

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 928**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.1999 E 04075926 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1431304**

54 Título: **β -L-2'-desoxi-nucleósidos para el tratamiento de la hepatitis B**

30 Prioridad:

10.08.1998 US 96110 P

28.04.1999 US 131352 P

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

20.03.2015

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (33.3%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel , CH;

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (33.3%) y

L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II (33.3%)

72 Inventor/es:

GOSSELIN, GILLES;

IMBACH, JEAN-LOUIS y

BRYANT, MARTIN L.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 531 928 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

β -L-2'-desoxi-nucleósidos para el tratamiento de la hepatitis B

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se encuadra dentro del área de los compuestos para uso en métodos de tratamiento del virus de la hepatitis B (también denominado "HBV") que incluyen administrar a un hospedante que lo necesite, bien en solitario o bien en combinación, una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos activos descritos en la presente memoria, o un profármaco o sal farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos.

10 El HBV es la segunda causa, después del tabaco, del cáncer humano. El mecanismo a través del cual el HBV induce el cáncer es desconocido, si bien se postula que puede ser el detonante directo del desarrollo del tumor, o puede provocar indirectamente el desarrollo del tumor a través de inflamación crónica, cirrosis y regeneración celular asociada con la infección.

15 El virus de la hepatitis B ha alcanzado niveles epidémicos a nivel mundial. Tras un período de incubación de dos a seis meses en el que el hospedante no es consciente de la infección, la infección por HBV puede llevar a hepatitis aguda y a daños en el hígado, lo que causa dolor abdominal, ictericia y niveles elevados en sangre de ciertas enzimas. El HBV puede causar hepatitis fulminante, una forma de la enfermedad rápidamente progresiva, a menudo mortal, en la que son destruidas secciones masivas del hígado.

20 En general los pacientes se recuperan de la hepatitis aguda. En algunos pacientes, sin embargo, persisten altos niveles de antígeno viral en la sangre durante un período de tiempo prolongado, o indefinido, causando una infección crónica. Las infecciones crónicas pueden llevar a hepatitis crónica persistente. Los pacientes infectados con HBV crónico persistente son comunes sobre todo en los países en vías de desarrollo. A mediados de 1991, había aproximadamente 225 millones de portadores crónicos de HBV solamente en Asia, y en todo el mundo, la cifra ascendía a casi 300 millones de portadores. La hepatitis crónica persistente puede causar fatiga, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular, un cáncer de hígado primario.

25 En los países occidentales industrializados, los grupos de alto riesgo de infección por HBV incluyen aquellos que están en contacto con portadores de HBV o con sus muestras de sangre. La epidemiología del HBV es muy similar a la del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), lo que explica por qué la infección por HBV es común entre los pacientes con SIDA o complejo relacionado con SIDA. No obstante, el HBV es más contagioso que el HIV.

30 Sin embargo, más recientemente, las vacunas se han producido también por ingeniería genética y su uso está bastante extendido actualmente. Desgraciadamente, las vacunas no pueden ayudar a los que ya están infectados con HBV. Los tratamientos diarios con α -interferón, una proteína obtenida por ingeniería genética, también son prometedores, pero esta terapia sólo tiene éxito en aproximadamente un tercio de los pacientes tratados. Por otra parte, el interferón no puede ser administrado por vía oral.

35 Se han identificado una serie de nucleósidos sintéticos que presentan actividad contra el HBV. El (-) enantiómero de BCH-189, conocido como 3TC, reivindicado en la patente de EE.UU. 5.539.116 para Liotta, et al., ha sido aprobado por la Food and Drug Administration de EE.UU. para el tratamiento de la hepatitis B. Véase también el documento EPA 0.494.119 A1 presentado por BioChem Pharma, Inc.

40 El Cis-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ("FTC") presenta actividad contra el HBV. Véase el documento WO 92/15308; Furman, et al., "The Anti-Hepatitis B Virus Activities, Cytotoxicities, and Anabolic Profiles of the (-) and (+) Enantiomers of cis-5-Fluoro-1-[2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-Cytosine" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, December 1992, page 2686-2692; y Cheng, et al., *Journal of Biological Chemistry*, volume 267(20), 13938-13942 (1992).

45 Von Janta-Lipinski et al., describen el uso de los L-enantiómeros de 5'-trifosfatos de β -2'-desoxiribunucleósido modificado con 3'-fluoro para la inhibición de las polimerasas de la hepatitis B (*J. Med. Chem.*, 1998, 41, 2040-2046). Específicamente, los 5'-trifosfatos de 3'-desoxi-3'-fluoro- β -L-timidina (β -L-FTTP), 2',3'-didesoxi-3'-fluoro- β -L-citidina (β -L-FdCTP) y 2',3'-didesoxi-3'-fluoro- β -L-5-metilcitidina (β -L-FMethCTP) han sido descritos como inhibidores eficaces de las ADN-polimerasas de HBV.

El documento WO 96/13512 para Genencor International, Inc., y Lipitek, Inc. describe que determinados nucleósidos de L-ribofuranosilo pueden ser útiles para el tratamiento de cáncer y virus. Específicamente, se describe el uso de esta clase de compuestos para el tratamiento de cáncer e HIV.

50 Las patentes de EE.UU. N° 5.565.438; 5.567.688 y 5.587.362 (Chu et al.) describen el uso de 2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuranoliluridina (L-FMAU) para el tratamiento de la hepatitis B y del virus de Epstein Barr.

La Yale University y la University of Georgia Research Foundation, Inc., describen el uso de L-FddC (β -L-5-fluoro-2',3'-didesoxicitidina) para el tratamiento del virus de la hepatitis B en el documento WO 92/18517.

Los nucleósidos sintéticos β -L-2'-desoxicitidina (β -L-2'-dC), β -L-2'-desoxitimidina (β -L-dT) y β -L-2'-desoxiadenosina (β -L-2'-dA) son conocidos en la técnica. Antonin Holy fue el primero en describir β -L-dC y β -L-dT en 1972 "Nucleic Acid Components and Their Analogs. CLIII. Preparation of 2'-deoxy-L-Ribonucleosides of the Pyrimidine Series", *Collect. Czech. Chem. Commun* (1972), 37(12), 4072-87. Morris S. Zedeck et al, describieron por primera vez el β -L-dA para la inhibición de la síntesis de enzimas inducidas en *Pseudomonas testosteroni*, *Mol. Phys.* (1967), 3(4), 386-95.

Se sabe que determinados 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósidos presentan actividades antineoplásicas y antivirales selectivas. Verri et al., describen el uso de 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósidos como agentes antineoplásicos y como agentes anti-herpéticos (*Mol. Pharmacol.* (1997), 51(1), 132-138 y *Biochem. J.* (1997), 328(1), 317-20). Saneyoshi et al., demuestran el uso de 2'-desoxi-L-ribonucleósidos como inhibidores de la transcriptasa inversa (I) para el control de retrovirus y para el tratamiento del SIDA, Jpn, Kokai Tokkyo Koho JP06293645 (1994).

Giovanni et al., ensayaron los 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósidos parcialmente contra los virus de la pseudorrabia (PRV), *Biochem., J.* (1993), 294(2), 381-5.

Los usos quimioterapéuticos de los 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósidos han sido estudiados por Tyrsted et al., (*Biochim. Biophys. Acta* (1968), 155(2), 619-22) y Bloch, et al., (*J. Med. Chem.* (1967), 10(5), 908-12).

Es conocido dentro de la técnica que la β -L-2'-desoxitimidina (β -L-dT) inhibe la timidina cinasa (TK) del virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Lotty et al., documento WO 92/08727, indican que la β -L-dT inhibe selectivamente la fosforilación de la D-timidina mediante la timidina cinasa del HSV-1, pero no mediante la timidina cinasa humana. Spaldari et al. han descrito que la L-timidina es fosforilada por la timidina cinasa del virus del herpes simplex tipo 1 e inhibe el crecimiento viral, *J. Med. Chem.* (1992), 35(22), 4214-20.

En vista del hecho de que el virus de la hepatitis B ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo y de que tiene efectos graves y a menudo trágicos sobre los pacientes infectados, sigue existiendo una necesidad imperiosa de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos eficaces para tratar a los seres humanos infectados con el virus que presenten una baja toxicidad para el hospedante.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar compuestos para uso en métodos para el tratamiento de pacientes humanos u otros hospedantes infectados con el virus de la hepatitis B.

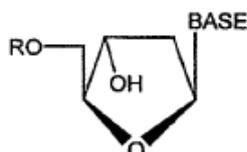
Sumario de la invención

Las realizaciones de la presente invención se indican en las reivindicaciones independientes adjuntas. Las sub-realizaciones de la presente invención se indican en las reivindicaciones dependientes adjuntas

Se describen compuestos para uso en un método para el tratamiento de la infección de hepatitis B en seres humanos y otros animales hospedantes, que incluye la administración de una cantidad eficaz de un 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósido biológicamente activo (denominado aquí alternativamente β -L-d-nucleósido o β -L-2'-d-nucleósido) o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, administrado solo o en combinación, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término 2'-desoxi, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un nucleósido que no tiene ningún sustituyente en la posición 2'.

Los 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósidos descritos, o los profármacos o sales farmacéuticamente aceptables, o las formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos, son útiles en la prevención y tratamiento de infecciones de hepatitis B y otros estados patológicos relacionados, tales como por ejemplo estados de anticuerpos anti-HBV positivos y HBV-positivos, inflamación crónica del hígado causada por HBV, cirrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis crónica persistente y fatiga. Estos compuestos o formulaciones se pueden utilizar también profilácticamente para prevenir o retardar el avance de la enfermedad clínica en individuos que son anticuerpos anti-HBV positivos o antígenos HBV positivos o que han sido expuestos a HBV.

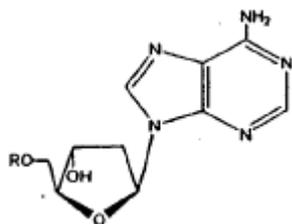
En una realización de la presente descripción, el derivado 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósido es un compuesto de la fórmula:



en la que R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de cadena lineal, ramificado o cíclico, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxilalquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo

aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y BASE es una base purina o pirimidina que puede estar opcionalmente sustituida.

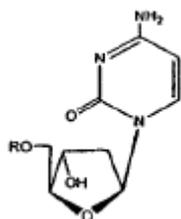
En otra realización, el derivado 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido es β-L-2'-desoxiadenosina o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, de la fórmula:



5

en la que R es H, mono, di, o trifosfato, acilo, o alquilo, o un derivado fosfato estabilizado (para formar un profármaco nucleótido estabilizado).

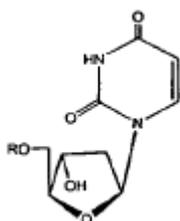
En otra realización, el derivado 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido es β-L-2'-desoxicitidina o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, de la fórmula:



10

en la que R es H, mono, di, o trifosfato, acilo, o alquilo, o un derivado fosfato estabilizado (para formar un profármaco nucleótido estabilizado).

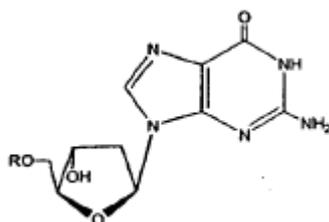
En otra realización, el derivado 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido es β-L-2'-desoxiuridina o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, de la fórmula:



15

en la que R es H, mono, di, o trifosfato, acilo, o alquilo, o un derivado fosfato estabilizado (para formar un profármaco nucleótido estabilizado).

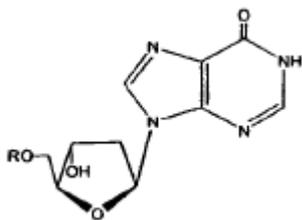
En otra realización, el derivado 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido es β-L-2'-desoxiguanosina o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, de la fórmula:



20

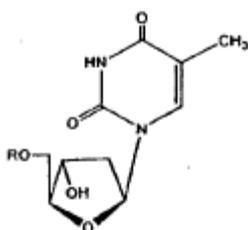
en la que R es H, mono, di, o trifosfato, acilo, o alquilo, o un derivado fosfato estabilizado (para formar un profármaco nucleótido estabilizado).

En otra realización, el derivado 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido es β-L-2'-desoxiinosina o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, de la fórmula:



en la que R es H, mono, di, o trifosfato, acilo, o alquilo, o un derivado fosfato estabilizado (para formar un profármaco nucleótido estabilizado).

5 En otra realización, el derivado 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido es β-L-timidina o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, de la fórmula:



en la que R es H, mono, di, o trifosfato, acilo, o alquilo, o un derivado fosfato estabilizado (para formar un profármaco nucleótido estabilizado).

10 En otra realización, el 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido se administra de forma alternativa o en combinación con uno o más de otros 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos o uno o más de otros compuestos que presentan actividad contra el virus de la hepatitis B. En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosis efectiva de cada uno de los agentes sucesivamente, mientras que en la terapia de combinación, se administra una dosis efectiva de dos o más agentes a la vez. 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. También debe advertirse que los valores de dosis variarán también de acuerdo con la gravedad del estado patológico a ser aliviado. Debe entenderse además que para un sujeto en particular, los regímenes y programas posológicos específicos deberán ajustarse a lo largo del tiempo según las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

20 En otra realización, la descripción proporciona un método para el tratamiento de seres humanos infectados con HBV que incluye la administración de una cantidad de tratamiento de HBV de un profármaco de los derivados 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos descritos. Un profármaco, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que se convierte en el nucleósido en la administración *in vivo*. Los ejemplos no limitantes incluyen las sales farmacéuticamente aceptables (denominadas alternativamente "sales fisiológicamente aceptables"), los derivados 5' y N⁴ (citidina) o N⁶ (adenosina) acilados o alquilados del compuesto activo, o los 5'-éster-lípidos del compuesto activo.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra un procedimiento general para obtener β-L-eritro-pentofuranonucleósidos (β-L-dN) empleando L-ribosa o L-xilosa como material de partida.

30 La figura 2 es un gráfico que ilustra el metabolismo de L-dA, L-dC y L-dT en células Hep G2 humanas en cuanto a la acumulación y degradación. Se incubaron las células con el compuesto a concentración 10 μM.

La figura 3 es un gráfico que ilustra el efecto antiviral de β-L-dA, β-L-dT y β-L-dC en un modelo de hepatitis crónica en marmota.

Descripción detallada de la invención

35 Como se usa en la presente memoria, el término "sustancialmente en forma de un isómero individual" o "en forma aislada" se refiere a un 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido que está, al menos en aproximadamente un 95 %, en la estereo-configuración designada. En una realización preferida, el compuesto activo se administra al menos en este nivel de pureza al hospedante que necesita la terapia.

- Como se usa en la presente memoria, el término hepatitis B y estados patológicos relacionados se refiere a la hepatitis B y a los estados patológicos relacionados, tales como estados de anticuerpos anti-HBV positivos y HBV-positivos, inflamación crónica del hígado causada por HBV, cirrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis crónica persistente y fatiga. Los compuestos para uso en un método de tratamiento de la infección de hepatitis B de la presente descripción incluyen el uso de derivados 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos profilácticamente para prevenir o retardar el avance de la enfermedad clínica en individuos que son anticuerpos anti-HBV positivos o antígenos HBV positivos o que han sido expuestos a HBV.
- Como se usa en la presente memoria, el término alquilo, a menos que se especifique otra cosa, se refiere a un hidrocarburo primario, secundario o terciario, saturado, lineal, ramificado o cíclico, típicamente de C₁ a C₁₈, preferiblemente de C₁ a C₆ y específicamente incluye pero no se limita a metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, isopentilo, amilo, t-pentilo, ciclopentilo, y ciclohexilo.
- Como se usa en la presente memoria, el término acilo se refiere a un resto de la fórmula -C(O)R', en donde R' es alquilo; arilo, alquilarilo, aralquilo, heteroaromático, alcoialquilo incluyendo metoximetilo; arilalquilo incluyendo bencilo; ariloxialquilo tal como fenoximetilo; arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, o el residuo de un aminoácido. El término acilo incluye específicamente pero no se limita a acetilo, propionilo, butirilo, pentanoilo, 3-metilbutirilo, succinato de hidrógeno, 3-clorobenzoato, benzoilo, acetilo, pivaloilo, mesilato, propionilo, valerilo, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico y oleico.
- Como se usa en la presente memoria, el término base purina o pirimidina, incluye pero no se limita a 6-alquilpurina y N⁶-alquilpurinas, N⁶-acilpurinas, N⁶-bencilpurina, 6-halopurina, N⁶-vinilpurina, N⁶-purina acetilénica, N⁶-acil-purina, N⁶-hidroxialquil-purina, N⁶-tioalquil-purina, N²-alquilpurinas, N⁴-alquilpirimidinas, N⁴-acilpirimidinas, 4-bencilpirimidina, N⁴-halopirimidinas, N⁴-pirimidinas acetilénicas, 4-acil- y N⁴-acil-pirimidinas, 4-hidroxialquil-pirimidinas, 4-tioalquil-pirimidinas, timina, citosina, 6-azapirimidina, incluyendo 6-azacitosina, 2- y/o 4-mercaptopirimidina, uracilo, C⁵-alquilpirimidinas, C⁵-bencilpirimidinas, C⁵-halopirimidinas, C⁵-vinilpirimidina, C⁵-pirimidina acetilénica, C⁵-acil-pirimidina, C⁵-hidroxialquil-purina, C⁵-amidopirimidina, C⁵-cianopirimidina, C⁵-nitropirimidina, C⁵-aminopirimidina, N²-alquilpurinas, N²-alquil-6-tiopurinas, 5-azacitidinilo, 5-azauracililo, triazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo, y pirazolopirimidinilo. Los grupos funcionales de oxígeno y nitrógeno sobre la base pueden ser protegidos si fuera necesario o si se desea. Los grupos protectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo, y t-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo, grupos acilo tales como acetilo y propionilo, metanosulfonilo, y p-toluenosulfonilo.
- El término nucleósido biológicamente activo, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un nucleósido que presenta una EC₅₀ 15 micromolar o menos cuando se ensaya en células 2.2.15 transfectadas con el virión de la hepatitis.
- Las bases preferidas incluyen citosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 5-metiluracilo, timina, adenina, guanina, inosina, xantina, 2,6-diaminopurina, 6-aminopurina, 6-cloropurina y 2,6-dicloropurina, 6-bromopurina, 2,6-dibromopurina, 6-yodopurina, 2,6-di-yodopurina, 5-bromovinilcitosina, 5-bromoviniluracilo, 5-bromoetenilcitosina, 5-bromoeteniluracilo, 5-trifluorometilcitosina, 5-trifluorometiluracilo.
- Se puede proporcionar el 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido como un 5'-fosfolípido o un 5'-éter-lípido, tal como se describe en los siguientes documentos de referencia: Kucera, L.S., N. Lyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.J., D.L.W., and C. Piantadosi, 1990. Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 6:491-501; Piantadosi, C., J. Marasco C.J., S.L. Morris-Natschke, K.L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surlis, K.S. Ishaq, L.S. Kucera, N. Lyer, C.A., Wallen, S. Piantadosi, and E.J. Modest. 1991-Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity. *J. Med. Chem.* 34:1408-1414; Hostler, K.Y., D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M.T. van Wijk and H. van den Bosch. 1992. Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 31-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 31-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 2025-2029; Hostler, K.Y., L.M. Stuhmiller, H.B. Lenting, H. van den Bosch, and D.D. Richman. 1990. Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. *J. Biol Chem.* 265: 6112-7.
- El 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido se puede convertir en un éster farmacéuticamente aceptable por reacción con un agente de esterificación apropiado, por ejemplo, un haluro ácido o anhídrido. El nucleósido o su profármaco farmacéuticamente aceptable se pueden convertir en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de manera convencional, por ejemplo, por tratamiento con un ácido o base apropiados. El éster o la sal se pueden convertir en el nucleósido de origen, por ejemplo, por hidrólisis.
- Tal como se utiliza en la presente memoria, el término sales o complejos farmacéuticamente aceptables se refiere a sales o complejos de los 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos que retienen la actividad biológica deseada del compuesto de origen y presentan efectos toxicológicos no deseados mínimos, o ninguno en absoluto. Entre los ejemplos no limitantes de dichas sales se incluyen (a) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos

(por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares) y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmoico, ácido alginico, ácido poliglútamico, ácidos naftalensulfónicos, ácidos naftalendisulfónicos y ácido poligalacturónico; (b) sales de adición de base formadas con cationes tales como sodio, potasio, zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares, o con un catión orgánico formado a partir de N,N-dibenciletilen-diamina, amonio o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b); p. ej., una sal de tanato de zinc o similar.

