente (400 g de sílice). Las fracciones puras se recogieron y se obtuvo el compuesto intermedio **6** en forma de un aceite incoloro (13,05 g, 39%). HPLC Condición A, Rt: 3,41 min, $m/z = 457$ ($M-OMe$)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,1 (d, 2H, J = 7,9 Hz), 7,68-7,28 (m, 13H), 5,84-5,77 (m, 1H), 5,12 (d, 1H, J = 16 Hz), 4,95 (d, 1H, J = 16 Hz), 4,92 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 4,56 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 4,48 (d, 1H, J = 11,6 Hz), 4,40 (d, 1H, J = 11,6 Hz), 4,2 (m, 1H), 3,85 (d, 1H, J = 6,2 Hz), 3,53 (d, 1H, J = 10,8 Hz), 3,7 (s, 3H), 3,45 (dd, 1H, J = 10,8, 6,2 Hz), 3,25 (dd, 1H, J = 15,5, 7,3 Hz), 2,45 (dd, 1H, J = 15,5, 7,3 Hz).

15

20

Ejemplo 3: 1-[(2R,3R,4R,5R)-3-alil-4-(benciloxi)-5-(benciloximetil)-3-hidroxitetrahidrofuran-2-il]pirimidina-2,4 (1H, 3H)-diona (**7**)



Bis(trimetilsilil)acetamida (BSA; 29,2 mL, 118 mmol) se añadió a una mezcla de **6** (14,0 g, 23,1 mmol) y uracilo (5,99 g, 53,4 mmol) en acetonitrilo anhidro (300 mL). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1 hora y se dejó que la disolución transparente se enfriara hasta la temperatura ambiente. Se añadió gota a gota a la temperatura ambiente cloruro de estaño (11,55 mL, 99 mmol) y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 hora. Después, la mezcla se agitó a reflujo durante 1,5 horas y se enfrió de nuevo hasta la temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo (250 mL), seguido de NaHCO₃ acuoso saturado (250 mL), y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Después de la filtración a través de Celite, la capa orgánica se separó y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (250 mL). La capa acuosa reunida se extrajo con acetato de etilo (250 mL) y la capa orgánica reunida se secó (MgSO₄), filtró y evaporó hasta sequedad a presión reducida. El aceite amarillo resultante se disolvió en metanol y se añadió metanolato de sodio al 25% (25 mL). Se continuó agitando durante una noche. Se añadió más metanolato de sodio al 25% (15 mL) y se continuó agitando durante una noche. Se añadió ácido acético (30 mL) y el disolvente se separó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con heptano/acetato de etilo 50:50 a acetato de etilo al 100%. Se obtuvo el compuesto intermedio **7** (9,38 g, 76%) en forma de un aceite incoloro. HPLC Condición A, Rt: 2,49 min, $m/z = 465$ ($M+H$)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,39 (1H, NH), 7,75 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,22-7,43 (m, 10H), 6,05 (s, 1H), 5,71-5,84 (m, 1H), 5,35 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 5,00-5,11 (m, 2H), 4,70 (d, 1H, J = 11,5 Hz), 4,53 (d, 1H, J = 11,5 Hz), 4,47 (d, 1H, J = 11,1 Hz), 4,47 (d, 1H, J = 11,1 Hz), 4,11-4,16 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 3,81-3,87 (m, 1H), 3,45-3,52 (m, 1H), 3,17 (s ancho, OH), 2,15-2,33 (m, 2H).

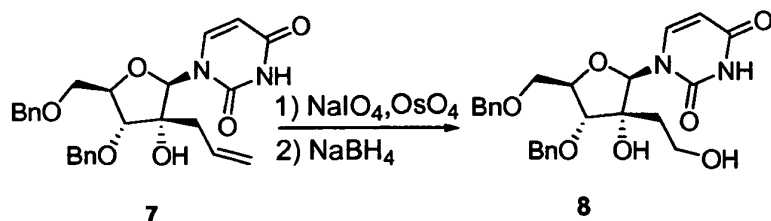
30

35

40

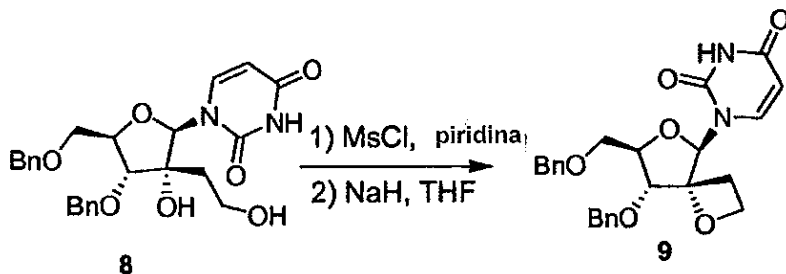
45

Ejemplo 4: 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(benciloxi)-5-(benciloximetil)-3-hidroxi-3-(2-hidroxiethyl)tetrahidrofuran-2-il]pirimidina-2,4(1H, 3H)-diona (**8**)