El término profármaco, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que se convierte en el nucleósido en la administración *in vivo*. Los ejemplos no limitantes son las sales farmacéuticamente aceptables (denominadas alternativamente "sales fisiológicamente aceptables"), los derivados 5' y N⁴ o N⁶ acilados o alquilados del compuesto activo, o los 5'-fosfolípidos y 5'-éter-lípidos del compuesto activo

Las modificaciones de los compuestos activos, específicamente en las posiciones N⁴, N⁶ y 5'-O, pueden afectar a la biodisponibilidad y ritmo metabólico de las especies activas, proporcionando así un control sobre la distribución de las especies activas.

Una realización preferida de la presente descripción es un método para el tratamiento de infecciones de HBV en seres humanos u otros animales hospedantes, que incluye la administración de una cantidad efectiva de uno o más derivados 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos seleccionados del grupo que consiste en β-L-2'-desoxiadenosina, β-L-2'-desoxicidina, β-L-2'-desoxiuridina, β-L-2'-guanosina, β-L-2'-desoxiinosina, y β-L-2'-desoxitimidina o uno de sus profármacos fisiológicamente aceptables, incluyendo un fosfato, derivado 5' o N⁶ alquilado o acilado, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de esta descripción o tienen actividad anti-HBV, o se metabolizan hasta un compuesto o compuestos que tienen actividad anti-HBV. En una realización preferida, el 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido se administra sustancialmente en forma de un isómero individual, es decir que está, al menos en aproximadamente un 95 % en la estereoconfiguración designada.

Profármacos nucleótidos

Cualquiera de los nucleósidos descritos en la presente memoria se puede administrar como un profármaco nucleótido estabilizado para aumentar la actividad, biodisponibilidad, estabilidad o alterar de otra manera las propiedades del nucleósido. Se conocen muchos ligandos de profármacos nucleótidos. En general, la alquilación, acilación u otra modificación lipófila del mono, di o trifosfato del nucleósido aumentará la estabilidad del nucleótido. Los ejemplos de grupos sustituyentes que pueden reemplazar uno o más hidrógenos sobre el resto fosfato, son alquilo, arilo, esteroides, carbohidratos, incluyendo azúcares, 1,2-diacilglicerol y alcoholes. Muchos están descritos en R. Jones and N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17. Cualquiera de ellos se puede usar en combinación con los nucleósidos descritos para alcanzar el efecto deseado.

En una realización el 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido se proporciona como un profármaco 5' hidroxil-lipófilo. Los ejemplos no limitantes de patentes de Estados Unidos que describen sustituyentes lipófilos adecuados que se pueden incorporar covalentemente en el nucleósido, preferiblemente en la posición 5'-OH de las preparaciones nucleosídicas o lipófilas, incluyen las patentes de Estados Unidos números 5.149.794 (Sep. 22, 1992, Yatvin et al.); 5.194.654 (Mar. 16, 1993, Hostetler et al.); 5.223.263 (June. 29, 1993, Hostetler et al.); 5.256.641 (Oct. 26, 1993, Yatvin et al.); 5.411.947 (May. 2, 1995, Hostetler et al.); 5.463.092 (Oct. 31, 1995, Hostetler et al.); 5.543.389 (Aug. 6, 1996, Yatvin et al.); 5.543.390 (Aug. 6, 1996, Yatvin et al.); 5.543.391 (Aug. 6, 1996, Yatvin et al.); y 5.554.728 (Sep. 6, 1996, Basava et al.).

Las solicitudes de patentes extranjeras que describen los sustituyentes lipófilos que se pueden unir al derivado 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido de la presente descripción o preparaciones lipófilas, incluyen WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 9391 7054.4 y WO 91/17921.

Son ejemplos adicionales no limitantes de 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos aquellos que contienen sustituyentes como se describen en las siguientes publicaciones. Estos 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos derivatizados se pueden usar para las indicaciones descritas en el texto o de otra manera como agentes antivirales, incluyendo como agentes anti-HBV. Ho, D.H.W. (1973) Distribution of kinase and deaminase of 1β-D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res.* 33, 2816-2820; Holy, A. (1993) Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues. In: De Clercq (Ed.), *Advances in Antiviral Drug Design*, Vol. 1 JAI Press, pp. 179-231; Hong, C.I., Nechaev, A., and West, C.R. (1979a) Synthesis and antitumor activity of 1β -D-arabinofuranosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 1223-1229; Hong, C.I., Nechaev, A., Kirisits, A.J. Buchheit, D.J. and West, C.R. (1980) Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-(β-D-arabinofuranosyl)cytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols. *J. Med. Chem.* 28, 171-177; Hostetler, K.Y., Stuhmiller, L.M., Lenting, H.B.M. van den Bosch, H. and Richman, D.D. (1990) Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. *J. Biol. Chem.* 265, 6112-6117; Hostetler, K.Y., Carson, D.A. and

- Richman, D.D. (1991); Phosphatidylazidothymidine: mechanism of antiretroviral action in CEM cells. *J. Biol. Chem.* 266, 11714-11717; Hostetler, K.Y., Korba, B. Sridhar, C., Gardener, M. (1994a) Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice. *Antiviral Res.* 24, 59-67; Hostetler, K.Y., Richman, D.D., Sridhar, C.N. Felgner, P.L., Felgner, J., Ricci, J., Gardener, M.F. Selleseth, D.W. and Ellis, M.N. (1994b) Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in rauscher leukemia virus-infected mice. *Antimicrobial Agents Chemother.* 38, 2792-2797; Hunston, R.N., Jones, A.A. McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J., and De Clercq, E. (1984) Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-fluorouridine. *J. Med. Chem.* 27, 440-444; Ji, Y.H., Moog, C., Schmitt, G., Bischoff, P. and Luu, B. (1990); Monophosphoric acid diesters of 7 β -hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleosides as potential antitumor agents: synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity. *J. Med. Chem.* 33, 2264-2270; Jones, A.S., McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J. and DeClercq, E. (1984) Synthesis, properties, and biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidates. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1471-1474; Juodka, B.A. and Smart, J. (1974) Synthesis of ditribonucleoside a(P \rightarrow N) amino acid derivatives. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 39, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., Yamaji, N., Kato, M., Saito, M., Kawada, T. and Imai, S. (1989) Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities. *Nucleic Acids Res. Sym. Ser.*, 21, 1-2; Kataoka, S., Uchida, R. and Yamaji, N. (1991) A convenient synthesis of adenosine 3',5' cyclic phosphate (cAMP) benzyl and methyl triesters. *Heterocycles* 32, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J.J., O'Connor, T.J., Jones, B.C.N.M., Devine, K.G., Taylor-Robinson, D., Jeffries, D.J. and McGuigan, C. (1992) Comparison of antiviral effects of zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivatives against HIV and MuLV *in vitro*. *Antiviral Chem. Chemother.* 3, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., Saitoh, K.I., Kuninaka, H., Yoshino, H. and Saneyoshi, M. (1989) Antitumor activity and pharmacology of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 679-685; Korty, M. and Engels, J. (1979) The effects of adenosine- and guanosine 3',5'-phosphoric and acid benzyl esters on guinea pig ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310, 103-111; Kumar, A., Goe, P.L., Jones, A.S. Walker, R.T. Balzarini, J. and De Clercq, E. (1990) Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives. *J. Med. Chem.* 33, 2368-2375; LeBec, C., and Huynh-Dinh, T. (1991) Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine and arabinocytidine as anticancer prodrugs. *Tetrahedron Lett.* 32, 6553-6556; Lichtenstein, J., Barner, H.D. and Cohen, S.S. (1960) The metabolism of exogenously supplied nucleotides by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 235, 457-465; Luchty, J., Von Daeniken, A., Friederich, J. Manthey, B., Zweifel, J., Schlatter, C. and Benn, M.H. (1981) Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoepithioalkanes. *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.* 72, 131-133 (*Chem. Abstr.* 95, 127093); McGuigan, C. Tollerfield, S.M. and Riley, P.A. (1989) Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-viral drug Ara. *Nucleic Acids Res.* 17, 6065-6075; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., Galpin, S.A., Jeffries, D.J. and Kinchington, D. (1990a) Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 107-113; McGuigan, C., O'Connor, T.J., Nicholls, S.R. Nickson, C. and Kinchington, D. (1990b) Synthesis and anti-HIV activity of some novel substituted dialkyl phosphate derivatives of AZT and ddCyd. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 355-360; McGuigan, C., Nicholls, S.R., O'Connor, T.J., and Kinchington, D. (1990c) Synthesis of some novel dialkyl phosphate derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 25-33; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., and Kinchington, D. (1991) Synthesis and anti-HIV activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT); potent activity of the trichloroethyl methoxyalaninyl compound. *Antiviral Res.* 15, 255-263; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Mahmood, N., Devine, K.G. and Hay, A.J. (1992) Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV-1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* 17, 311-321; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Choi, S.M., Kinchington, D. and O'Connor, T.J. (1993a) Phosphoramidate derivatives of AZT as inhibitors of HIV; studies on the carboxyl terminus. *Antiviral Chem. Chemother.* 4, 97-101; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Balzarini, J. and De Clercq, E. (1993b) Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT. *J. Med. Chem.* 36, 1048-1052.
- The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates. ¹HNMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3',5'-monophosphate. *J Am. Chem. Soc.* 109, 4058-4064; Nerbonne, J.M., Richard, S., Nargeot, J. and Lester, H.A. (1984) New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations. *Nature* 301, 74-76; Neumann, J.M., Hervé, M., Debouzy, J.C, Guerra, F.I., Gouyette, C, Dupraz, B. and Huynh-Dinh, T. (1989) Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl phospholipid of thymidine. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., Hirano, M., Imai, K. Mizoguchi, H., Nakamura, T., Kosaka, M., Takatuski, K., Yamaya, T., Toyama, K., Yoshida, T., Masaoka, T., Hashimoto, S., Ohshima, T., Kimura, I., Yamada, K. and Kimura, J. (1991) Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1- β -D-rabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate. *Oncology* 48, 451-455.
- Palomino, E., Kessle, D. and Horwitz, J.P. (1989) A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'-dideoxynucleosides to the brain. *J. Med. Chem.* 32, 622-625; Perkins, R.M., Barney, S., Wittrock, R., Clark, P.H., Levin, R. Lambert, D.M., Petteway, S.R., Serafinowska, H.T., Bailey, S.M., Jackson, S., Harnden, M.R. Ashton, R., Sutton, D., Harvey, J.J. and Brown, A.G. (1993) Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a rauscher murine leukemia virus infection in mice. *Antiviral Res.* 20 (Suppl. I). 84; Piantadosi, C, Marasco, C.J., Jr.,

- Morris-Natschke, S.L., Meyer, K.L., Gumus, F., Surles, J.R., Ishaq, K.S., Kucera, L.S. Iyer, N., Wallen, C.A., Piantadosi, S. and Modest, E.J. (1991) Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.* 34, 1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, L., Imbach, J.L., Kahn, S. and Farquhar, D. (1994) Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the 'on-line ISRP-cleaning' HPLC technique. *Antiviral Chem. Chemother.* 5, 91-98; Postemark, T. (1974) Cyclic AMP and cyclic GMP. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 23-33; Prisbe, E.J., Martin, J.C.M., McGee, D.P.C, Barker, M.F., Smeed, D.F. Duke, A.E., Matthews, T.R. and Verheyden, J.P.J. (1986) Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate and phosphonate derivatives of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine. *J. Med. Chem.* 29, 671-675; Puech, F., Gosselin, G., Lefebvre, I., Pompon, A., Aubertin, A.M. Dim, A. and Imbach, J.L. (1993) Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process. *Antiviral Res.* 22, 155-174; Pugaeva, V.P., Klochkeva, S.I., Mashbits, F.D. and Eizengart, R.S. (1969). Robins, R.K. (1984) The potential of nucleotide analogs as inhibitors of retroviruses and tumors. *Pharm. Res.* 11-18; Rosowsky, A., Kim, S.H., Ross and J. Wick, M.M. (1982) Lipophilic 5'-(alkylphosphate) esters of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine and its N⁴-acyl and 2.2'-anhydro-3'-O-acyl derivatives as potential prodrugs. *J. Med. Chem.* 25, 171-178; Ross, W. (1961) Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment. *Biochem. Pharm.* 8, 235-240; Ryu, E.K., Ross, R.J. Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, C.I. and West, C.R. (1982). Phospholipid-nucleoside conjugates. 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'diphosphate[-], 2-diacylglycerols. *J. Med. Chem.* 25, 1322-1329; Saffhill, R. and Hume, W.J. (1986) The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine by serum from different sources and its consequences for the use of these compounds for incorporation into DNA. *Chem. Biol. Interact.* 57, 347-355; Saneyoshi, M., Morozumi, M., Kodama, K., Machida, J., Kuninaka, A. and Yoshino, H. (1980) Synthetic nucleosides and nucleotides. XVI. Synthesis and biological evaluations of a series of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-alkyl or arylphosphates. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2915-2923; Sastry, J.K., Nehete, P.N., Khan, S., Nowak, B.J., Plunkett, W., Arlinghaus, R.B. and Farquhar, D. (1992) Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection. *Mol. Pharmacol.* 41, 441-445; Shaw, J.P., Jones, R.J. Arimilli, M.N., Louie, M.S., Lee, W.A. and Cundy, K.C. (1994) Oral bioavailability of PMEA from PMEA prodrugs in male Sprague-Dawley rats. 9th Annual AAPS Meeting. San Diego, CA (Abstract). Shuto, S., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K. Matsuda, A. and Ueda, T. (1987) A facile one-step synthesis of 5'-phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction. *Tetrahedron Lett.* 28, 199-202; Shuto, S., Itoh, H., Ueda, S., Imamura, S., Kukukawa, K., Tsujino, M., Matsuda, A. and Ueda, T. (1988) A facile enzymatic synthesis of 5'-(3-sn-phosphatidyl)nucleosides and their antileukemic activities. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 209-217. Un grupo profármaco fosfato preferido es el grupo S-acil-2-tioetilo, denominado también "SATE."

Terapia de combinación o de alternancia

- Se ha reconocido que pueden surgir variantes de HBV resistentes a los fármacos después de un tratamiento prolongado con un agente antiviral. La resistencia al fármaco tiene lugar típicamente sobre todo por mutación de un gen que codifica una enzima utilizada en el ciclo vital del virus, y típicamente sobre todo en el caso de HVB, la ADN polimerasa. Recientemente, se ha demostrado que la eficacia de un fármaco contra la infección de HVB se puede prolongar, aumentar o restaurar administrando el compuesto en combinación o de manera alternativa con un segundo, y quizá un tercero, compuesto antiviral, que induce una mutación diferente de la causada por el fármaco principal. Alternativamente, la farmacocinética, biodistribución u otros parámetros del fármaco pueden ser alterados por dicha terapia de combinación o de alternancia. En general, la terapia de combinación es típicamente preferida sobre la terapia de alternancia ya que induce múltiples tensiones simultáneas en el virus.

- La actividad viral anti-hepatitis B de β-L-2'-dA, β-L-2'-dC, β-L-2'-dU, β-L-2'-dG, β-L-2'-dT, β-L-2'-dI, u otros β-L-2'-nucleósidos proporcionados en la presente memoria, o los profármacos, fosfatos o sales de estos compuestos, se puede aumentar administrando dos o más de estos nucleósidos en combinación o en alternancia. Alternativamente, por ejemplo, se pueden administrar uno o más de β-L-2'-dA, β-L-2'-dC, β-L-2'-dU, β-L-2'-dG, β-L-2'-dT, β-L-2'-dI, u otros β-L-2'-nucleósidos proporcionados en la presente memoria, en combinación o en alternancia con 3TC, FTC, L-FMAU, DAPD, famciclovir, penciclovir, BMS-200475, bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil) ; lobucavir, ganviclovir, o ribavarina.

- En cualquiera de las realizaciones descritas aquí, si el β-L-2'-nucleósido de la presente descripción se administra en combinación o de forma alternativa con un segundo inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido o no nucleósido que se fosforila hasta una forma activa, es preferible que el segundo compuesto sea fosforilado mediante una enzima que sea diferente de la que fosforila el β-L-2'-nucleósido seleccionado de la presente descripción *in vivo*. Entre los ejemplos de enzimas cinasas se incluyen la timidina cinasa, citosina cinasa, guanosina cinasa, adenosina cinasa, desoxicitidina cinasa, 5'-nucleotidasa y desoxiguanosina cinasa.

Preparación de los compuestos activos

Los derivados 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos de la presente descripción son conocidos en la técnica y se pueden preparar según el método descrito por Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.* (1972), 37(12), 4072-87 y *Mol. Phys.* (1967), 3(4), 386-95.

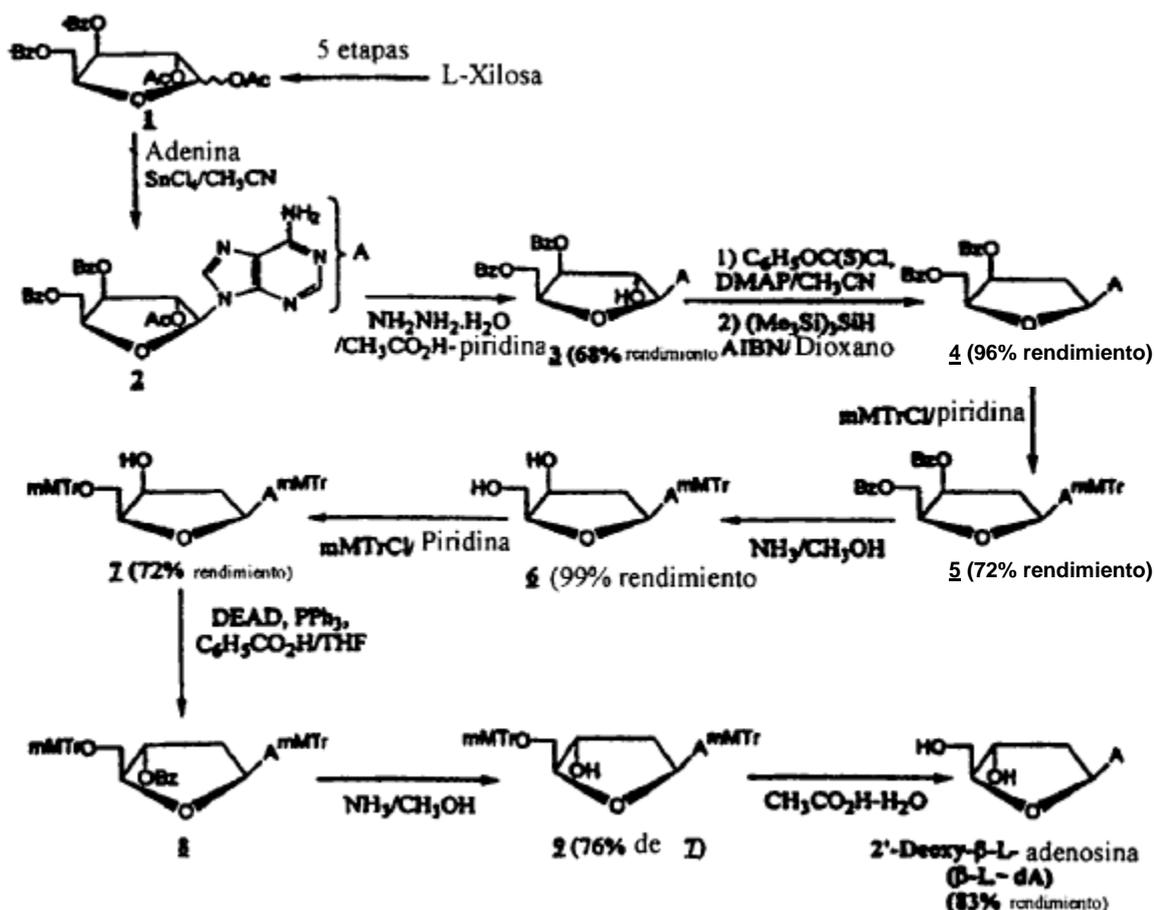
En la figura 1 se muestra un procedimiento general para obtener β -L-eritro-pentafuranonucleósidos (β -L-dN), utilizando L-ribosa o L-xilosa como material de partida.

Los derivados mono, di, y trifosfatos de los nucleósidos activos se pueden preparar como se describe en los métodos publicados. El monofosfato se puede preparar según el procedimiento de Imai et al., *J. Org. Chem.*, 34(6), 1547-1550 (June 1969). El difosfato se puede preparar según el procedimiento de Davison et al., *J. Org. Chem.*, 52(9), 1794-1801 (1987). El trifosfato se puede preparar según el procedimiento de Hoard et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87(8), 1785-1788 (1965).

Protocolos experimentales

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos en un aparato Gallenkamp MFB-595-010 M y están sin corregir. Los espectros de absorción en UV se registraron en un espectrofotómetro Uvikon 931 (KONTRON) en etanol. Los espectros de ^1H -RMN se realizaron a temperatura ambiente en DMSO-d_6 con un espectrómetro Bruker AC 250 ó 400. Los desplazamientos químicos se dan en ppm, siendo ajustado el DMSO-d_6 a 2, 49 ppm como referencia. Se llevaron a cabo los experimentos de desacoplamiento con intercambio de deuterio o 2D-COSY con el fin de confirmar las asignaciones de protón. Las multiplicidades de señal se representan por s (singlete), d (doblete), dd (doblete de dobletes), t (triplete), q (cuadruplete), br (ancho), m (multiplete). Todos los valores J están en Hz. Los espectros de masa FAB fueron registrados en modo iónico positivo (FAB $>$ 0) o negativo (FAB $<$ 0) en un espectrómetro de masas JEOL DX 300. La matriz fue alcohol 3-nitrobenílico (NBA) o una mezcla (50:50, v/v) de glicerol o tioglicerol (GT). Las rotaciones específicas se midieron en un espectropolarímetro Perkin-Elmer 241 (longitud de recorrido 1 cm) y se dan en unidades de 10^{-1} grados. cm^2g^{-1} . Se llevaron a cabo los análisis elementales a través del Service de Microanalyses du CNRS, Division de Vernaison (Francia). Los análisis indicados por los símbolos de los elementos o funciones estuvieron dentro de $\pm 0, 4 \%$ de los valores teóricos. Se realizó la cromatografía en capa fina sobre láminas de aluminio pre-recubiertas con gel de sílice 60 F $_{254}$ (Merck, Art. 5554), llevándose a cabo la visualización de los productos por absorbanza en UV seguido por carbonización con ácido sulfúrico al 10 % en etanol y calentamiento. Se realizó la cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (Merck, Art. 9385) a presión atmosférica.

Ejemplo 1 Síntesis estereoespecífica de 2'-desoxi- β -L-adenosina



9- (3, 5-di-O-benzoil-β-L-xilofuranosil) adenina (3)

5 Se agitaron una solución de 9- (2-O-acetil-3, 5-di-O-benzoil-β-L-xilofuranosil) adenina 2 [Ref: Gosselin, G.; Bergogne, M.C.; Imbach, J. L., Synthesis and Antiviral Evaluation of β-L-Xylofuranosyl Nucleosides of the Five Naturally Occuring Nucleic Acid Bases, *Journal of Heterocyclic Chemistr y*, 1993, **30** (oct-nov) ., 1229-1233] (8, 30 g, 16, 05 mmoles) e hidrato de hidrazina 98% (234 mL, 48, 5 mmoles) mezclados con piridina/ácido acético glaciado (4/1, v/v, 170 mL) a temperatura ambiente, durante 22 h. Se enfrió la reacción por adición de acetona (40 mL) y se continuó agitando durante una hora más. Se redujo la mezcla de reacción a la mitad de su volumen, se diluyó con agua (250 mL) y se extrajo con cloroformo (2 x 150 mL) . Se lavó la capa orgánica sucesivamente con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3x 10 mL) y agua (3 x 100 mL) , se secó, se filtró, se concentró y se co-evaporó con tolueno y metanol. Se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (0-3% MeOH en diclorometano) para dar 3 (5, 2 g, 68%) se hizo precipitar en éter diisopropílico: ¹H-RMN (DMSO-d₆) : δ 4, 5-4, 9 (m, 4H, H-2', H-4', H-5' y H-5'') , 5, 64 (t, 1H, H-3', J_{2,3'} = J_{3,4'} = 3, 5 Hz) , 6, 3 (ancho s, 1H, OH-2') , 6, 45 (d, 1H, H-1', J_{1,2'} = 4, 6 Hz) , 7, 3 (ancho s, 2H, NH₂- 6) , 7, 4-7, 9 (m, 10H, 2 benzoílos) , 8, 07 y 8, 34 (2s, 2H, H-2 y H-8) ; em: matriz G/T, (BAR⁺) m/z 476 [M+H]⁺, 136 [BH₂]⁺, (BAR⁻) m/z 474 [M-H]⁻, 134 [B]⁻; UV (95% etanol) ; λ_{max} 257 nm (ν_{max} 16400) , 230 nm (ν_{max} 29300) , λ_{min} 246 nm (ν_{max} 14800) ; [α]_D²⁰ = -64 (c, 1, 07, CHCl₃) .

Análisis calculado para C₂₄H₂₁N₅O₄ (M = 475, 45) :

C, 60, 43; H, 4, 45; N, 14, 73.

Encontrado: C, 60, 41; H, 4, 68; N, 14, 27.

9- (3, 5-di-O-benzoil-2-desoxi-β-L-treo- pentofuranosil) adenina (4)

20 Se añadieron a una solución del compuesto 3 (1, 00 g, 2, 11 mmoles) en acetonitrilo seco (65 mL) 4- (dimetilamino) piridina (0, 77 g, 6, 32 mmoles) y cloruro de fenoxitiocarbonilo (0, 44 mL, 3, 16 mmoles) . Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras la concentración, se disolvió el residuo en diclorometano (50 mL) y se lavó sucesivamente con agua (2 x 30 mL) , solución acuosa de ácido clorhídrico 0, 5 N (30 mL) y agua (3 x 30 mL) . Se secó la capa orgánica, se filtró y se concentró a sequedad. Se trató directamente el producto intermedio tiocarbonilado en bruto con hidruro de tris- (trimetilsilil) silano (0, 78 mL, 5, 23 mmoles) y α, α'-azoisobutironitrilo (AIBN, 0, 112 g, 0, 69 mmoles) en dioxano seco (17 mL) a reflujo durante 2 horas. Se eliminó el disolvente al vacío y se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (0-5% MeOH en diclorometano) para dar 4 puro (0, 93 g, 96%) como una espuma: ¹H RMN (DMSO-d₆) : δ 2, 9-3, 1 (m, 2H, H-2' y H-2'') , 4, 6-4, 7 (m, 3H, H-4', H-5' y H-5'') , 5, 8 (ancho s, 1H, H-3') , 6, 43 (dd, 1H, H-1', J_{1,2'} = 3, 1 Hz, J_{1,2''} = 7, 6 Hz) , 7, 3 (ancho s, 2H, NH₂- 6) , 7, 4-7, 9 (m, 10H, 2 benzoílos) , 8, 05 y 8, 33 (2s, 2H, H-2 y H-8) ; em: matriz G/T, (BAR⁺) m/z 460 [M+H]⁺, 325 [S]⁺, 136 [BH₂]⁺, (BAR⁻) m/z 458 [M-H]⁻, 134 [B]⁻; UV (95% etanol) : λ_{max} 261 nm (ν_{max} 14400) , 231 nm (ν_{max} 26300) , λ_{min} 249 nm (ν_{max} 12000) ; [α]_D²⁰ = -38 (c, 1, 04, DMSO) .

6-N- (4-monometoxitritil) -9- (3, 5-di-O-benzoil-2-desoxi-β-L-treo- pento-furanosil) adenina (5)

35 Se añadió a una solución del compuesto 4 (0, 88 g, 1, 92 mmoles) en piridina seca (40 mL) cloruro de 4-monometoxitritil (1, 18 g, 3, 84 mmoles) . Se agitó la mezcla a 60°C durante 24 horas. Tras la adición de metanol (5 mL) , se concentró la solución a sequedad, se disolvió el residuo en diclorometano (50 mL) y se lavó sucesivamente con agua (30 mL) , solución acuosa saturada de NaHCO₃ (30 mL) y agua (30 mL) . Se secó la capa orgánica, se filtró, se concentró y se co-evaporó con tolueno para dar 5 puro (1, 01 g, 72%) como una espuma: ¹H RMN (CDCl₃) : δ 2, 9-3, 0 (m, 2H, H-2' y H-2'') , 3, 62 (s, 3H, OCH₃) , 4, 6-4, 8 (m, 3H, H-4', H-5' y H-5'') , 5, 85 (pt, 1H, H-3') , 6, 44 (dd, 1H, H-1', J_{1,2'} = 3, 1 Hz, J_{1,2''} = 7, 3 Hz) , 6, 9 (ancho s, 1H, NH-6) , 6, 7-6, 8 y 7, 2-7, 4 (2m, 24H, 2 benzoílos y MMTr) , 7, 97 y 8, 13 (2s, 2H, H-2 y H-8) ; em: matriz G/T, (BAR⁺) m/z 732 [M+H]⁺, (BAR⁻) m/z 730 [M-H]⁻; UV (95% etanol) : λ_{max} 274 nm (ν_{max} 12100) , 225 nm (ν_{max} 24200) , λ_{min} 250 nm (ν_{max} 5900) ; [α]_D²⁰ = -16 (c 1, 12, DMSO) .

6-N- (4-monometoxitritil) -9- (2-desoxi-β-L-treo- pentofuranosil) -adenina (6)

45 Se trató el compuesto 5 (0, 95 g, 1, 30 mmoles) con una solución (saturada a -10°C) de amoníaco metanólico (40 mL) , a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras la concentración, se disolvió el residuo en diclorometano (60 mL) y se lavó con agua (30 mL) . Se extrajo la capa acuosa dos veces con diclorometano (10 mL) . Se secó la capa orgánica combinada, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (0-5% MeOH en diclorometano) para dar 6 puro (0, 67 g, 98%) como espuma: ¹H RMN (CDCl₃) : δ 2, 6-2, 9 (m, 2H, H-2' y H-2'') , 3, 5 (ancho s, 1H, OH-5') , 3, 55 (s, 3H, OCH₃) , 3, 9-4, 0 (m, 3H, H-4', H-5' y H-5'') , 4, 5-4, 6 (m, 1H, H-3') , 6, 03 (dd, 1H, H-1', J_{1,2'} = 4, 0 Hz, J_{1,2''} = 8, 8 Hz) , 7, 0 (ancho s, 1H, NH-6) , 6, 7-6, 8 y 7, 1-7, 4 (2m, 14H, MMTr) , 7, 40 (d, 1H, OH-3', J_{H, OH} = 10, 6 Hz) , 7, 80 y 7, 99 (2s, 2H, H-2 y H-8) ; em: matriz G/T, (BAR⁺) m/z 524

$[M+H]^+$, 408 $[BH_2]^+$ (BAR^-) m/z 1045 $[2M-H]^-$, 522 $[M-H]^-$, 406 $[B]^-$; UV (95% etanol) : λ_{max} 275 nm (ϵ 12300) , λ_{min} 247 nm (ϵ 3600) ; $[\alpha]_D^{20} = +28$ (c 0, 94, DMSO) .

6-N- (4-monometoxitritil) -9- (2-desoxi-5-O- (4-monometoxi-tritil) - β -L-*treo*- pentofuranosil) adenina (7)

5 Se trató el compuesto 6 (0, 62 g, 1, 24 mmoles) en piridina seca (25 mL) con cloruro de 4-monometoxitritilo (0, 46 g, 1, 49 mmoles) a temperatura ambiente durante 16 horas. Tras la adición de metanol (5 mL) , se concentró la mezcla a sequedad. Se disolvió el residuo en diclorometano (60 mL) y se lavó sucesivamente con agua (40 mL) , una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (40 mL) y agua (3 x 40 mL) . Se secó la capa orgánica, se filtró, se concentró y se co-evaporó con tolueno y metanol. Se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (0-10% MeOH en diclorometano) para dar 7 (0, 71 g, 72%) como una espuma: 1H RMN (DMSO- d_6) : δ 2, 21 (d, 1H, H-2' $J_{2',2''} = 14, 3$ Hz) , 2, 6-2, 7 (m, 1H, H-2'') , 3, 1-3, 3 (2m, 2H, H-5' y H-5'') , 3, 64 y 3, 65 (2s, 6H, 2 x OCH_3) , 4, 1-4, 2 (m, 1H, H-4') , 4, 2-4, 3 (m, 1H, H-3') , 5, 68 (d, 1H, OH-3' , $J_{H,OH} = 5, 2$ Hz) , 6, 24 (d, 1H, H-1' , $J_{1',2'} = 7, 0$ Hz) , 6, 7-6, 8 y 7, 1-7, 3 (2m, 29H, 2 MMT r y NH-6) , 7, 83 y 8, 21 (2s, 2H, H-2 y H-8) ; ms: matriz G/T, (BAR^+) m/z 796 $[M+H]^+$, 408 $[BH_2]^+$, (BAR^-) m/z 794 $[M-H]^-$, 406 $[B]^-$; UV (95% etanol) : λ_{max} 275 nm (ϵ 30900) , λ_{min} 246 nm (ϵ 12800) ; $[\alpha]_D^{20} = +14$ (c 1, 03, DMSO) .

15 6-N- (4-monometoxitritil) -9- (3-O-benzoil-2-desoxi-5-O- (4-monometoxitritil) - β -L-*eritro*-pentofuranosil) adenosina (8)

20 Se añadió una solución de dietilazodicarboxilato (0, 38 mL, 2, 49 mmoles) en tetrahidrofurano seco (20 mL) gota a gota a una solución enfriada (0°C) de nucleósido 7 (0, 66 g, 0, 83 mmoles) , trifenilfosfina (0, 66 g, 2, 49 mmoles) y ácido benzoico (0, 30 g, 2, 49 mmoles) en THF seco (20 mL) . Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas y se añadió metanol (1 mL) . Se eliminaron los disolventes a presión reducida y se purificó el material en bruto por cromatografía de columna sobre gel de sílice (0-5% acetato de etilo en diclorometano) para dar el compuesto 8 contaminado ligeramente con óxido de trifenilfosfina.