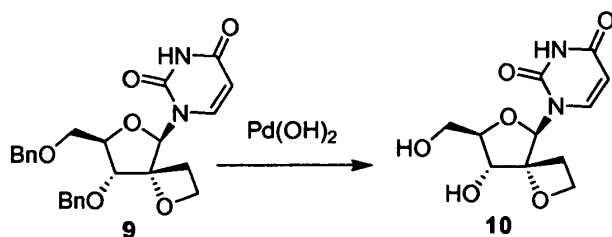
A una disolución agitada de **7** (7,8 g, 16,79 mmol) en una mezcla de THF (10 mL) y H₂O (10 mL) se añadió peryodato de sodio (11,17 g, 52,2 mmol), seguido de tetróxido de osmio (VIII) (2 mL, al 2,5 p/v % en terc-butanol, 0,168 mmol) y se continuó agitando durante 2 horas a la temperatura ambiente. Se añadió agua (100 mL) y la extracción se realizó con acetato de etilo (2 x 50 mL). La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 30 mL). La capa acuosa reunida se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica reunida se secó sobre (Na₂SO₄), se filtró y evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo oleoso obtenido se disolvió en una mezcla de THF (100 mL) y H₂O (20 mL) y se añadió borohidruro de sodio (1,361 g, 36,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a la temperatura ambiente, tras lo cual se añadió agua (100 mL) y la extracción se realizó con acetato de etilo (2 x 50 mL). La capa orgánica reunida se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado, la capa acuosa reunida se extrajo con acetato de etilo y la capa orgánica reunida se secó sobre (Na₂SO₄), filtró y evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo oleoso obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (0-10% (v/v) de metanol en CH₂Cl₂, luego 10% isocrático) proporcionando el producto de reacción **8** en forma de una espuma blanca (4,8 g, 57%). HPLC Condición A, Rt: 2,12 min, *m/z* = 469 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 9,85 (1H, NH), 7,85 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,22-7,43 (m, 10 H), 6,05 (s, 1H), 5,35 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 4,75 (d, 1H, J = 11,5 Hz), 4,53 (d, 1H, J = 11,5 Hz), 4,45 (d, 1H, J = 11,3 Hz), 4,35 (d, 1H, J = 11,3 Hz), 4,27 (d, 1H, J = 6,6 Hz), 4,2 (s, 1H), 4,1 (d, 1H, J = 6,6 Hz), 3,95 (d, 1H, J = 10,8 Hz), 3,75-3,7 (m, 1H), 3,62 (d, 1H, J = 10,8 Hz), 3,17 (s ancho, OH), 1,8-1,7 (m, 2H).

Ejemplo 5: 1-[(4R,5R,7R,8R)-8-(benciloxi)-7-(benciloximetil)-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-5-il]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**9**)



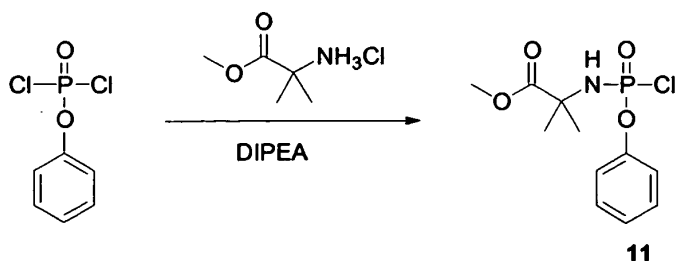
Cloruro de metansulfonilo (0,800 mL, 10,34 mmol) se añadió a **8** (4,32 g, 9,22 mmol) en piridina seca (100 mL). Después de 1 hora y 15 minutos, se añadieron 0,1 equivalentes más de cloruro de metanosulfonilo, y la mezcla se agitó adicionalmente a la temperatura ambiente durante 45 minutos. Después se añadió una pequeña cantidad de metanol, y la mezcla se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo (100 mL) y se lavó con NaHCO₃ saturado (2 x 50 mL). La capa acuosa reunida se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica reunida se secó luego sobre Na₂SO₄ y se concentró en vacío. El residuo obtenido se disolvió en THF seco y se añadió NaH al 95% (932 mg, 36,9 mmol) de una vez a la temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas a la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (30 mL) seguido de la adición de CH₂Cl₂ (250 mL). La capa orgánica separada se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 100 mL) y la capa acuosa reunida se extrajo con CH₂Cl₂ (250 mL). La capa orgánica reunida se secó (Na₂SO₄), filtró y evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna, eluyendo primero con heptano, luego con acetato de etilo para proporcionar **9** (3,27 g, 79%) en forma de una espuma. HPLC Condición A, Rt: 2,33 min, *m/z* = 451 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2,20 – 2,38 (m, 1 H) 2,38 – 2,52 (m, 1 H) 3,62 – 3,73 (m, 1 H) 3,89 – 4,13 (m, 3 H) 4,38 – 4,56 (m, 3 H) 4,56 – 4,68 (m, 1 H) 4,70 – 4,88 (m, 2 H) 5,25 (d, J = 8,00 Hz, 1 H) 6,25 (s, 1 H) 7,18 – 7,47 (m, 10 H) 7,87 (d, J = 8,20 Hz, 1 H) 8,90 (s ancho, 1 H).