6-N- (4-monometoxitritil) -9- (2-desoxi-5-O- (4-monometoxi-tritil) - β -L-*eritro*- pentofuranosil) adenina (9)

25 Se trató el compuesto 8 con una solución (saturada a -10°C) de amoníaco metanólico (20 mL) , a temperatura ambiente durante 24 horas, a continuación, se concentró a sequedad la mezcla de reacción. Se disolvió el residuo en diclorometano (30 mL) y se lavó con agua (20 mL) . Se extrajo la capa acuosa con diclorometano (2 x 20 mL) y se secó la fase orgánica combinada, se filtró y se concentró. Se obtuvo el compuesto 9 puro (0, 50 g, 76% a partir de 7) como una espuma tras la purificación por cromatografía de columna sobre gel de sílice (0-2% MeOH en diclorometano) : 1H RMN (DMSO- d_6) : δ 2, 2-2, 3 (m, 1H, H-2') , 2, 8-2, 9 (m, 1H, H-2'') , 3, 1-3, 2 (m, 2H, H-5' y H-5'') , 3, 64 y 3, 65 (2s, 6H, 2 x OCH_3) , 3, 97 (pq, 1H, H-4') , 4, 4-4, 5 (m, 1H, H-3') , 5, 36 (d, 1H, OH-3' , $J_{H,OH} = 4, 5$ Hz) , 6, 34 (t, 1H, H-1' , $J_{1',2'} = J_{1',2''} = 6, 4$ Hz) , 6, 8-6, 9 y 7, 1-7, 4 (2m, 29H, 2 MMT r y NH-6) , 7, 81 y 8, 32 (2s, 2H, H-2 y H-8) ; em: matriz G/T, (BAR^+) m/z 796 $[M+H]^+$, 408 $[BH_2]^+$, (BAR^-) m/z 794 $[M-H]^-$, 406 $[B]^-$; UV (95% etanol) : λ_{max} 276 nm (ϵ 42600) , λ_{min} 248 nm (ϵ 23300) ; $[\alpha]_D^{20} = +29$ (c 1, 05, DMSO) .

2'-desoxi- β -L-adenosina (β -L-dA)

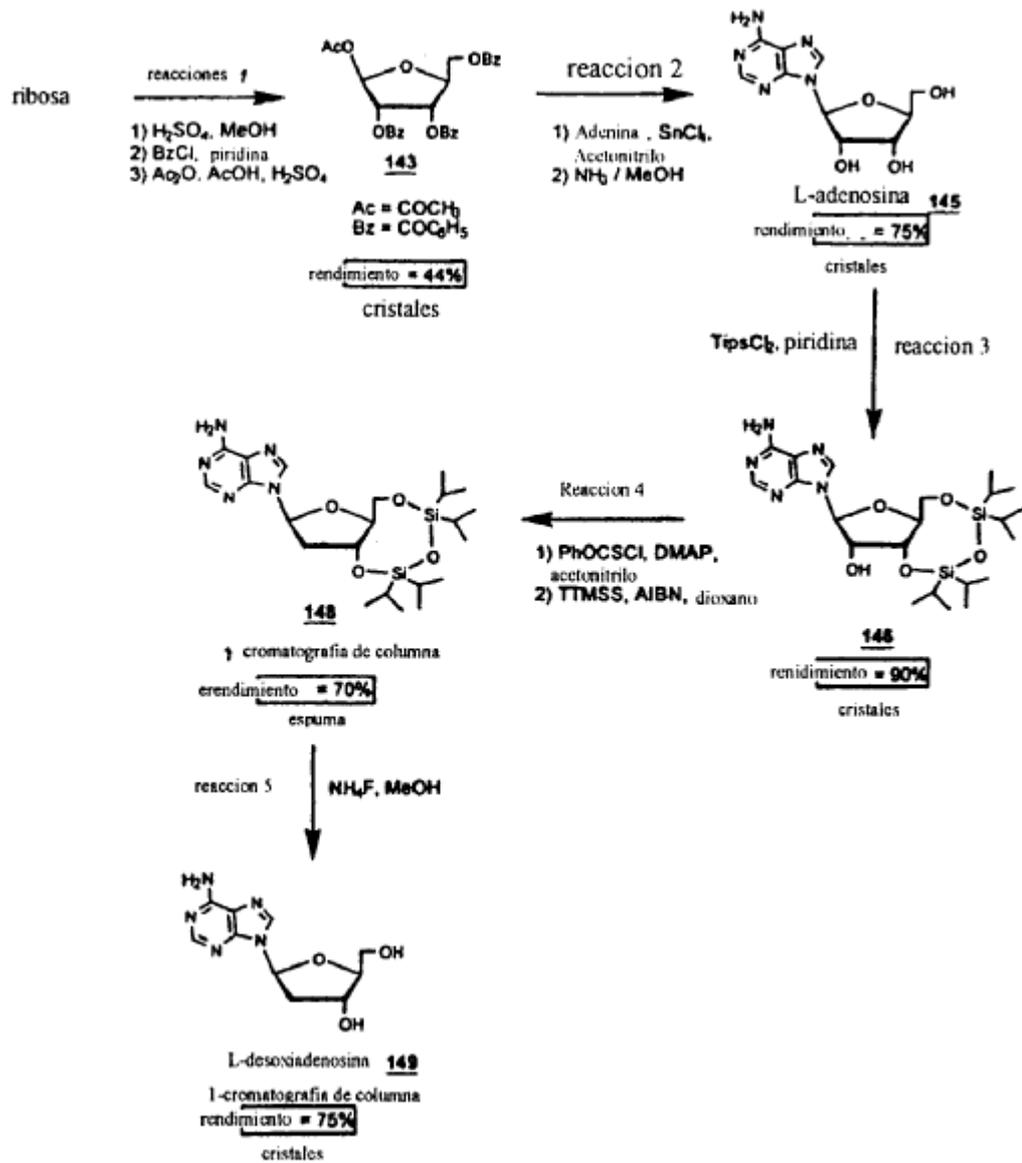
35 Se trató el compuesto 9 (0, 44 g, 0, 56 mmoles) con una solución acuosa de ácido acético al 80% (17 mL) a temperatura ambiente durante 5 horas. Se concentró la mezcla a sequedad, se disolvió el residuo en agua (20 mL) y se lavó con éter dietílico (2 x 15 mL) . Se concentró la capa acuosa y se co-evaporó con tolueno y metanol. Se obtuvo el 2'-desoxi- β -L-adenosina deseado (β -L-dA) (0, 12 g, 83%) tras la purificación por cromatografía de columna sobre gel de sílice (0-12% MeOH en diclorometano) y filtración a través de una unidad Millex HV-4 (0', 45 μ , Millipore) : pf. 193-194°C (cristalizado en agua) (Lit. 184-185°C para L-enantiómero [Ref: Robins, M.J. Khwaja, T.A.; Robins, R.K. J. Org. Chem. 1970, 35, 636-639] y 187-189°C para D-enantiómero [Ref: Ness, R.K. en *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* ; Zorbach, W.W. Tipson, R.S., Eds; J. Wiley and sons; Nueva York, 1968; vol. 1, pp. 183-187]; 1H - RMN (DMSO- d_6) : δ 2, 2-2, 3 y 2, 6-2, 7 (2 m, 2H, H-2' y H-2'') , 3, 4-3, 6 (2m, 2H, H-5' y H-5'') , 3, 86 (pq, 1H, H-4') , 4, 3-4, 4 (m, 1H, H-3') , 5, 24 (t, 1H, OH-5' , $J_{H,OH} = 5, 8$ Hz) , 5, 30 (d, 1H, OH-3' , $J_{H,OH} = 4, 0$ Hz) , 6, 32 (dd, 1H, H-1' , $J_{1',2'} = 6, 2$ Hz, $J_{1',2''} = 7, 8$ Hz) , 7, 3 (ancho s, 2H, NH-6) , 8, 11 y 8, 32 (2s, 2H, H-2 y H-8) ; em: matriz G/T, (BAR^+) m/z 252 $[M+H]^+$, 136 $[BH_2]^+$, (BAR^-) m/z 250 $[M-H]^-$, 134 $[B]^-$; UV (95% etanol) : λ_{max} 258 nm (ϵ 14300) , λ_{min} 226 nm (ϵ 2100) ; $[\alpha]_D^{20} = +25$ (c 1, 03, H_2O) , (Lit. $[\alpha]_D^{20} = +23$ (c 1, 0, H_2O) para L-enantiómero [Ref: Robins, M.J.; Khwaja, T.A.; Robins, R. K. J. Org. Chem., 1970, 35, 636-639] y $[\alpha]_D^{20} = -25$ (c 0, 47, H_2O) para D-enantiómero [Ref: Ness, R. K. en *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* ; Zorbach, W.W. Tipson, R. S., Eds.; J. Wiley and sons: Nueva York, 1968; vol. 1, pp. 183-187]) .

50 Análisis calculado para $C_{10}H_{13}N_5O_3 + 1, 5 H_2O$ (M = 278, 28) :

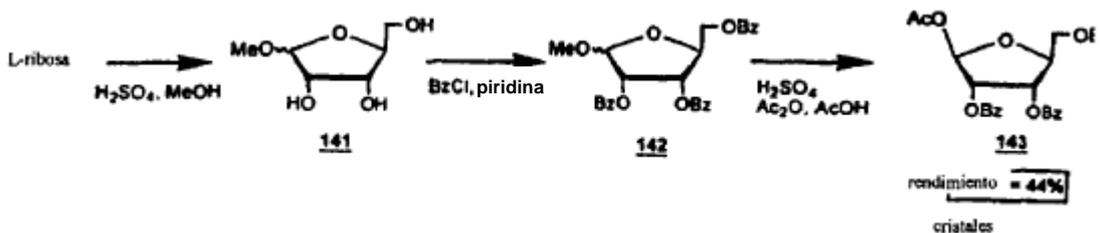
C, 43, 16; H, 5, 80; N, 25, 17.

Encontrado: C, 43, 63; H, 5, 45; N, 25, 33.

Ejemplo 2 Síntesis estereoselectiva de 2'-desoxi- β -L-adenosina (β -L-dA)



Reacción 1



5

Precursor: L-ribose (Cultor Science Food, CAS [24259-59-4], lote RIB9711013) .

Reactivos: Ácido sulfúrico 95-97% (Merck; ref. 1.00731.1000) ; Cloruro de benzoilo (Fluka; ref. 12930) ; sulfato sódico (Prolabo; ref 28111.365) .

10

Disolventes: Metanol P.A. (Prolabo; ref. 20847.295) ; piridina 99% (Acros; ref. 131780025) ; Diclorometano P.A. (Merck; ref. 1.06050.6025) ; ácido acético P.A. (Carlo erba; ref. 20104298) ; anhídrido acético (Fluka; ref. 45830) ; Etanol 95 (Prolabo; ref. 20823.293) .

Referencias: Recondo, E.F. y Rinderknecht, H. Eine neue, Einfache Synthese des 1-O-acetil-2, 3, 5-tri-O-β-D-Ribofuranosides. *Helv. Chim. Acta.* 1171-1173 (1959) .

Se trató una solución de L-ribose 140 (150 g, 1 mol) en metanol (2 litros) con ácido sulfúrico (12 ml) y se dejó en reposo a +4°C durante 12 horas, y después se neutralizó con piridina (180 ml) . La evaporación dio una mezcla α, β de metil ribofuranosidas 141 como un jarabe. Se trató una solución de esta mezcla anomérica en piridina (1, 3 litros) con cloruro de benzoilo (580 ml, 5 moles) con enfriado y agitación mecánica. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 12 horas y después se vertió sobre hielo (aproximadamente 10 litros) con agitación continua. Se filtró la mezcla (un aceite en agua) sobre un lecho de Celite. Se lavó el aceite resultante sobre el lecho de celite con agua (3 x 3 litros) y después se disolvió en acetato de etilo (3 litros) . Se lavó la fase orgánica con una solución de NaHCO₃ al 5% (2 litros) y agua (2 litros) , se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó para dar 1-O-metil-2, 3, 5-tri-O-benzoil-α/β-L-ribofuranosa 142 como un jarabe espeso. Se disolvió el aceite en anhídrido acético (560 ml) y ácido acético (240 ml) . Se mantuvo la solución, tras la adición gota a gota de ácido sulfúrico concentrado (80 ml) en frío (+4°C) con agitación mecánica durante 10 horas. A continuación, se vertió la solución sobre hielo (aproximadamente 10 litros) con agitación continua. Se filtró la mezcla (compuesto oleoso en agua) sobre un lecho de celite. Se lavó el sólido gomoso resultante sobre el lecho de celite con agua (3 x 3 litros) y después se disolvió en diclorometano (2, 5 litros) . Se lavó la fase orgánica con 5% de NaHCO₃ (1 litro) y agua (2 x 2 litros) , se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó para dar un sólido gomoso 143, que fue cristalizado en etanol 95 (rendimiento 225 g, 44%) .

Análisis para 1-O-acetil-2, 3, 5-tri-O-benzoil-β-L-ribofuranosa 143

p.f. 129-130°C (EtOH 95) (lit (1) pf. 130-131°C)

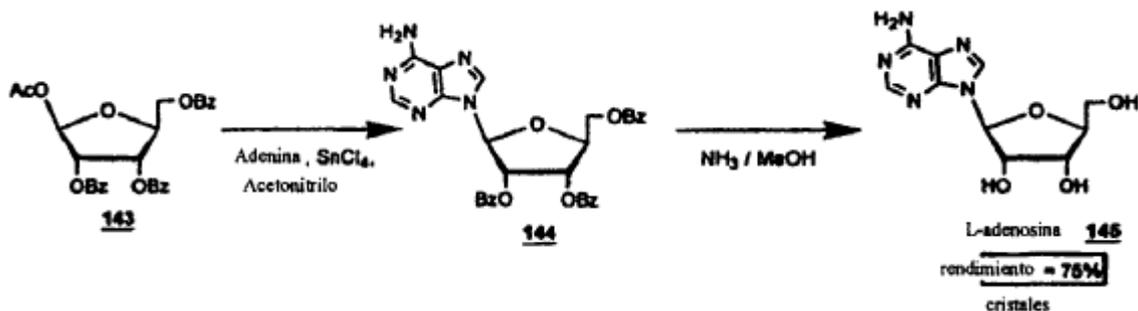
¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) : δ 8, 09-7, 87 (m, 6H, H_{Arom}) , 7, 62 -7, 31 (m, 9H, H_{Arom}) , 6, 43 (s, 1H, H₁) , 5, 91 (dd, 1H, H₃, J_{3,4}, J_{3,4}, 6, 7 Hz; J_{3,2} 4, 9 Hz) , 5, 79 (pd, 1H, H₂, J_{2,3}, 4, 9 Hz; J_{1,2}<1) , 4, 78 (m, 2H, H₄ y H₅) ; 4, 51 (dd, 1H, H₅, J_{5,4} 13, 1 Hz, J_{5,4} 5, 5Hz) , 2, 00 (s, 3H, CH₃CO) ; (idéntico a 1-O-acetil-2, 3, 5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosa comercial) .

Análisis de masa (BAR+, GT) m/z 445 (M-OAc) +

Análisis elemental C₂₈H₂₄O₉ Calculado: C 66, 66 H 4, 79;

encontrado C H

Reacción 2



Precursor: Adenina (Pharma-Waldhof; ref 400134.001 lote 45276800) .

Reactivos: Cloruro estánico fumante (Fluka; ref. 96558) ; NH₃/Metanol (metanol saturado con NH₃; ver página 5) ; sulfato sódico (Prolabo; ref. 28111.365) .

Disolventes: Acetonitrilo (Riedel-de Hean; ref. 33019; destilado sobre CaH₂) ; cloroformo Pur (Across; ref. 22706463) ; acetato de etilo Pur (Carlo erba; ref 528299) .

Referencias: Saneyoshi, M. y Satoh, E., Synthetic Nucleosides and Nucleotides. XIII. Stannic Chloride Catalyzed Ribosylation of Several 6-Substituted Purines. *Chem. Pharm. Bull.* 27, 2518-2521 (1979) ; Nakayama, C. and Saneyoshi, M. Synthetic Nucleosides and Nucleotides. XX. Synthesis of Various 1-β-Xylofuranosyl-5-Alkyluracils and Related Nucleosides. *Nucleosides, Nucleotides*, 1, 139-146 (1982) .

Se suspendió adenina (19, 6 g, 144 mmoles) en acetonitrilo (400 ml) con 1-O-acetil-2, 3, 5-tri-O-benzoil-β-L-ribofuranosa 143 (60 g, 119 mmoles) . Se añadió a esta suspensión cloruro estánico fumante (22 ml, 187 mmoles) . Al cabo de 12 horas, se concentró la reacción a un pequeño volumen (aproximadamente 100 ml) y se añadieron hidrogenocarbonato sódico (110 g) y agua (120 ml) . Se extrajo el sólido blanco resultante (sales de estaño) con

5 cloroformo caliente (5 x 200 ml) . Se filtraron los extractos combinados sobre un lecho de celite. Se lavó la fase orgánica con solución de NaHCO_3 al 5% y agua, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó para dar el compuesto 144 (60 g, espuma incolora) . Se trató la espuma con metanol saturado con amoníaco (220 ml) en un recipiente sellado, a temperatura ambiente con agitación durante 4 días. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se suspendió el polvo resultante en acetato de etilo (400 ml) a reflujo durante 1 hora. Tras la filtración, se cristalizó el polvo en agua (220 ml) para dar L-adenosina 145 (24 g, cristales, 75%) .

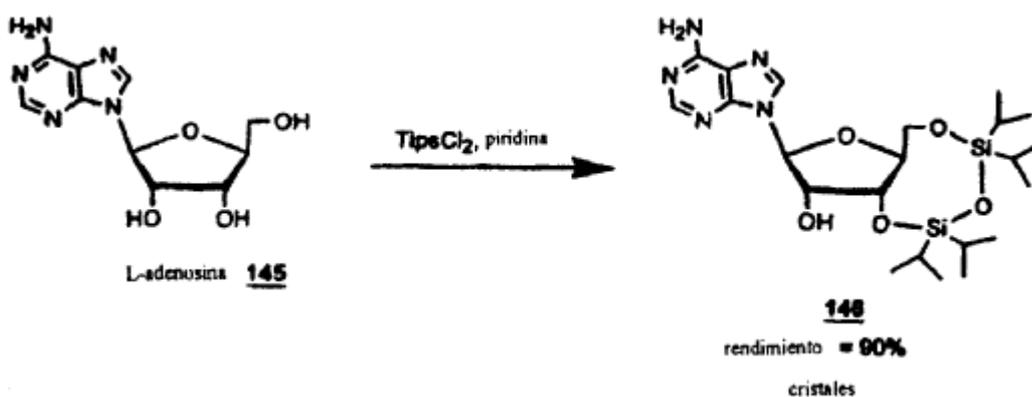
Análisis para β -L-adenosina

p.f. 233-234°C (agua) (lit (4) p.f. 235°C-238°C) .

10 ^1H RMN (200 MHz, DMSO-d_6) : δ 8, 34 y 8, 12 (2s, 2H, H_2 y H_8) , 7, 37 (1s, 2H, NH_2) , 5, 86 (d, 1H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1',2'} 6, 2\text{Hz}$) , 5, 43 (m, 2H, $\text{OH}_{2'}$ y $\text{OH}_{5'}$) , 5, 19 (d, 1H, $\text{OH}_{3'}$, $J 3, 7\text{Hz}$) , 4, 60 (m, H_2) , 4, 13 (m, 1H, H_3) , 3, 94 (m, 1H, H_4) , 3, 69-3, 49 (m, 2H, H_{5a} y H_{5b}) , (idéntico a D-adenosina comercial) .

Análisis de masa (BAR+, GT) m/z 268 ($\text{M}+\text{H}^+$) , 136 (BH_2^+)

Reacción 3



15 *Reactivos:* 1, 3-dicloro-1, 1, 3, 3-tetraisopropildisiloxano (Fluka, ref 36520) ; sulfato sódico (Prolabo; ref 28111.365) .

Disolventes: Piridina 99% (Acros; ref 131780025) ; acetato de Etilo Pur (Carlo erba; ref. 528299) ; Acetonitrilo (Riedel-de- Haen; ref. 33019) .

20 *Referencia:* **Robins**, M.J. y cols., *Nucleic Acid Related Compounds*. 42. A General Procedure for the Efficient Deoxygenation of Secundar y Alcohols. Regiospecific and Stereoselective Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4059-4065 (1983) .

25 Se añadió a L-adenosina 145 (47, 2 g, 177 μmoles) suspendida en piridina (320 ml) 1, 3-cloro-1, 1, 3, 3-tetraisopropildisiloxano (63 ml, 201 μmoles) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. Se evaporó piridina y se repartió el residuo con acetato de etilo (1 litro) y una solución de NaHCO_3 al 5% (600 ml) . Se lavó la fase orgánica con solución 0, 5N de HCl (2 x 500 ml) y agua (500 ml) , se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó a sequedad. Se cristalizó el sólido resultante en acetonitrilo para dar el compuesto 146 (81 g, 90%) .

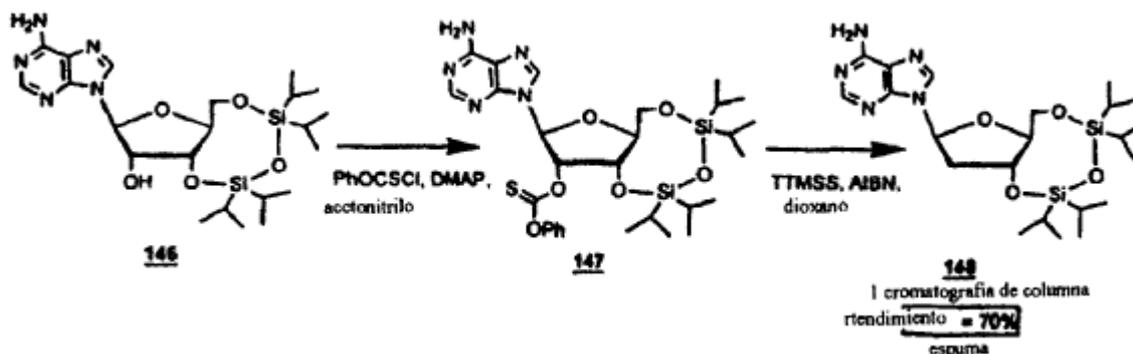
Análisis 3', 5'-O- (1, 1, 3, 3-tetraisopropil-1, 3-disiloxanil) - β -L-adenosina 146

p.f. 97-98°C (acetonitrilo) (lit. (5) enantiómero D p.f. 98°C)

30 ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) : δ 8, 28 y 7, 95 (2s, 2H, H_2 y H_8) , 5, 96 (d, 1H, $J_{1',2'} 1, 1\text{Hz}$) , 5, 63 (s, 2H, NH_2) , 5, 10 (dd, 1H, H_3 , $J_{3',4'} 7, 6\text{Hz}$, $J_{3',2'} 5, 5\text{Hz}$) , 4, 57 (dd, 1H, H_2 , $J_{2',1'} 1, 2\text{Hz}$; $J_{2',3'} 7, 6\text{Hz}$) , 4, 15-3, 99 (m, 3H, H_4 , H_{5a} y H_{5b}) , 3, 31 (sl, 1H, $\text{OH}_{2'}$) , 1, 06 (m, 28H, protones isopropilo)

Análisis de masa (BAR-, GT) m/z 508 ($\text{M}-\text{H}^-$) ; 134 (B^-) ; (BAR+, GT) m/z 510 ($\text{m}+\text{H}^+$) , 136 (BH_2^+) .

Reacción 4



5 **Reactivos:** Dimetilaminopirina, 99% (Acros; ref. 1482702050) ; Fenilclorotiocarbonato 99% (Acros; ref 215490050) ; Tris (trimetilsilil) silano TTMSS (Fluka; ref 93411) ; α , α' -Azoisobutironitrilo AIBN (Fluka, ref. 11630) ; sulfato sódico (Prolabo; ref 28111.365) .

Disolventes: Acetonitrilo (Riedel-de-Haen; ref. 33019) ; acetato de etilo Pur (Carlo Erba; ref. 528299) ; Dioxano P.A. (Merck; ref. 1.09671.1000) ; Diclorometano (Merck; ref. 1.06050.6025) ; metanol (Carlo Erba; ref. 309002) ;

10 **Referencia:** **Robins, M.J. Wilson, J.S. and Hansske, F.,** Nucleic Acid Related Compounds. 42. A General Procedure for the Efficient Deoxygenation of Secundar y Alcohols. Regiospecific and Stereoselective Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleosides. *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 4059-4065 (1983) .

15 Se añadieron al compuesto 146 (34 g, 67 mmoles) acetonitrilo (280 ml) , DMAP (16, 5 g, 135 mmoles) y clorotiocarbonato de fenilo (10, 2 ml, 73 mmoles) . Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 12 horas. Se evaporó el disolvente y se repartió el residuo entre acetato de etilo (400 ml) y solución 0, 5N de HCl (400 ml) . Se lavó la capa orgánica con solución 0, 5 N de HCl (400 ml) y agua (2 x 400 ml) , se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó al sequedad para dar el producto intermedio como un sólido amarillo pálido. Se disolvió el producto bruto 147 en dioxano (ml) y se añadieron AIBN (3, 3 g, 20 mmoles) y TTMSS (33 ml, 107 mmoles) . Se calentó progresivamente la solución hasta el reflujo y se agitó durante 2 horas. Se concentró la reacción hasta obtener un aceite amarillo que fue cromatografiado (eluyente diclorometano/metanol 95/5) para dar el compuesto 148 (23 g, espuma incolora, 70%) . Se cristalizó una parte alícuota en etanol/éter de petróleo.

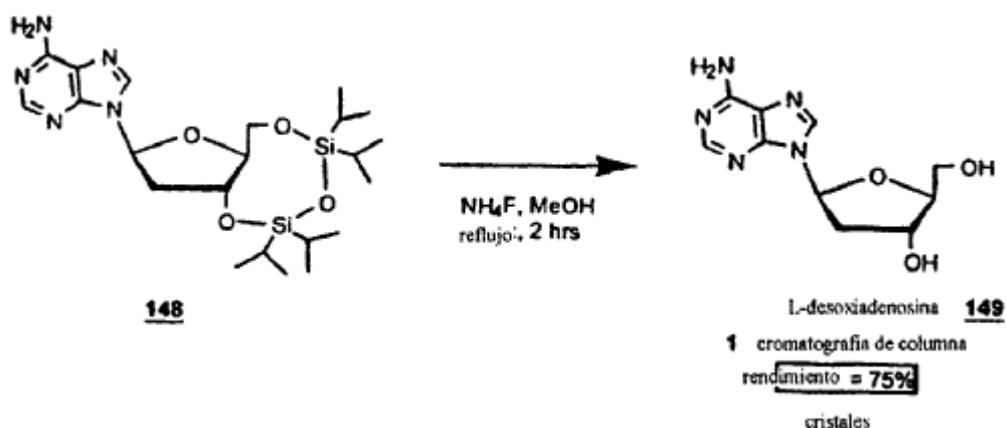
20 **Análisis para 3', 5'-O- (1, 1, 3, 3-tetraisopropil-1, 3-disiloxanil) -2'-desoxi- β -L-adenosina 148**

p.f. 110-111°C (EtOH/éter de petróleo) (Lit. (5) p.f. 113-114°C (EtOH) .

^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) : δ 8, 33 y 8, 03 (2s, 2H, H_2 y H_8) , 6, 30 (dd, 1H, H_1 , J 2, 85 Hz, J 7, 06 Hz) , 5, 63 (sl, 2H, NH_2) , 4, 96 (m, 1H, H_3) , 4, 50 (m, 2H, H_{5a} y H_{5b}) , 2, 68 (m, 2H, H_{2a} y H_{2b}) , 1, 08 (m, 28H, protones de isopropilo) .

25 **Análisis de masa (BAR+, GT) m/z 494 (M+H) $^+$** , 136 (BH_2) $^+$.

Reacción 5



Reactivos: Fluoruro amónico (Fluka; ref. 09742) ; gel de sílice (Merk; ref. 1.07734.2500) .

Disolventes: Metanol P.A. (Prolabo; ref. 20847.295) ; diclorometano P.A. (Merck; ref. 1.06050.6025) ; Etanol 95 (Prolabo; ref. 20823.293) .

5 *Referencia: Zhang, W. and Robins, M. J., Removal of Silyl Protecting Groups from Hydroxyl Functions with Ammonium Fluoride in Methanol Tetrahedron Lett., 33, 1177-1180 (192) .*

10 Se agitó una solución de 3', 5'-O- (1, 1, 3, 3-tetraisopropil-1, 3-disiloxanil) -2'-desoxi-L-adenosina 148 (32 g, 654 mmoles) y fluoruro amónico (32 g, mmoles) en metanol a reflujo durante 2 horas. Se añadió gel de sílice y se evaporó cuidadosamente la mezcla para dar un polvo blanco. Se añadió este polvo a la parte superior de una columna de sílice, que fue eluida con diclorometano/metanol 9/1. Se combinaron las fracciones apropiadas y se evaporaron para dar un polvo blanco, que fue cristalizado en etanol 95 (12, 1 g, 75%) .

Análisis para 2'-desoxi-β-L-adenosina 149

p.f. 189-190°C (EtOH 95) (idéntico a 2'-desoxi-D-adenosina comercial) .

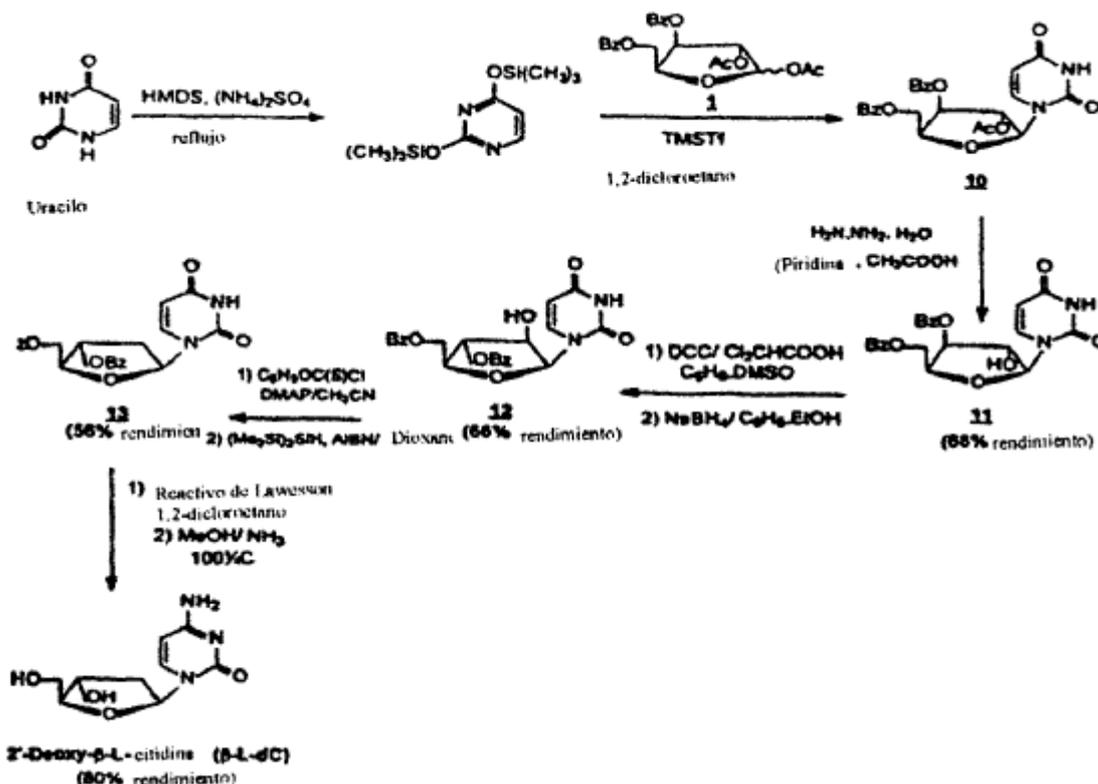
15 ¹H RMN (200 MHz, DMSO-d₆) ; δ 8, 35 y 8, 14 (2s, 2H, H₂ y H₈) , 7, 34 (sl, 2H, NH₂) , 6, 35 (dd, 1H, H_{1'}, J 6, 1 Hz, J 7, 85 Hz) , 5, 33 (d, 1H, OH_{2'}, J 4, 0 Hz) , 5, 28 (dd, 1H, H_{3'}, J 4, 95 Hz; J 6, 6 Hz) , 4, 42 (m, 1H, OH_{5'}) , 3, 88 (m, 1H, H_{4'}) , 3, 63-3, 52 (m, 2H, H_{5'a} y H_{5'b}) , 2, 71 (m, 1H, H_{2'a}) , 2, 28 (m, 1H, H_{2'b}) (idéntico a 2'-desoxi-D-adenosina comercial) .

αD+26° (c 0, 5 agua) 2'-desoxi-D-adenosina comercial -25° (c 0, 5 agua) .

UV λ_{max} 260 nm (ε 14100) (H₂O) .

Análisis de masa (BAR+, GT) m/z 252 (M+H)⁺, 136 (BH₂)⁺ .

20 **Ejemplo 3** Síntesis estereoespecífica de 2'-desoxi-β-L-citidina



1- (3, 5-Di-O-benzoil-β-L-xilofuranosil) uracilo (11)

25 Se añadió hidrato de hidrazina (1, 4 ml; 28, 7 mmoles) a una solución de 1- (2-O-acetil-3, 5-di-O-benzoil-β-L-xilofuranosil) uracilo 10 [ref: Gosselin, G.; Bergogne, M. C.; Imbach, J-L., Synthesis and Antiviral Evaluation of β-L-Xylofuranosyl Nucleosides of the Five Naturally Occuring Nucleic Acid Bases, Journal of Heterocyclic Chemistr y ,

1993, 30 (oct-nov) , 1229-1233] (4, 79 g, 9, 68 mmoles) en piridina (60 mL) y ácido acético (15 mL) . Se agitó la solución durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió acetona (35 mL) y se agitó la mezcla durante 30 minutos. Se evaporó la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de metanol en etapas (0-4%) en diclorometano para dar 11 (3, 0 g, 68%) , que fue cristalizado en ciclohexano/diclorometano: p.f. = 111-114°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) : δ 11, 35 (ancho s, 1H, NH) , 7, 9-7, 4 (m, 11H, 2 C₆H₅CO, H-6) , 6, 38 (d, 1H, OH-2', J_{OH-2'} = 4, 2 Hz) , 5, 77 (d, 1H, H-1', J_{1', 2'} = 1, 9 Hz) , 5, 55 (d, 1H, H-5, J₅₋₆ = 8, Hz) , 5, 54 (dd, 1H, H-3', J_{3', 2'} = 3, 9 Hz y J_{3', 4'} = 1, 8 Hz) , 4, 8 (m, 1H, H-4') , 4, 7 (m, 2H, H-5' y H-5'') , 4, 3 (m, 1H, H-2') ; EM: BAR > 0 (matriz GT) m/z 453 (M+H)⁺ ; 105 (C₆H₅CO)⁺ ; BAR < 0 (matriz GT) m/z 451 (M-H)⁻ ; 121 (C₆H₅CO₂)⁻ , 111 (B)⁻ ;

10 Análisis calculado para C₂₃H₂₀N₂O₈ · H₂O:

C, 58, 09; H, 4, 76; N, 5, 96.

Encontrado: C, 57, 71; H, 4, 42; N, 5, 70.

1- (3, 5-di-O-benzoil-β-L-arabinofuranosil) uracilo (12)

Se añadieron a una solución de 1- (3, 5-di-O-benzoil-β-L-xilofuranosil) uracilo 11 (8 g, 17, 7 mL) en una mezcla de benceno anhidro-DMSO (265 mL, 6:4, v/v) piridina anhidra (1, 4 mL) , dicitohexilcarbodiimida (10, 9 g, 53 mmoles) y ácido dicloroacético (0, 75 mL) . Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 horas, después se diluyó con acetato de etilo (400 mL) y se añadió una solución de ácido oxálico (4, 8 g, 53 mmoles) en metanol (14 mL) . Después de agitar durante 1 hora, se filtró la solución. Se lavó el filtrado con una solución de NaCl saturada (2 x 500 mL) , solución de NaHCO₃ al 3% (2 x 500 mL) y agua (2 x 500 mL) . Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, a continuación se evaporó a presión reducida. A continuación se solubilizó el residuo resultante en una mezcla de EtOH absoluto-benceno (140 mL, 2:1, v/v) . Se añadió a esta solución a 0°C NaBH₄ (0, 96 g, 26, 5 mmoles) . Después de agitar durante 1 hora, se diluyó la solución con acetato de etilo (400 mL) , a continuación se filtró. Se lavó el filtrado con solución de NaCl saturada (400 mL) y agua (400 mL) . Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, después se evaporó a presión reducida. Se purificó el material bruto resultante por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de metanol en etapas (0-3%) en diclorometano para dar 12 (5, 3 g, 66%) que fue cristalizado en acetonitrilo: pf. = 182-183°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 11, 35 (ancho s, 1H, NH) , 8, 0-7, 5 (m, 11H, 2 C₆H₅CO, H-6) ; 6, 23 (ancho s, 1H, OH-2') , 6, 15 (d, 1H, H-1', J_{1', 2'} = 4Hz) , 5, 54 (d, 1H, H-5, J₅₋₆ = 8, 1 Hz) , 5, 37 (t, 1H, H-3', J_{3', 4'} = J_{3', 2'} = 2, 6 Hz) , 4, 7 -4, 6 (m, 2H, H-5' y H-5'') , 4, 5 (m, 1H, H-4') , 4, 4 (m, 1H, H-2') ; EM: BAR > 0 (matriz GT) m/z 453 (M+H)⁺ , 341 (S)⁺ , 113 (BH₂)⁺ , 105 (C₆H₅CO)⁺ ; BAR < 0 (matriz GT) m/z 451 (M-H)⁻ , 121 (C₆H₅CO₂)⁻ , 111 (B)⁻ ;

Análisis calculado para C₂₃H₂₀N₂O₈:

C, 61, 06; H, 4, 46; N, 6, 19.