Ejemplo 6: 1-[(4R,5R,7R,8R)-8-hidroxi-7-(hidroximetil)-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-5-il]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**10**)



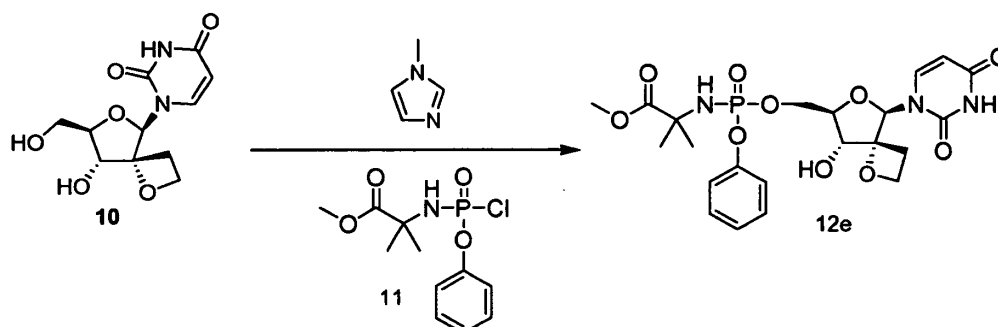
Una mezcla de **9** (50 mg, 0,111 mmol) en metanol (1 mL) y Pd(OH)₂ (8 mg) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a la temperatura ambiente. Después de 4 horas, se añadieron más Pd(OH)₂ (30 mg) y metanol (1 mL). La mezcla se agitó vigorosamente bajo una atmósfera de H₂ durante una noche. El catalizador se separó mediante filtración sobre decalite y el disolvente se separó mediante evaporación. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol al 10% en acetato de etilo para dar el compuesto intermedio **10** en forma de un polvo blanco (16,8 mg, 56%). HPLC Condición B, Rt: 1,98 min, *m/z* = 271 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ ppm 7,65 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 6,11 (s, 1H), 5,82 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 4,46-4,61 (m, 2H), 4,06-4,13 (m, 1H), 3,87-3,95 (m, 1H), 3,69-3,77 (m, 2H), 2,62-2,73 (m, 1H), 2,48-2,58 (m, 1H).

Ejemplo 7: 2-(cloro(fenoxi)fosforilamino)-2-metilpropionato de metilo (**11**)



Una disolución de fosforodichloridato de fenilo (1,0 eq., 13,0 mmol, 1,9 mL) e hidrocloreto de α-aminoisobutirato de metilo (1,0 eq., 13,0 mmol, 2,0 g) en CH₂Cl₂ (80 mL) se enfrió hasta -80°C. Se añadió gota a gota *N,N*-diisopropiletilamina seca (DIPEA; 2,0 eq., 26,0 mmol, 4,3 mL). Al cabo de 2 horas, la reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y el disolvente se separó a presión reducida. Se añadió dietiléter seco, y el precipitado se separó por filtración y se lavó dos veces con dietiléter seco bajo una atmósfera de argón. El filtrado se evaporó hasta sequedad para dar **11**, que se almacenó en forma de una disolución 0,90 M en tetrahidrofurano seco (THF) a -18°C.