Encontrado: C, 60, 83; H, 4, 34; N, 6, 25.

30 1- (3, 5-di-O-benzoil-2-desoxi-β-L-eritro-pentofuranosil) uracilo (13)

Se añadió a una solución de 1- (3, 5-di-O-benzoil-β-L-arabinofuranosil) uracilo 12 (56, 2 g, 11, 4 mmoles) en 1, 2-dicloroetano anhidro (120 mL) cloruro de fenoxitiocarbonilo (4, 7 mL, 34, 3 mL) y 4- (dimetilamino) piridina (DMAP, 12, 5 g, 102, 6 mmoles) . Se agitó la solución resultante a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante 1 hora y después se evaporó a presión reducida. Se disolvió el residuo en diclorometano (300 mL) y se lavó sucesivamente la solución orgánica con una solución de ácido clorhídrico 0, 2 N enfriada con hielo (3 x 200 mL) y agua (2 x 200 mL) , se secó sobre Na₂SO₄, después se evaporó a presión reducida. Se co-evaporó el material en bruto varias veces con dioxano anhidro y se disolvió en este disolvente (110 mL) . Se añadieron a la solución resultante bajo argón hidruro de tris- (trimetilsilil) silano (4, 2 mL, 13, 7 mmoles) y α, α'-azoisobutironitrilo (AIBN, 0, 6 g, 3, 76 mmoles) . Se calentó la mezcla de reacción y se agitó a 100°C durante 1 hora bajo argón, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de metanol en etapas (0-5%)] para dar 13 (2, 78 g, 56%) que fue cristalizado en EtOH: p.f.= 223-225°C; H-RMN (DMSO-d₆) : δ 11, 4 (ancho s, 1H, NH) , 8, 0 -7, 5 (m, 11H, 2, C₆H₅CO, H-6) , 6, 28 (t, 1H, H-1', J = 7 Hz) , 5, 5 (m, 2H, H-1' y H-5) , 4, 6-4, 4 (m, 3H, H-4', H-5' y H-5'') , 2, 6 (m, 2H, H-2' y H-2'') ; EM: BAR > 0 (matriz GT) m/z 437 (M+H)⁺ , 3325 (S)⁺ ; BAR < 0 (matriz GT) m/z 435 (M-H)⁻ , 111 (B)⁻ ;

Análisis calculado para C₂₃H₂₀N₂O₇: C, 63, 30; H, 4, 62; N, 6, 42.

Encontrado: C, 62, 98; H, 4, 79; N, 6, 40.

45 2'-desoxi-β-L-citidina (β-L-dC)

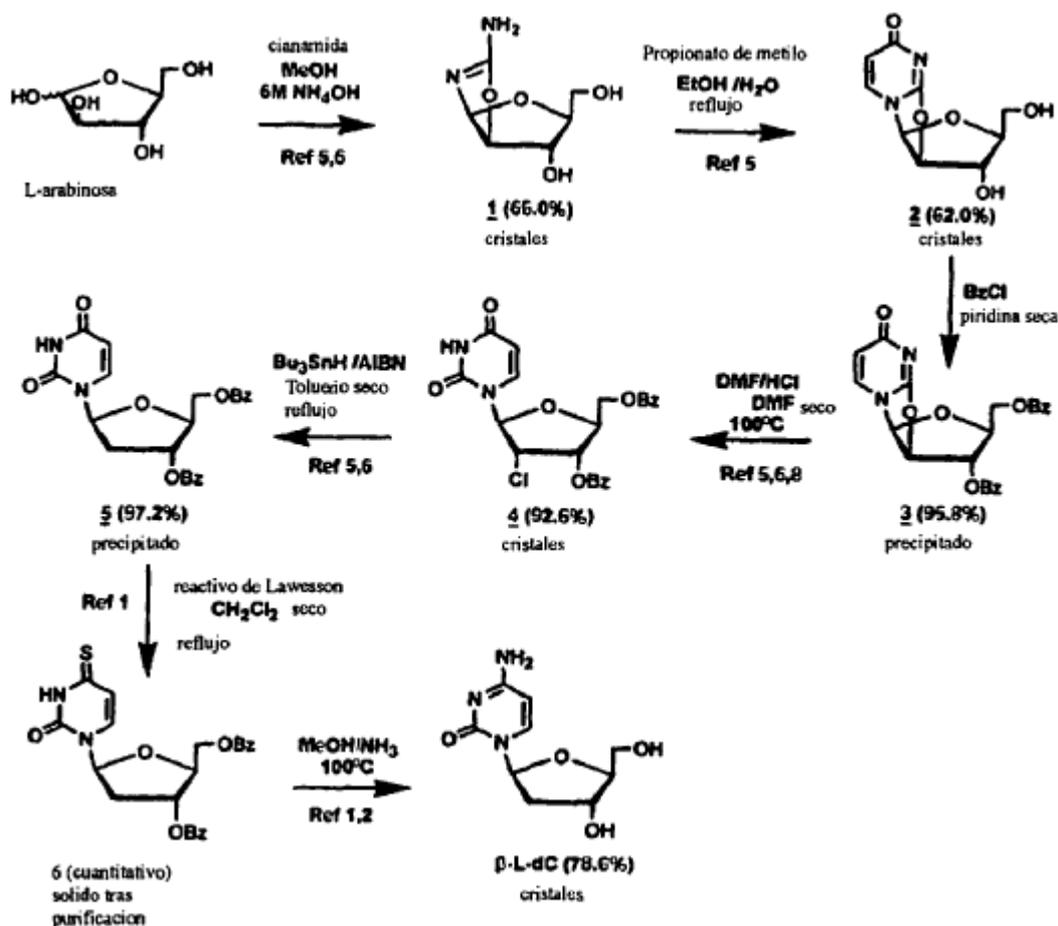
Se añadió reactivo de Lawesson (1, 72 g, 4, 26 mmoles) bajo argón a una solución de 1- (3, 5-di-O-benzoil-2-desoxi-β-L-*eritro*- pentofuranosil) uracil 13 (2, 66 g, 6, 1 mmoles) en 1, 2-dicloroetano anhidro (120 mL) y se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 2 horas. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de acetato de etilo por etapas (0-8%) en diclorometano] para dar el producto intermedio 4-tio como una espuma amarilla. Se calentó una solución de este producto intermedio tio (1, 5 g, 3, 31 mmoles) en amoníaco metanólico (saturado previamente a -10°C y tapado herméticamente) (50 mL) a 100°C en una bomba de acero inoxidable durante 3 horas y después se enfrió a 0°C. Se evaporó la solución a presión reducida. Se purificó el material bruto resultante por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de metanol por etapas (0-20%) en diclorometano]. Finalmente, se distribuyeron las fracciones apropiadas, se filtraron a través de una unidad Millex HV-4 (0, 45 μm, Milliporo) y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el 2'-desoxi-β-L-citidina deseado (β-L-dC) como una espuma (0, 6 g, 80%) que fue cristalizado en EtOH absoluto: p.f. = 198-199°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) ; δ 7, 77 (d, 1H, H-6, J₆₋₅ = 7, 4 Hz) , 7, 10 (ancho d, 2H, NH-2) , 6, 13 (t, 1H, H-1', J = 6, 7 Hz) , 5, 67 (d, 1H, H-5, J₅₋₆ = 7, 4 Hz) , 5, 19 (d, 1H, OH-3', J_{OH-3'} = 4, 1 Hz) , 4, 96 (t, 1H, OH-5', J_{OH-5'} = J_{OH-5''} = 5, 2 Hz) , 4, 1 (m, 1H, H-3') , 3, 75 (m, 1H, H-4') , 3, 5 (m, 2H, H-5' y H-5'') , 2, 0 (m, 1H, H-2') , 1, 9 (m, 1H, H-2'') ; EM: BAR>0 (matriz GT) m/z 228 (M+H)⁺, 112 (BH₂)⁺; BAR<0 (matriz GT) m/z 226 (M-H)⁻; [α]²⁰_D = -69 (c 0, 52, DMSO) [[α]²⁰_D = +76 (c 0, 55, DMSO) para una sal de hidrocloreto comercial del enantiómero D].

Análisis calculado para C₉H₁₃N₃O₄;

C, 47, 57; H, 5, 77; N, 18, 49.

Encontrado: C, 47, 35; H, 5, 68; N, 18, 29.

Ejemplo 4 Síntesis estereoselectiva de 2'-desoxi-β-L-citidina (β-L-dC)



20

2-amino-β-L-arabinofurano[1', 2':4, 5]oxazolina (1)

Se agitó una mezcla de L-arabinosa (170 g, 1, 13 moles) , cianamida (100 g, 2, 38 moles) , metanol (300 ml) y 6M-NH₄OH (50 ml) a temperatura ambiente durante 3 días y se mantuvo a -10°C durante toda la noche. Se recogió el

producto con succión, se lavó sucesivamente con metanol y éter y se secó al vacío. Rendimiento, 130 g (66, 0%) del compuesto 1 analíticamente puro. p.f. 170-172°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 6, 35 (ancho s, 2H, NH₂) , 5, 15 (d, 1H, H-1, J = 5, 6 Hz) , 5, 45 (ancho s, 1H, OH-3) , 4, 70 (ancho s 1H, OH-5) , 4, 55 (d, 1H, H-2, J = 5, 6 Hz) , 4, 00 (ancho s, 1H, H-3) , 3, 65 (m, 1H, H-4) , 3, 25 (m, 2H, H-5, H-5') .

Reactivos: L-arabinosa: Fluka, >99, 5%, ref. 10839

cianamida: Fluka, >98%, ref. 28330

5 O^{2,2}- anhidro-β-L-uridina (2)

Se sometió a reflujo una solución del compuesto 1 (98, 8 g, 0, 57 moles) y propilato de metilo (98 ml) en etanol acuoso al 50% (740 ml) durante 5 horas, a continuación, se enfrió y se concentró a presión disminuida hasta la mitad del volumen original. Tras la precipitación con acetona (600 ml) , se recogió el producto con succión, se lavó con etanol y éter y se secó. Se concentró parcialmente el licor madre, se hizo precipitar el concentrado con acetona (1000 ml) , se recogió el sólido con succión y se lavó con acetona y éter para dar otro cultivo del producto. Rendimiento global, 80 g (62%) del compuesto 2 p.f. 236-240°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 7, 87 (d, 1H, H-6, J = 7, 4 Hz) , 6, 35 (d, 1H, H-1', J = 5, 7 Hz) , 5, 95 (d, 1H, H-5, J = 7, 4 Hz) , 5, 90 (d, 1H, OH-3') , 5, 20 (d, 1H, H-2', J = 5, 7 Hz) , 5, 00 (m, 1H, OH-3') , 4, 44 (ancho s, 1H, H-3') , 4, 05 (m, 1H, H-4') , 3, 25 (m, 2H, H-5, H-5') .

Reactivo: Propilato de metilo; Fluka, >97%, ref. 81863.

15 3, 5-di-O-benzoil-O^{2,2}+ anhidro-β-L-uridina (3)

Se añadió a una solución del compuesto 2 (71, 1 g, 0, 31 moles) de piridina anhidra (1200 ml) cloruro de benzoilo (80, 4 ml) a 0°C y bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 horas bajo exclusión de humedad atmosférica y se detuvo por adición de etanol. Se evaporaron los disolventes a presión reducida y se co-evaporó el residuo resultante con tolueno y etanol absoluto. A continuación, se diluyó la mezcla en bruto con etanol y se recogió el precipitado con succión, se lavó sucesivamente con etanol y éter y se secó. Rendimiento, 129 g (95, 8%) del compuesto 3, p.f. 254°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 8, 1 -7, 4 (m, 11H, C₆H₅CO, H-6) , 6, 50 (d, 1H, H-1', J = 5, 7 Hz) , 5, 90 (d, 1H, H-5, J = 7, 5 Hz) , 5, 80 (d, 1H, H-2', J = 5, 8 Hz) , 5, 70 (d, 1H, H-3') , 4, 90 (m, 1H, H-4') , 4, 35 (m, 2H, H-5, H-5') .

Reactivo: Cloruro de benzoilo; Fluka, p.a, ref. 12930.

25 3, 5'-di-O-benzoil-2'-cloro-2'-desoxi-β, L-uridina (4)

Se añadió a una solución del compuesto 3 (60, 3 g, 0, 139 moles) en dimetilformamida (460 ml) a 0°C, una solución de HCl/DMF 3, 2N, (208 ml, preparada *in situ* por adición de 47, 2 ml de cloruro de acetilo a una solución de 27, 3 ml de metanol y 133, 5 ml de dimetilformamida) . Se agitó la mezcla de reacción a 100°C durante 1 hora bajo exclusión de humedad atmosférica, se enfrió y se vertió en agua (4000 ml) . Se recogió el precipitado del compuesto 4 con succión, se lavó con agua y se recristalizó en etanol. Se recogieron los cristales, se lavaron con etanol frío y éter y se secaron a presión disminuida. Rendimiento, 60, 6 g (92, 6%) del compuesto 4, p.f. 164-165°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 8, 7 (ancho s, 1H, NH) , 8, 1-7, 3 (m, 11H, C₆H₅CO, H-6) , 6, 15 (d, 1H, H-1', J = 4, 8 Hz) , 5, 5 (m, 2H, H-5, H-2') , 4, 65 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-5'') .

Reactivo: Cloruro de acetilo; Fluka, p.a. Ref. 00990.

35 3', 5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-β-L-uridina (5)

Se sometió a reflujo una mezcla del compuesto 4 (60, 28 g, 0, 128 moles) , hidruro de tri-n-butilestaño (95 ml) y azabisobutironitrilo (0, 568 g) en tolueno seco (720 ml) con agitación durante 5 horas y después se enfrió. Se recogió el sólido con succión y se lavó con tolueno frío y éter de petróleo. Se concentró el filtrado a presión reducida y se diluyó con éter de petróleo para depositar un cultivo adicional del compuesto 5. Rendimiento, 54, 28 g (97, 2%) del compuesto 5: p.f. 220-221°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm 8, 91 (ancho s, 1H, NH) , 8, 1-7, 5 (m, 11H, C₆H₅CO y H-6) , 6, 43 (q, 1H, H-1', J_{1',2'} = 5, 7 Hz, y J 1', 2'' = 8, 3 Hz) , 5, 7-5, 6 (m, 2H, H-3' y H-5) , 4, 8-4, 6 (m, 3H, H-5', H-5'' y H-4') , 2, 8 -2, 7 (m, 1H, H-2') , 2, 4-2, 3, (m, 1H, H-2'') .

Reactivos

Hidruro de Tri-n-butilestaño, Fluka, >98%, ref. 90915.

45 Azabisobutironitrilo; Fluka, >98%, ref. 11630.

3', 5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-β-L-4-tio-uridina (6)

Se sometió a reflujo una solución del compuesto 5 (69g, 0, 158 moles) y reactivo de Lawesson (74 g) en cloruro de metileno anhidro (3900 ml) bajo argón durante toda la noche. Tras la evaporación del disolvente, se purificó el

residuo bruto por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de metanol (0-2%) en cloruro de metileno] para dar el compuesto 6 puro (73 g) en un rendimiento cuantitativo; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ ppm 9, 5 (ancho s, 1H, NH), 8, 1-7, 4 (m, 10H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$), 7, 32 (d, 1H, H-6, $J = 7, 7$ Hz), 6, 30 (dd, 1H, H-1', $J = 5, 6$ Hz y $J = 8, 2$ Hz), 6, 22 (d, 1H, H-5, $J = 7, 7$ Hz), 5, 6 (m, 1H, H-3'), 4, 7 (m, 2H, H-5', H-5''), 4, 5 (m, 1H, H-4'), 2, 8 (m, 1H, H-2'), 2, 3 (m, 1H, H-2'').

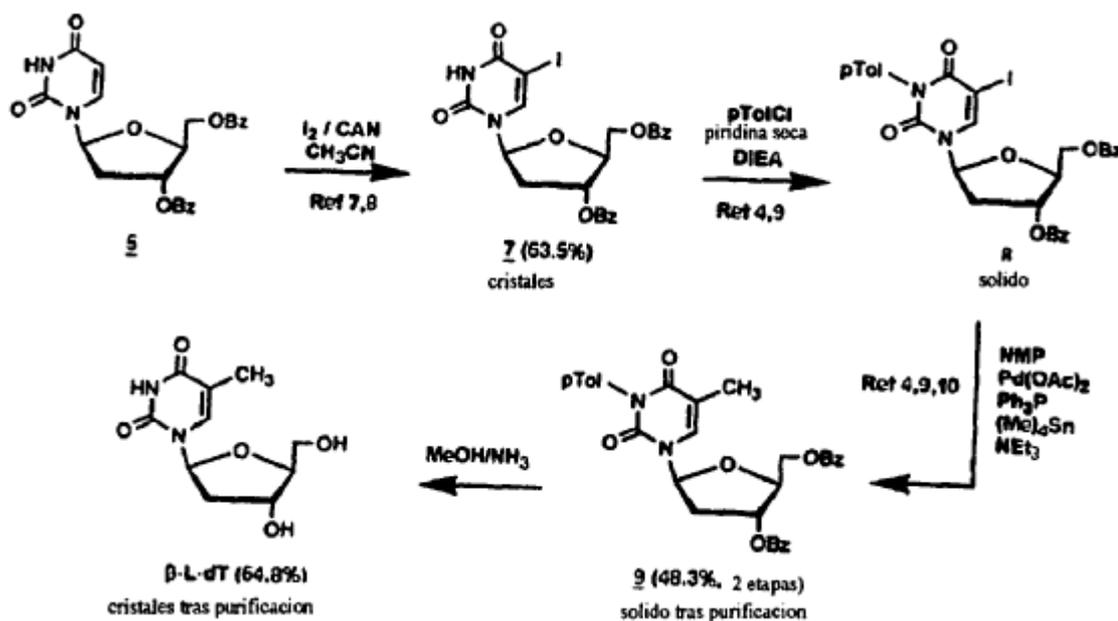
Reactivo: reactivo de Lawesson, Fluka, >98%, ref. 61750.

2'-desoxi- β -L-citosina

Se calentó una solución del compuesto 6 (7, 3 g, 0, 016 moles) en metanol saturado con amoníaco (73 ml) a 100°C en un cilindro de acero inoxidable durante 3 horas. Tras el enfriado cuidadoso, se evaporó el disolvente a presión reducida. Se lavó una solución acuosa del residuo con acetato de etilo y se evaporó a sequedad. Se llevó a cabo dicho procedimiento en otras 9 muestras (cada una 7, 3 g) del compuesto 6 (cantidad total de 6 = 73 g). Se combinaron los 10 residuos, se diluyeron con etanol absoluto y se enfriaron para dar 7 como cristales. Se eliminó la traza de benzamida de los cristales de 6 a través de un procedimiento de extracción sólido-líquido (a reflujo en acetato de etilo durante 1 hora). Rendimiento 28, 75 g (78, 6%) del compuesto 6; p.f. 141-145°C; $^1\text{H RMN}$ (DMSO) δ ppm. 8, 22 y 8, 00 (2 ancho s, 2H, NH_2), 7, 98 (d, 1H, H-6, $J = 7, 59$ Hz), 6, 12 (t, 1H, H-1', $J = 6, 5$ Hz y $J = 7, 6$ Hz), 5, 89 (d, 1H, H-5, $J = 7, 59$ Hz), 5, 3 (ancho s, 1H, OH-3'), 5, 1 (ancho s, 1H, OH-5'), 4, 2 (m, 1H, H-3'), 3, 80 (q, 1H, H-4', $J = 3, 6$ Hz, y $J = 6, 9$ Hz), 3, 6-3, 5 (m, 2H, H-5', H-5''), 2, 2-2, 0 (m, 2H, H-2', H-2''), BAR<0, (GT) m/e 226 (M-H)⁻, 110 (B)⁻; BAR>0 (GT) 228 (M+H)⁺, 112 (B+2H)⁺; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 56, 48$ (c = 1, 08 en DMSO); UV (pH 7) $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm ($\text{varepsilon} = 10000$).

Reactivo: amoníaco metanólico: saturado previamente a -5°C, tapado herméticamente, y mantenido en un congelador.

Ejemplo 5 Síntesis estereoselectiva de 2'-desoxi- β -L-timidina (β -L-dT)



3', 5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-5-yodo- β -L-uridina (7)

Se agitó una mezcla del compuesto 5 (105, 8 g, 0, 242 moles), yodo 76, 8 g), CAN (66, 4 g) y acetonitrilo (2550 ml) a 80°C durante 3 horas y se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente lo que llevó a la cristalización del compuesto 7 (86, 6 g, 63, 5%); p.f. 192-194; $^1\text{H RMN}$ (DMSO) δ ppm 8, 34 (s, 1H, NH), 8, 2-7, 2 (m, 11H, 2 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$, H-6), 6, 31 (q, 1H, H-1', $J = 5, 5$ Hz, y $J = 8, 7$ Hz), 5, 5 (m, 1H, H-3'), 4, 7 (m, 2H, H-5', H-5''), 4, 5 (m, 1H, H-4'), 2, 7 (m, 1H, H-2'), 2, 3 (m, 1H, H-2''); BAR>0 (GT) m/e 561 (M-H)⁻, 237 (B)⁻; BAR>0 (GT) 563 (M+H)⁺; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 39, 05$ (c = 1, 05 en DMSO); UV (EtOH 95) $\nu_{\text{max}} = 281$ nm ($\text{varepsilon} = 9000$), $\nu_{\text{min}} = 254$ nm ($\text{varepsilon} = 4000$), $\nu_{\text{max}} = 229$ nm ($\text{varepsilon} = 31000$);

Análisis calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_7$:

C, 49, 13 H, 3, 41 N, 4, 98 I, 22, 57.

Encontrado: C, 49, 31 H, 3, 53 N, 5, 05 I, 22, 36.

Reactivos

Yodo: Fluja, 99, 8%, ref, 57650.

Nitrato amónico de cerio (CAN) : Aldrich, >98, 5%, ref. 21, 547-3.

3', 5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-3-N-toluoil-β-L-timidina (9)

- 5 Se añadió a una solución del compuesto 7 (86, 6 g, 0, 154 moles) en piridina anhidra (1530 ml) que contenía N-etildisopropilamina (53, 6 ml) , en porciones a 0°C, cloruro de p-toluoilo (40, 6 ml) . Se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente, a continuación, se añadió agua para detener la reacción y se extrajo la mezcla de reacción con cloruro de metileno. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre sulfato sódico y se evaporó a sequedad para dar 3', 5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-3-N-toluoil-5-yodo-β-L-uridina en bruto (8) que fue utilizado en la siguiente etapa sin posterior purificación.

- 10 Se agitó una solución de la mezcla en bruto 8, acetato de paladio (3, 44 g) , trifenilfosfina (8, 0 g) en N-metilpirrolidinona (1375 ml) con trietilamina (4, 3 ml) a temperatura ambiente durante 45 minutos. A continuación, se añadió tetrametilestaño (42, 4 ml) gota a gota, a 0°C bajo argon. Después de agitar a 100-110°C durante toda la noche, se vertió la mezcla de reacción en agua y se extrajo con éter dietílico. Se secó la solución orgánica sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de acetato de etilo en etapas (0-10%) en tolueno] para dar el compuesto 9 como una espuma (42, 3 g, 48, 3%, para las 2 etapas) . ¹H RMN (DMSO) δ ppm, 8, 3-7, 2 (m, 15H, 2 C₆H₅CO, 1 CH₃C₆H₄CO, H-6) , 6, 29 (t, 1H, H-1', J = 7, 0 Hz) , 5, 7 (m, 1H, H-3') , 4, 7 - 4, 5 (m, 3H, H-5', H-5'', H-4') , 2, 7-2, 6 (m, 2H, H-2', H-2'') ; BAR <0, (GT) m/e 567 (M-H)⁻ , 449 (M-CH₃C₆H₄CO)⁻ , 243 (B)⁻ ; 121 (C₆H₅COO)⁻ ; BAR>0 (GT) 1137 (2M+H)⁺ , 569 (M+H)⁺ , 325 (M-B)⁻ , 245 (B+2H)⁺ , 119 (CH₃C₆H₅CO)⁺ .

20 Reactivos

Cloruro de t-toluoilo, Aldrich, 98%, ref. 10.663-1.

Diisopropiletilamina, Aldrich, >99, 5%, ref. 38.764-9.

N-metilpirrolidinona, Aldrich, >99%, ref. 44.377-8.

- 25 Acetato de paladio, Aldrich, >99, 98%, ref. 37.987-5.

Trifenilfosfina, Fluka, >97%, ref. 93092.

Tetrametilestaño, Aldrich, >99%, ref. 14.647-1.

2'-desoxi-β-L-timidina

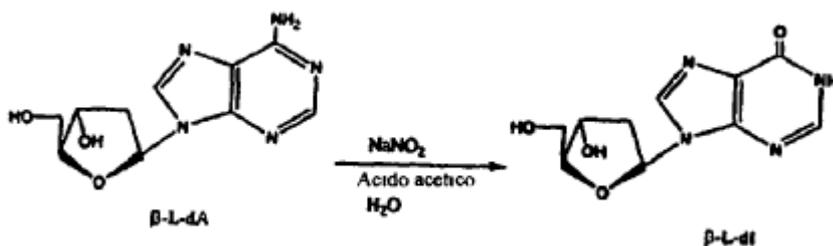
- 30 Se agitó una solución del compuesto 9 (42, 3 g, 0, 074 moles) en metanol saturado con amoníaco (1850 ml) a temperatura ambiente durante dos días. Tras la evaporación del disolvente, se diluyó el residuo con agua y se lavó varias veces con acetato de etilo. Se separó la capa acuosa, se evaporó al presión reducida y se purificó el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice [eluyente: gradiente de metanol en etapas (0, 10%) en cloruro de metileno] para dar 2'-desoxi-β-L-timidina puro (11, 62 g, 64, 8%) que fue cristalizado en etanol; p.f. 185-188°C; ¹H RMN (DMSO) δ ppm 11, 3 (s, 1H, NH) , 7, 70 (s, 1H, H-6) , 6, 2 (pt, 1H, H-1') , 5, 24 (d, 1H, OH-3', J = 4, 2 Hz) , 5, 08 (t, 1H, OH-5', J = 5, 1 Hz) , 4, 2 (m, 1H, H-3') , 3, 7 (m, 1H, H-4') , 3, 5-3, 6 (m, 2H, H-5', H-5'') , 2, 1-2, 0 (m, 2H, H-2', H-2'') , BAR<0, (GT) m/e 438 (2M-H)⁻ , 349 (M+T-H)⁻ ; 241 (M-H)⁻ , 125 (B)⁻ ; BAR>0 (GT) 243 (M+H)⁺ , 127 (B+2H)⁺ ; [α]_D²⁰ - 13, 0 (c = 1, 0 en DMSO) ; UV (pH 1) v_{max} = 267 nm (varepsilon = 9700) , v_{min} = 234 nm (varepsilon = 2000) .

Reactivo

- 40 Amoníaco metanólico: previamente saturado a -5°C, tapado herméticamente y mantenido en el congelador.

Ejemplo 6 Síntesis estereoselectiva de 2'-desoxi-β-L-inosina (β-L-dl)

- 45 Se sintetizó β-L-dl por desaminación de 2'-desoxi-β-L-adenosina (β-L-dA) seguido del procedimiento descrito en la serie 9-D-glucopiranosilo descrita anteriormente (ref: I.Iwai. T., Nishimura and B. Shimizu, Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry , W.W. Aorbach and R.S. Tispon, eds, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, vol., pp. 135-138 (1968) .



De este modo, se calentó una solución de β -L-dA (200 mg) en una mezcla de ácido acético (0, 61 ml) y agua (19 ml) con nitrato sódico (495 mg) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se evaporó la mezcla a sequedad a presión disminuida. Se aplicó una solución acuosa del residuo a una columna de resina de intercambio iónico IR-120 (H^+) y se eluyó la columna con agua. Se recogieron las fracciones apropiadas y se evaporaron a sequedad para dar β -L-dI puro que fue cristalizado con metanol (106 mg, 53% rendimiento no optimizado); p.f. 209°-211°C; UV (H_2O), $\lambda_{max} = 247$ nm; 1H -RMN ($DMSO-d_6$) = 8, 32 y 8, 07 (2s, 1H cada, H-2 y H-8), 6, 32 (pt, 1H, H-1; 6, 7 Hz,), 4, 4 (m, 1H, H-3'), 3, 9 (m, 1H, H-4'), 3, 7-3, 4 (m, 2H, oscurecido parcialmente por HOD, H-5', 5''), 2, 6 y 2, 3 (2m, 1H cada, H-2', H-2''); espectro de masa (maduro, glicerol-tioglicerol, 1:1, v/v), $BAR > 0$: 253 (m+H)⁺, 137 (base + 2H)⁺; $BAR < 0$: 251 (m-H)⁻; 135 (base)⁻; $[\alpha]_D^{20} = +19, 3$ (-c 0, 88 H_2O).

Actividad anti-HBV de los compuestos activos

Se puede evaluar la capacidad de los compuestos activos para inhibir el crecimiento del virus en cultivos de células 2.2.15 (células HepG2 transformadas con virión de hepatitis) tal como se describe en detalle a continuación.

Se ha expuesto un resumen y una descripción del ensayo para determinar efectos antivirales en este sistema de cultivo y el análisis de ADN HBV (Korba and Milman, 1991, *Antiviral Res.*, 15:217). Se llevan a cabo las evaluaciones antivirales en dos pasos de células por separado. Se siembran todos los pocillos, en todas las placas, a la misma densidad y al mismo tiempo.

Debido a las variaciones inherentes de los niveles de ADN HBV tanto intracelular como extracelular, solamente se consideran depresiones superiores a 3, 5 veces (para virión ADN de HBV) o 3, 0 veces (para intermediarios de replicación de ADN HBV) a partir de los niveles medios para estas formas ADN HBV en células sin tratar como estadísticamente significativas ($P < 0, 05$). Se utilizan los niveles de ADN HBV integrados en cada preparación de ADN celular (que permanece constante a nivel celular en estos experimentos) para calcular los niveles de formas ADN HBV intracelulares, asegurando así que se comparan cantidades iguales de ADN celular entre muestras por separado.

Los valores típicos para ADN de virión HBV extracelular en células sin tratar oscilan entre 50 y 150 pg/ml de medio de cultivo (media de aproximadamente 76 pg/ml). Los intermediarios de replicación de ADN HBV intracelular en células sin tratar oscilan entre 50 y 100 $\mu g/\mu g$ de ADN celular (media aproximadamente 74 $\mu g/\mu g$ de ADN celular). En general, las depresiones en los niveles de ADN HBV intracelular debido al tratamiento con compuestos antivirales son menos pronunciadas, y se dan con menor lentitud que las depresiones en los niveles del ADN de virión de HBV (Korba and Milman, 1991), *Antiviral Res.*, 15:217).

La manera en la que se llevan a cabo los análisis de hibridación para estos experimentos tiene como resultado una equivalencia de aproximadamente 1, 0 pg de ADN HBV intracelular para 2-3 copias genómicas por células y 1, 0 pg/ml de ADN HBV extracelular para 3×10^5 partículas virales/ml.

Ejemplo 7

Se sometió a ensayo la capacidad de los derivados de trifosfato de β -L-dA, β -L-dC, β -L-dU, β -L-2'-dG, β -L-dI y β -L-dT para inhibir la hepatitis B. En la tabla 1 se describen las actividades de inhibición comparativas de trifosfatos de β -L-dT (β -L-dT-TP), β -L-dC (β -L-dC-TP), β -L-dU (β -L-dU-TP) y β -L-dA (β -L-dA-TP) en ADN polimerasa de virus de hepatitis de marmota (WHV), ADN polimerasas humanas, α , β , γ .

TABLA 1

Inhibidor	ADN pol WHV	ADN pol α	ADN pol β	ADN pol γ
	IC ₅₀	K _i ^B (μ M)	K _i ^B (μ M)	K _i ^B (μ M)
β -L-dT-TP	0, 34	>100	>100	>100
β -L-dA-TP	2, 3	>100	>100	>100

β -L-dC-TP	2, 0	>100	>100	>100
β -L-dU-TP	8	>100	>100	>100

^aIC₅₀ : 50% concentración inhibidora

K_i^b se determinó este valor utilizando ADN activado de timo de becerro como plantilla-cebador y dATP como sustrato. Se analizaron los sustratos por análisis de gráfico de Dixon. En estas condiciones, la K_m media calculada de ADN polimerasa α humana para dATP fue aproximadamente 2, 6 μ M. ADN polimerasa β humana presentó un estado K_m constante de 3, 33 μ m para dATP. ADN polimerasa γ humana presentó una K_m constante de 5, 2 μ M.

5

Ejemplo 8

Se sometió a ensayo la actividad anti virus hepatitis B de β -L-dA, β -L-dC, β -L-dU, β -L-2'-dG y β -L-dT en células Hep G-2 transfectadas (2.2.15) En la tabla 2 se ilustra el efecto de β -L-dA, β -L-dC, β -L-dU, y β -L-dT contra la replicación del virus de la hepatitis B en células Hep G-2 transfectadas (2.2.15) .

10 TABLA 2

Compuesto	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	Citotoxicidad	Índice selectividad
	viriones HBV ^a	Ri HVB ^b	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ /EC ₅₀
β -L-dT	0, 05	0, 05	>200	>4000
β -L-dC	0, 05	0, 05	>200	>4000
β -L-dA	0, 10	0, 10	>200	>2000
β -L-dI	1, 0	1, 0	>200	>200
β -L-dU	5, 0	5, 0	>200	>40

^aADN extracelular

^b Intermediarios replicativos (ADN intracelular)

Ejemplo 9

Se midió el efecto de β -L-dA, β -L-dC y β -L-dT en combinación con el crecimiento de hepatitis B en células 2.2.15. En la tabla 3 se exponen los resultados.

15

TABLA 3

Combinación	Relación	EC ₅₀
L-dC+L-dT	1:3	0, 023
L-dC+L-dT	1:1	0, 053
L-dC+L-dT	3:1	0, 039
L-dC+L-dA	1:30	0, 022
L-dC+L-dA	1:10	0, 041
L-dC+L-dA	1:3	0, 075
L-dT+L-dA	1:30	0, 054
L-dT+L-dA	1:10	0, 077
L-dT+L-dA	1:3	0, 035

Cada una de las combinaciones produjo actividad anti-HBV que fue sinérgica. Por otra parte, también fue sinérgica en este modelo la combinación de L-dA+L-dC+L-dT.

20 **Ejemplo 10**

Se midió la inhibición de replicación de hepatitis B en células 2.2.15 por β -L-dA y β -L-dC, en solitario y en combinación. En la tabla 4 se muestran los resultados.

TABLA 4

^a β -L-2'desoxi-adenosina (μ M)	^b β -L-2'-desoxi-citidina (μ M)	% inhibición	^c C.I.
0, 5		90	
0, 05		24	
0, 005		1	
	0, 5	95	
	0, 05	40	
	0, 005	10	
0, 05	0, 05	80	0, 34
0, 05	0, 005	56	0, 20
0, 05	0, 0005	50	0, 56
0, 005	0, 05	72	0, 35
0, 005	0, 005	54	0, 35
0, 005	0, 0005	30	0, 16
0, 0005	0, 05	50	0, 83
0, 0005	0, 005	15	0, 28
0, 0005	0, 0005	0	N.A.