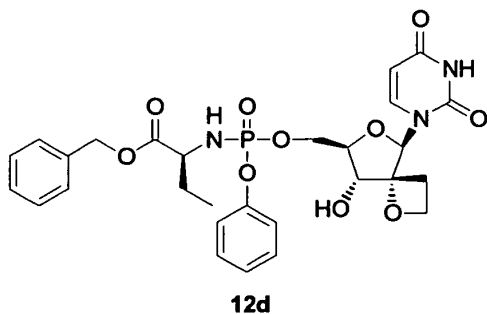
Ejemplo 8: 2-[[[(4R,5R,7R,8R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-7-il]metoxi](fenoxi)fosforilamino]-2-metilpropanoato de metilo (**12e**)



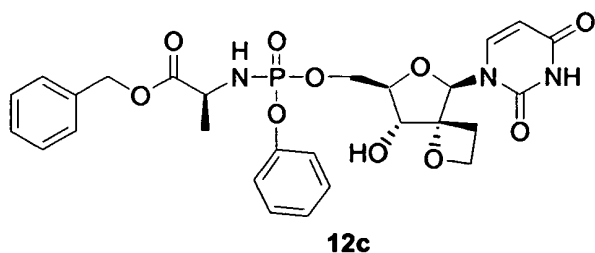
A una disolución de **10** (1,0 eq., 0,28 mmol, 75 mg) en THF seco (3 mL) se añadió 1-metilimidazol (NMI; 12,0 eq., 3,33 mmol, 0,27 mL) a la temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una disolución del compuesto intermedio **11** (1,4 eq., 0,39 mmol, 0,43 mL) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se lavó tres veces con HCl 0,5 M. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (metanol al 0-10% en CH₂Cl₂) para dar el compuesto **12e** (24 mg, rendimiento = 15%, pureza = 95%) en forma de una mezcla de diastereoisómeros. HPLC Condición A; Rt: 1,49 min, *m/z* = 526 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,33 (s, 3 H), 1,37 (s, 3 H), 2,42 – 2,43 (m, 2 H), 3,56 (s, 3 H), 3,70 – 3,79 (m, 1 H), 3,80 – 3,88 (m, 0,4 H), 3,88 – 3,96 (m, 0,6 H), 4,09 – 4,20 (m, 1 H), 4,26 – 4,48 (m, 3 H), 5,50 – 5,56 (m, 1 H), 5,61 – 5,69 (m, 1 H), 5,88 – 5,97 (m, 1 H), 5,97 – 6,04 (m, 1 H), 7,12 – 7,24 (m, 3 H), 7,31 – 7,41 (m, 2 H), 7,44 (d, J = 8,22 Hz, 0,4 H), 7,52 (d, J = 8,02 Hz, 0,6 H), 11,49 (s ancho, 1 H).

Ejemplo 9

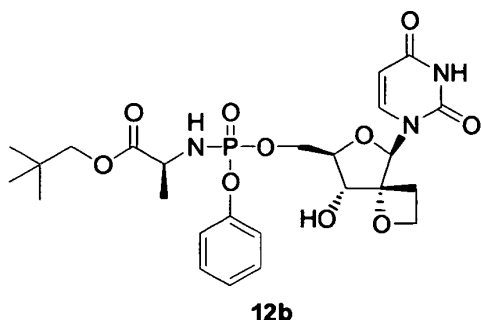
- 5 Utilizando un proceso similar al arriba esbozado, se prepararon los siguientes compuestos. En cada caso el análisis se realizó en mezclas de diastereoisómeros.



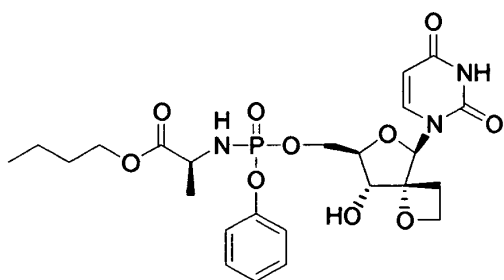
- 10 HPLC Condición A Rt: 2,00 min, $m/z = 602$ (M+H)⁺; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,71 – 0,83 (m, 3 H), 1,45 – 1,73 (m, 2 H), 2,33 – 2,48 (m, 2 H), 3,59 – 3,80 (m, 2 H), 3,79 – 3,96 (m, 1 H), 4,04 – 4,19 (m, 1 H), 4,24 – 4,47 (m, 3 H), 4,98 – 5,14 (m, 2 H), 5,47 – 5,57 (m, 1 H), 5,58 – 5,73 (m, 1 H), 5,96 – 6,03 (m, 1 H), 5,96 – 6,03 (m, 1 H), 7,09 – 7,22 (m, 3 H), 7,27 – 7,39 (m, 7 H), 7,44 (d, *J* = 8,02 Hz, 0,5 H), 7,48 (d, *J* = 8,22 Hz, 0,5 H), 11,50 (s ancho., 1 H).



- 15 HPLC Condición A; Rt: 1,92 min, $m/z = 588$ (M+H)⁺; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,19 - 1,29 (m, 3 H), 2,38 – 2,46 (m, 2 H), 3,53 – 3,97 (m, 3 H), 4,06 – 4,20 (m, 1 H), 4,26 – 4,46 (m, 3 H), 5,05 – 5,14 (m, 2 H), 5,49 – 5,59 (m, 1 H), 5,61 – 5,73 (m, 1 H), 5,88 – 6,05 (m, 1 H), 6,07 – 6,18 (m, 1 H), 7,09 – 7,23 (m, 3 H), 7,30 – 7,40 (m, 7 H), 7,43-7,51 (m, 1 H), 11,51 (s ancho, 1 H).
- 20

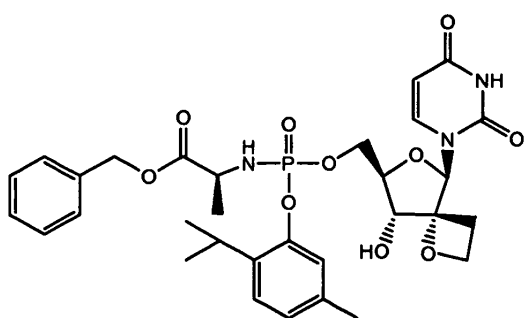


- 25 HPLC Condición A Rt: 2,00 min, $m/z = 568$ (M+H)⁺; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,79 – 0,93 (m, 9 H), 1,20 – 1,32 (m, 3 H), 2,33 – 2,50 (m, 2 H), 3,63 – 3,70 (m, 1 H), 3,71 - 3,80 (m, 2 H), 3,80 – 3,93 (m, 2 H), 4,04 – 4,21 (m, 1 H), 4,23 – 4,46 (m, 3 H), 5,49 – 5,59 (m, 1 H), 5,58 – 5,72 (m, 1 H), 5,94 – 6,03 (m, 1 H), 6,02 – 6,14 (m, 1 H), 7,11 – 7,25 (m, 3 H), 7,32 – 7,39 (m, 2 H), 7,41 – 7,53 (m, 1 H), 11,51 (s.ancho, 1H).

**12a**

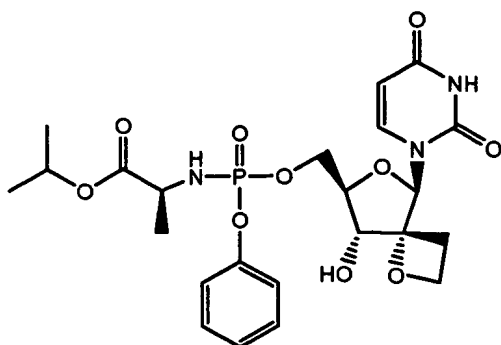
HPLC Condición A, Rt: 1,88 min, $m/z = 554 (M+H)^+$; 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0,77 – 0,93 (m, 3 H), 1,14 – 1,25 (m, 3 H), 1,24 – 1,37 (m, 2 H), 1,41 – 1,62 (m, 2 H), 2,35 – 2,47 (m, 2 H), 3,63 – 3,92 (m, 3 H), 3,92 – 4,06 (m, 2 H), 4,05 – 4,21 (m, 1 H), 4,23 – 4,46 (m, 3 H), 5,48 – 5,59 (m, 1 H), 5,59 – 5,72 (m, 1 H), 5,89 – 6,15 (m, 2 H), 7,09 – 7,25 (m, 3 H), 7,31 – 7,41 (m, 2 H), 7,43 – 7,52 (m, 1 H), 11,51 (s ancho, 1 H)

5

**12f**

HPLC Condición A, Rt: 3,46 min, $m/z = 644 (M+H)^+$ 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,37-11,61 (1 H, m) 7,40 – 7,46 (1 H, m) 7,27 – 7,39 (5 H, m) 7,09 – 7,19 (2 H, m) 6,89 – 6,96 (1 H, m) 6,07 – 6,20 (1H, m) 5,98 – 6,03 (1 H, m) 5,58 – 5,72 (1 H, m) 5,45-5,52 (1 H, m) 5,02 – 5,15 (2 H, m) 4,23 – 4,45 (3 H, m) 4,05 – 4,18 (1 H, m) 3,82 – 3,98 (2 H, m) 3,69 – 3,78 (1 H, m) 3,13 – 3,26 (1 H, m) 2,37 – 2,47 (2 H, m) 2,15 – 2,23 (3 H, m) 1,24 – 1,32 (3 H, m) 1,06 – 1,15 (6 H, m)

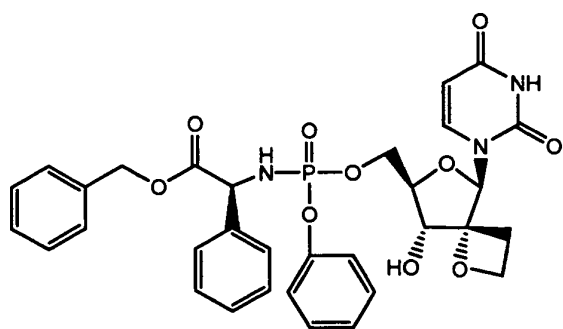
10

**12g**

HPLC Condición A, Rt: 2,08 y 2,21 min (observados diastereoisómeros individuales), $m/z = 540 (M+H)^+$, 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,39 – 11,60 (1 H, m) 7,44 – 7,52 (1 H, m) 7,31 – 7,40 (2 H, m) 7,12 – 7,24 (3 H, m) 5,95 – 6,07 (2 H, m) 5,59 – 5,71 (1 H, m) 5,51 – 5,58 (1 H, m) 4,78 – 4,91 (1 H, m) 4,26 – 4,44 (3 H, m) 4,06 – 4,20 (1 H, m) 3,84 – 3,95 (1H, m) 3,68 – 3,83 (2 H, m) 2,37 – 2,58 (2 H, m) 1,16 – 1,25 (3 H, m) 1,11 – 1,16 (6H,m)

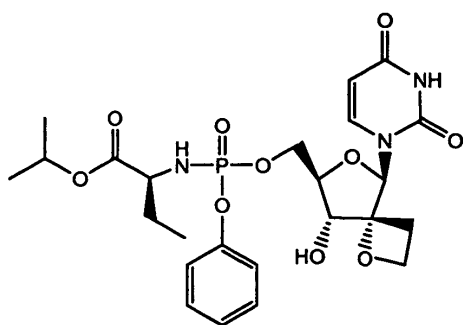
15

20

**12h**

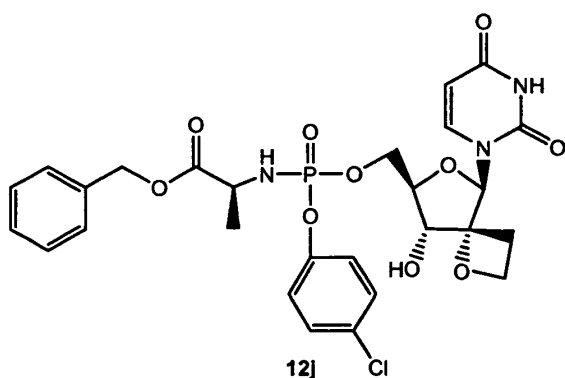
HPLC Condición A, Rt: 3,03 min, $m/z = 650 (M+H)^+$, 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,34- 11,62 (1 H, m) 7,05 – 7,46 (16 H, m) 6,71 – 6,84 (1 H, m) 5,95 – 6,03 (1 H, m) 5,56-5,71 (1 H, m) 5,46 – 5,53 (1 H, m) 4,95 – 5,16 (3 H, m) 4,23 – 4,45 (3 H, m) 4,05 – 4,21 (1 H, m) 3,77 – 3,88 (1 H, m) 3,68 – 3,77 (1 H, m) 2,35 – 2,45 (2 H, m)

5

**12i**

HPLC Condición A, Rt: 2,38 y 2,48 min (observados diastereoisómeros individuales), $m/z = 554 (M+H)^+$, 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,38 – 11,61 (1 H, m) 7,43 – 7,53 (1 H, m) 7,31 – 7,41 (2H, m) 7,11 7,25 (3 H, m) 5,90 – 6,06 (2 H, m) 5,59 – 5,71 (1 H, m) 5,50 – 5,59 (1 H, m) 4,79 – 4,93 (1 H, m) 4,27 – 4,46 (3 H, m) 4,03 – 4,21 (1 H, m) 3,82 – 3,95 (1 H, m) 3,68 – 3,81 (1 H, m) 3,52 – 3,66 (1 H, m) 2,38 – 2,51 (2 H, m) 1,44 – 1,72 (2 H, m) 1,09-1,21 (6 H, m) 0,72 – 0,89 (3 H, m)

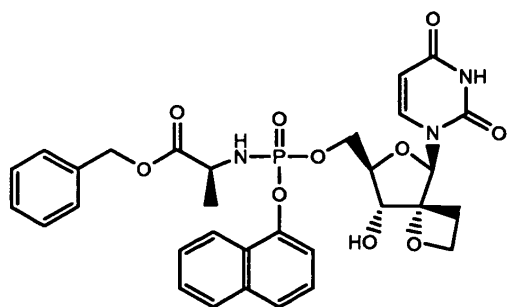
10

**12j**

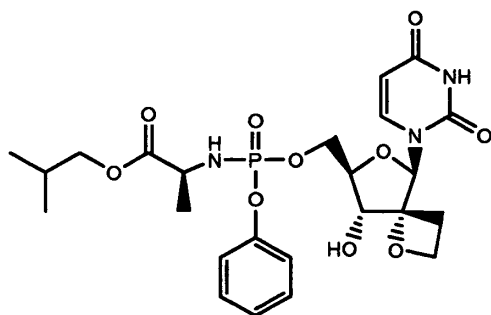
HPLC Condición A, Rt: 2,84 y 2,94 min (observados diastereoisómeros individuales), $m/z = 622 (M+H)^+$, 1H RMN (400 MHz, CDCl $_3$) δ ppm 1,38 (d, $J = 8,59$ Hz, 3 H), 2,38 – 2,57 (m, 1 H), 2,66 – 2,84 (m, 1 H), 3,25 (s ancho, 1 H), 3,78 (s ancho, 1 H), 3,81 – 3,94 (m, 1 H), 3,95 – 4,15 (m, 2 H), 4,23 – 4,42 (m, 1 H), 4,42 – 4,58 (m, 2 H), 4,60 – 4,72 (m, 1 H), 5,14 (s, 2 H), 5,68 (d, $J = 8,00$ Hz, 1 H), 6,07 (s, 0 H), 7,01 – 7,19 (m, 2 H), 7,20 – 7,43 (m, 7 H), 8,76 (s ancho, 1 H)

15

20

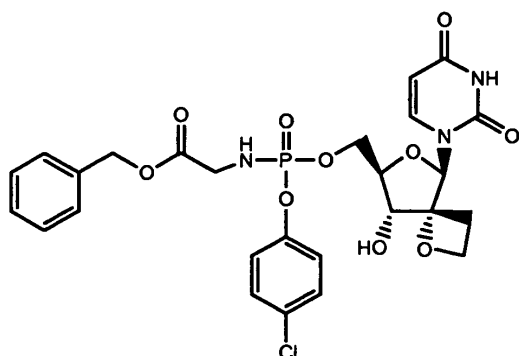
**12k**

5 HPLC Condición A, Rt: 3,06 min, $m/z = 638 (M+H)^+$. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1,23 – 1,41 (m, 2 H), 1,66 (s ancho, 0 H), 1,93 (s ancho, 1 H), 2,37 (m, $J = 12,56, 12,56, 8,63, 6,24$ Hz, 1 H), 2,54 – 2,75 (m, 1 H), 3,44 – 3,67 (m, 1H), 3,78 (dd, $J = 9,27, 1,85$ Hz, 1 H), 3,86 – 4,03 (m, 1 H), 4,05 – 4,17 (m, 1 H), 4,18 – 4,28 (m, 1 H), 4,31 – 4,41 (m, 1 H), 4,41 – 4,66 (m, 3 H), 4,96 – 5,16 (m, 2 H), 5,32 (d, $J = 8,20$ Hz, 0 H), 5,44 (d, $J = 8,20$ Hz, 0 H), 6,11 (s, 1 H), 7,08 (d, $J = 8,19$ Hz, 0 H), 7,18 – 7,41 (m, 6 H), 7,44 – 7,57 (m, 3 H), 7,64 (d, $J = 8,00$ Hz, 1 H), 7,78 – 7,89 (m, 1 H), 8,01 – 8,18 (m, 1 H), 9,37 (s ancho, 1 H)

**12l**

10

15 HPLC Condición A, Rt: 2,48 y 2,59 min (observados diastereoisómeros individuales), $m/z = 554 (M+H)^+$. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0,92 (d, $J = 5,46$ Hz, 5 H) 1,28 – 1,45 (m, 2 H) 1,48 – 2,02 (m, 2 H) 2,38 – 2,56 (m, 1 H) 2,64 – 2,87 (m, 1 H) 3,67 – 4,17 (m, 5 H) 4,28 – 4,58 (m, 2 H) 4,66 (s ancho, 1 H) 5,60 – 5,70 (m, 1 H) 6,19 (s, 1 H) 7,10 – 7,49 (m, 6 H) 8,56 (s ancho, 1 H)

**12m**

20 HPLC Condición A, Rt: 2,61 min, $m/z = 608 (M+H)^+$, 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 2,40 – 2,56 (m, 1 H), 2,67 – 2,82 (m, 1 H), 3,29 (s ancho, 1 H), 3,71 – 3,97 (m, 4 H), 3,97 – 4,10 (m, 1 H), 4,32 – 4,44 (m, 1 H), 4,45 – 4,59 (m, 2 H), 4,61 – 4,70 (m, 1 H), 5,16 (s, 2 H), 5,68 (d, $J = 7,80$ Hz, 1 H), 6,10 (d, $J = 6,44$ Hz, 1 H), 7,10 – 7,19 (m, 2 H), 7,24 – 7,30 (m, 3 H), 7,30 – 7,42 (m, 5 H), 8,82 (s ancho, 1 H)

Ejemplos biológicos

Ensayo de replicación

Los compuestos de fórmula 12a - 12m se examinaron en cuanto a su actividad en la inhibición de la replicación de ARN de HCV en un ensayo celular. El ensayo se utilizó para demostrar que los compuestos de fórmula I inhibían una línea de células replicante celular funcional de HCV, también conocida como replicones de HCV. El ensayo celular se basó en una construcción de expresión bicistrónica, según se describe por Lohmann et al. (1999) Science vol. 285, págs. 110-113 con modificaciones descritas por Krieger et al. (2001) Journal of Virology 75: 4614-4624, en una estrategia de multi-rastreo de dianas.

En esencia, el método era como sigue. El ensayo utilizó la línea de células establemente transfectada Huh-7 luc/neo (a la que se alude aquí en lo que sigue como Huh-Luc). Esta línea de células alberga un ARN que codifica una construcción de expresión bicistrónica que comprende las regiones NS3-NS5B tipo salvaje de HCV de tipo 1b, traducidas a partir de un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) procedente del virus de encefalomiocarditis (EMCV), precedido por una porción informadora (luciferasa de luciérnaga) y una porción de marcador seleccionable (neo^R, neomicina fosfotransferasa). La construcción está delimitada por NTRs (siglas inglesas de regiones no traducidas) 5' y 3' procedentes del genotipo 1b de HCV. El cultivo continuo de células del replicón en presencia de G418 (neo^R) depende de la replicación del ARN de HCV. Las células del replicón establemente transfectadas que expresan ARN de HCV, que se replica autónomamente y en altos niveles, que codifica, entre otros, luciferasa, se utilizaron para el rastreo de los compuestos antivirales.

Las células de replicón se extendieron en placas de 384 pocillos en presencia de los compuestos de ensayo y testigo que se añadieron en diversas concentraciones. Tras una incubación durante tres días se midió la replicación de HCV sometiendo a ensayo la actividad de luciferasa (utilizando sustratos de ensayo de luciferasa y reactivos convencionales y un dispositivo formador de imágenes de microplacas Perkin Elmer ViewLux™ ultraHTS). Las células del replicón en los cultivos testigo tienen un alto nivel de expresión de luciferasa en ausencia de cualquier inhibidor. La actividad inhibidora del compuesto sobre la actividad de luciferasa se vigiló en las células Huh-Luc, permitiendo una curva de dosis-respuesta para cada uno de los compuestos de ensayo. Después se calcularon los valores CE₅₀, valor que representa la cantidad de un compuesto requerida para disminuir el nivel de la actividad de luciferasa en un 50% o, más específicamente, la capacidad de replicar el ARN del replicón de HCV genéticamente enlazado.

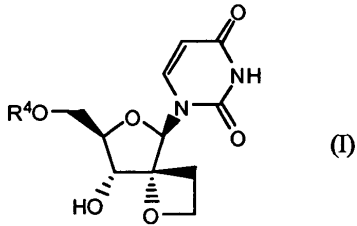
Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados del replicón (CE₅₀, replicón) y los resultados de citotoxicidad (CC₅₀, (µM) (Huh-7)) obtenidos para compuestos de los Ejemplos arriba indicados. También se da la actividad de HIV (CE₅₀ de HIV (µM)) y la toxicidad celular en la línea de células de HIV ((CC₅₀, (µM) (MT-4)).

Compuesto número	CE ₅₀ (µM) (HCV)	CC ₅₀ (µM) (Huh-7)	CE ₅₀ (µM) (HIV)	CC ₅₀ (µM) (MT4)
12 a	3,4	> 98	> 98	> 98
12 b	3,7	> 98	> 98	> 98
12 c	5,6	> 98	> 98	> 98
12 d	5,5	> 98	> 98	> 98
12 e	23,4	> 98	> 98	> 98
12 f	8,7	18,7	> 98	1,3
12 g	17,8	> 98	> 98	> 98
12 h	79,64	> 88	> 98	> 98
12 i	> 96	> 98	> 98	> 98
12 j	0,7	> 98	> 98	> 98
12 k	2,0	> 98	> 76,9	> 98
12 l	0,44	> 98	> 98	> 98
12 m	7,17	> 98	> 98	> 98

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de formula I:



- 5 incluidos cualesquiera estereoisómeros posibles del mismo, en donde R^4 es un éster monofosfato, difosfato o trifosfato; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R^4 es un éster monofosfato.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R^4 es éster difosfato.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R^4 es un éster trifosfato.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad anti-viralmente eficaz de un compuesto de fórmula I según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso como un inhibidor de HCV.