^a β -L-2'desoxi-adenosina: IC₅₀ = 0, 09 μ M

5 ^b β -L-2'-desoxi-citidina: IC₅₀ = 0, 06 μ M

^cValores de índices de combinación indican el efecto sinérgico (<1) , efecto aditivo (=1) y efecto de antagonismo (>1)

Ejemplo11

10 Se determinó la eficacia de L-dA, L-dT y L-dC contra la infección de hepadnavirus en marmotas (*Marmota monax*) infectadas crónicamente con virus de la hepatitis de marmota (WHV) . El modelo animal de infección HBV está ampliamente aceptado y se ha demostrado que es útil para la evaluación de agentes antivirales dirigidos contra HBV.

Protocolo

Grupos experimentales (n = 3 animales/grupo de fármaco, n = 4 animales/control)

- Grupo 1 control vehículo
- Grupo 2 lamivudina (3TC) (10 mg/kg/día)
- Grupos 3-6 L-dA (0, 01, 0, 1, 1, 0, 10 mg/kg/día)
- Grupos 7-10 L-dT (0, 01, 0, 1, 1, 0, 10 mg/kg/día)
- Grupos 11-14 L-dC (0, 01, 0, 1, 1, 0, 10 mg/kg/día)

Se administraron fármacos por vía oral, por alimentación forzada, una vez al día, se tomaron muestras los días 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 y después del tratamiento los días +1, +3, +7, +14, +28 y +56. La valoración de la actividad y la toxicidad se basó en la reducción de ADN de WHV en suero: punto-mancha, PCR cuantitativa.

En la figura 3 y en la tabla 5 se ilustran los resultados.

5 TABLA 5 Actividad antiviral de LdA, LdT, LdC en modelo de infección HBV crónica en marmotas

	Control	LdA	LdT	LdC
Día	ng WHV-ADN por ml suero ^{1,2}			
0	381	436	423	426
1	398	369	45	123
3	412	140	14	62
7	446	102	6	46
14	392	74	1	20

¹ LdA, LdT, LdC administrados por vía oral una vez al día a 10 mg/kg

² El límite de detección es 1 ng/ml WHV-ADN por ml de suero

10 Los datos demuestran que L-dA, LdT y LdC son muy activos en este modelo *in vivo*. En primer lugar, se reduce la carga viral a niveles no detectables (L-dT) o casi no detectables (L-dA, L-dC) . En segundo lugar, se demuestra que L-dA, LdT y LdC son más activos que 3TC (lamivudina) en este modelo. En tercer lugar, no se detecta que vuelva a brotar el virus durante al menos dos semanas después de retirar L-dT. En cuarto lugar, las curvas de respuesta a dosis sugieren que un aumento de los modos de dosis de LdA y LdC podrían presentar una actividad similar a L-dT. En quinto lugar, todos los animales a los que se les administró los fármacos ganaron peso y no se detectó toxicidad relacionada con el fármaco.

15 Toxicidad de los compuestos

Se llevaron a cabo análisis de toxicidad para valorar si los efectos antivirales fueron debidos a un efecto general en la viabilidad celular. El método utilizado es la medida del efecto de β -L-dA, β -L-dC y β -L-dT en el crecimiento celular en ensayos clorogénicos de la médula ósea humana, en comparación con Lamuvidina. En la tabla 6 se proporcionan los resultados.

20 TABLA 6

Compuestos	CFU-GM (μ M)	BFU-E (μ M)
β -L-dA	>10	>10
β -L-dC	>10	>10
β -L-dT	>10	>10
β -L-dU	>10	>10
Lamuvidina	>10	>10

Preparación de composiciones farmacéuticas

25 Los seres humanos que padecen cualquiera de los trastornos aquí descritos, incluyendo hepatitis B, pueden ser tratados por administración a dichos pacientes de una cantidad efectiva de β -2'-desoxi- β -L-eritropentofuranonucleósido, por ejemplo β -L-2'-desoxiadenosina, β -L-2'-desoxicitidina, β -L-2'-desoxiuridina, β -L-2'-desoxiguanosina o β -L-2'-desoxitimidina o un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en presencia de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar los materiales activos a través de cualquiera de las rutas apropiadas, como por ejemplo, oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica, en forma sólida o líquida.

30 Se incluye el compuesto activo en el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto para inhibir la replicación viral *in*

vivo, sin causar efectos tóxicos graves en el paciente tratado. Se entiende por “cantidad inhibidora” una cantidad de ingrediente activo suficiente para ejercer un efecto inhibitor según se mide por ejemplo a través de un ensayo como los aquí descritos.

5 Una dosis preferible del compuesto para todos los estados patológicos que se han mencionado será la comprendida entre aproximadamente 1 y 50 mg/kg, preferiblemente entre 1 y 20 mg/kg, de peso corporal al día, más generalmente entre 0, 1 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal del receptor al día. El intervalo de dosificación eficaz del profármaco farmacéuticamente aceptable se puede calcular basado en el peso del nucleósido padre que ha de ser liberado. Si el profármaco muestra actividad por sí mismo, la dosificación eficaz se puede estimar como anteriormente empleando el peso del profármaco o de otra forma conocida para los expertos en la técnica.

10 Se administra convenientemente el compuesto en formas de dosis unitarias adecuadas, incluyendo, pero sin limitarse sólo a ellas, una forma de dosis unitaria con un contenido de 7 a 3000 mg, preferiblemente de 70 a 1400 mg de ingrediente activo por forma de dosis unitaria. La dosis oral de 50 a 1000 mg es normalmente la conveniente.

15 Idealmente, se deberá administrar el ingrediente activo para conseguir concentraciones en plasma máximas del compuesto activo de aproximadamente 0, 2 a 70 μM , preferiblemente aproximadamente de 1, 0 a 10 μM . Esto se puede conseguir por ejemplo por inyección intravenosa de una solución al 0, 1 a 5% del ingrediente activo, opcionalmente en solución salina, o administrado como un bolo del ingrediente activo.

20 La concentración del compuesto activo en la composición de fármaco dependerá de los índices de absorción, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos entre las personas especializadas en este campo. Debe advertirse que los valores de dosis variarán también según la gravedad del estado patológico que se está aliviando. Debe entenderse que para cualquier sujeto en concreto, los regímenes de dosis específicos deberán ser ajustados en el tiempo con arreglo a las necesidades individuales y al criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos aquí son ilustrativos únicamente, no pretendiéndose limitar el marco o práctica de la composición que se reivindica.

25 El ingrediente activo se puede administrar de una vez, o se puede dividir en una serie de dosis más reducidas que se administrarán en varios intervalos de tiempo.

30 Un modo preferible de administración del compuesto activo es por vía oral. Las composiciones orales incluirán generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en comprimidos. Para fines de administración terapéutica oral, se pueden incorporar en el compuesto activo excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Se pueden incluir agentes de unión, y/o otros materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición.

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

40

Se puede administrar el compuesto como componente de un elixir, una suspensión, un jarabe, una oblea, un chicle o similar. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y determinados conservantes, tintes y colorantes y aromatizantes.

45 El compuesto o derivados o sales farmacéuticamente aceptables del mismo puede mezclarse también con otros materiales activos que no influyan negativamente en la acción deseada, o con materiales que suplementen la acción deseada, tales como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, inhibidores de proteasa, u otros agentes antivirales de nucleósido o no nucleósido. Las soluciones o suspensiones utilizadas para administración parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilén glicoles, glicerina, propilén glicol u otros disolventes sintéticos;

50 agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. El preparado parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

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

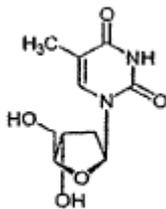
En un modo de realización preferible, se preparan los compuestos activos con vehículos que protegerán el compuesto contra la rápida eliminación del organismo, como por ejemplo una formulación de liberación controlada,

incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles, biodegradables, como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliacético. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para las personas especializadas en este campo. Los materiales se pueden obtener también en el comercio, distribuidos por Alza Corporation.

- 5 Las suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también son preferibles como vehículos farmacéuticamente aceptables. Se pueden preparar con arreglo a los métodos conocidos entre las personas especializadas en este campo, como por ejemplo, tal como se describe en la patente EE.UU. Nº 4.522.811. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones de liposoma disolviendo lípido (s) apropiado (s) (como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina y colesterol) en un disolvente inorgánico que se evapora después, dejando detrás una película fina de lípido deshidratado sobre la superficie del contenedor. A continuación, se introduce una solución acuosa del compuesto activo o sus derivados monofosfato, difosfato y/o trifosfato en el contenedor. A continuación, se agita el contenedor manualmente para liberar el material de lípido de las paredes del contenedor y dispersar los agregados de lípidos, formando así la suspensión liposómica.
- 10
- 15 Esta invención se ha descrito haciendo referencia a sus realizaciones preferidas. Las variaciones y modificaciones de la invención, serán obvias para los expertos en la técnica a partir de la anterior descripción detallada de la invención. Se pretende que todas estas variaciones y modificaciones estén incluidas en la medida en que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

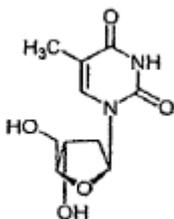
1. Un compuesto de β -L-timidina de la fórmula:



5

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de una infección de hepatitis B en un ser humano.

2. El compuesto o sal según la reivindicación 1, en donde el compuesto o sal es



3. El compuesto o sal según la reivindicación 1, en donde el compuesto o sal es una sal farmacéuticamente aceptable.

10

4. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto o sal se destina a ser administrado al ser humano oralmente.

5. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto o sal se destina a ser administrado en una forma de dosificación unitaria.

15

6. El compuesto o sal según la reivindicación 5, en donde la forma de dosificación unitaria es una dosis oral de 50-1000 mg.

7. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el compuesto o sal se destina a ser administrado como un comprimido oral.

20

8. El compuesto o sal según la reivindicación 7, en donde el comprimido comprende celulosa microcristalina, goma tragacanto, gelatina, almidón, lactosa, ácido algínico, Primogel, almidón de maíz, estearato de magnesio, Sterotes, dióxido de silicio coloidal, sacarosa, sacarina, menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

9. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto o sal se destina a ser administrado en una dosis de 1 a 20 mg/kg de peso corporal al día.

10. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto o sal se destina a ser administrado con un nivel de al menos el 95 % de la estereoconfiguración designada.

25

11. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ser humano tiene una infección del virus de la hepatitis B crónica persistente.

12. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el ser humano tiene una infección del virus de la hepatitis B crónica.

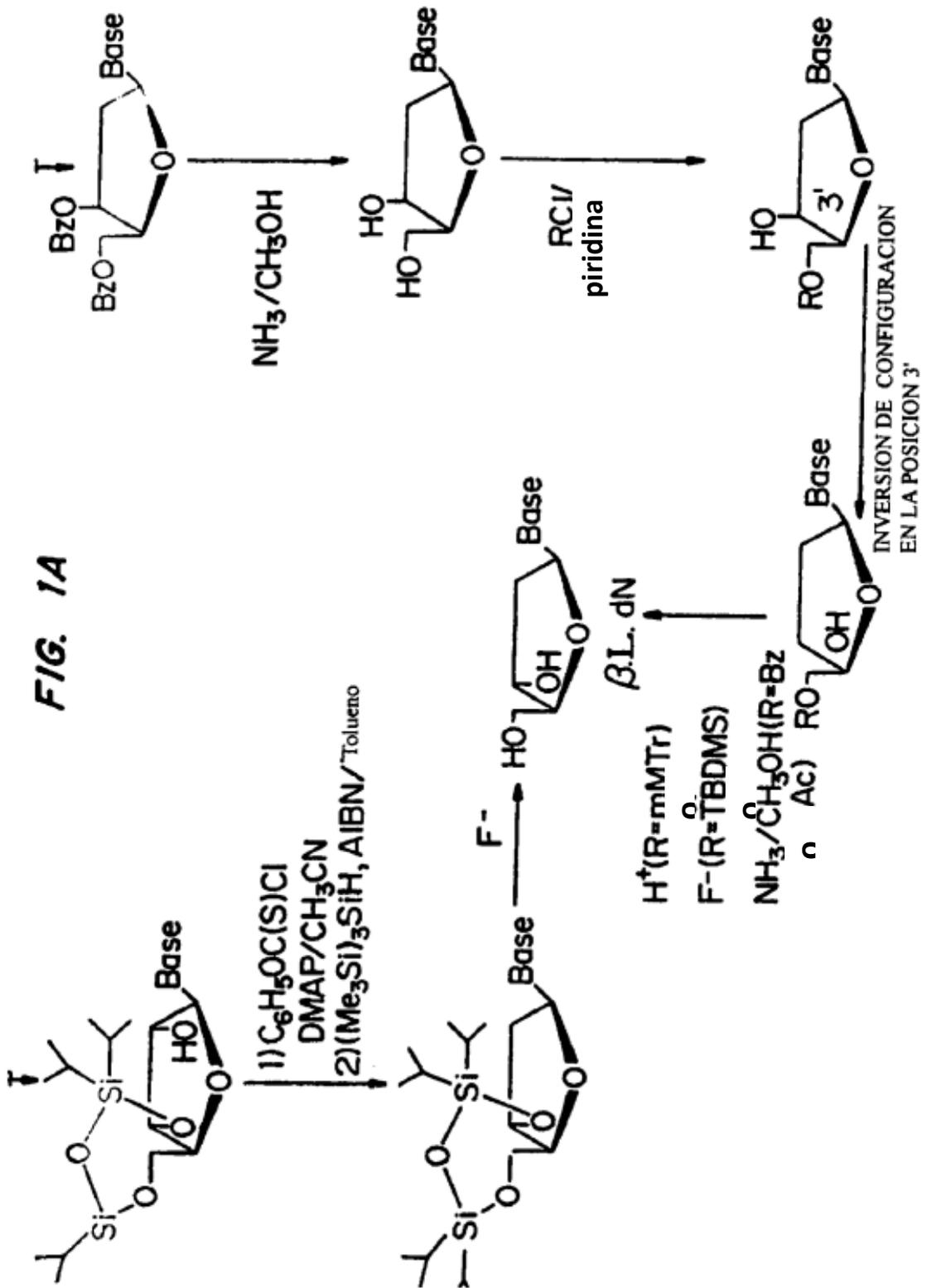
30

13. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el ser humano tiene una inflamación crónica del hígado causada por el virus de la hepatitis B.

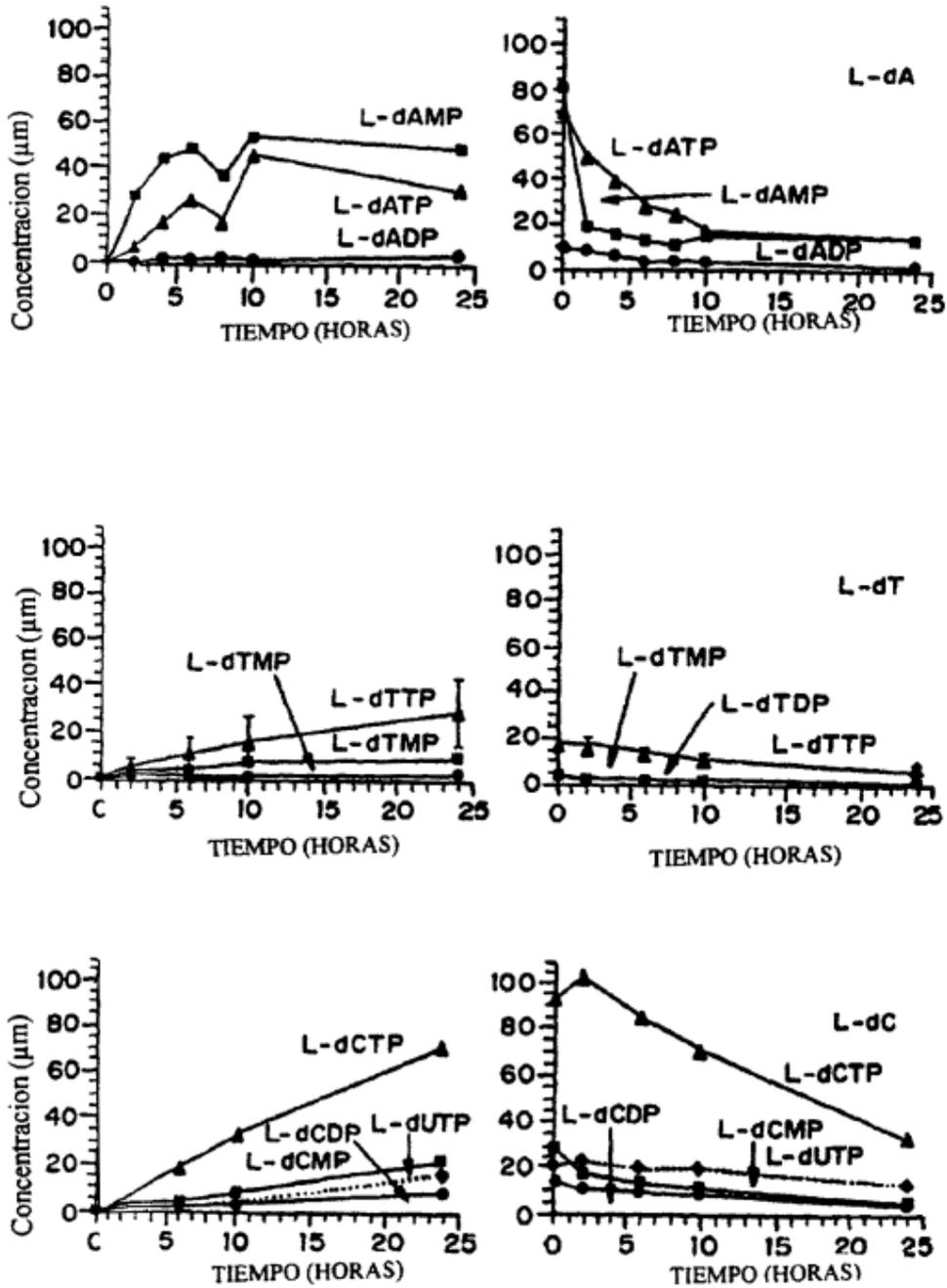
14. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el ser humano tiene cirrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis crónica persistente o fatiga.

15. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el ser humano es anticuerpo anti-HBV positivo o HBV positivo.

16. El compuesto o sal según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto o sal se destina a ser administrado al ser humano en una cantidad terapéuticamente eficaz para inhibir la replicación viral *in vivo*.
- 5 17. El uso de un compuesto o sal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección de hepatitis B en un ser humano, en donde el tratamiento opcionalmente tiene las características de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16.



ACUMULACION **FIG. 2** DEGRADACION



(n = 3 por grupo de tratamiento con farmaco,
n = 4 por grupo de tratamiento con placebo,
dosis 10 mg/kg via oral una vez al dia

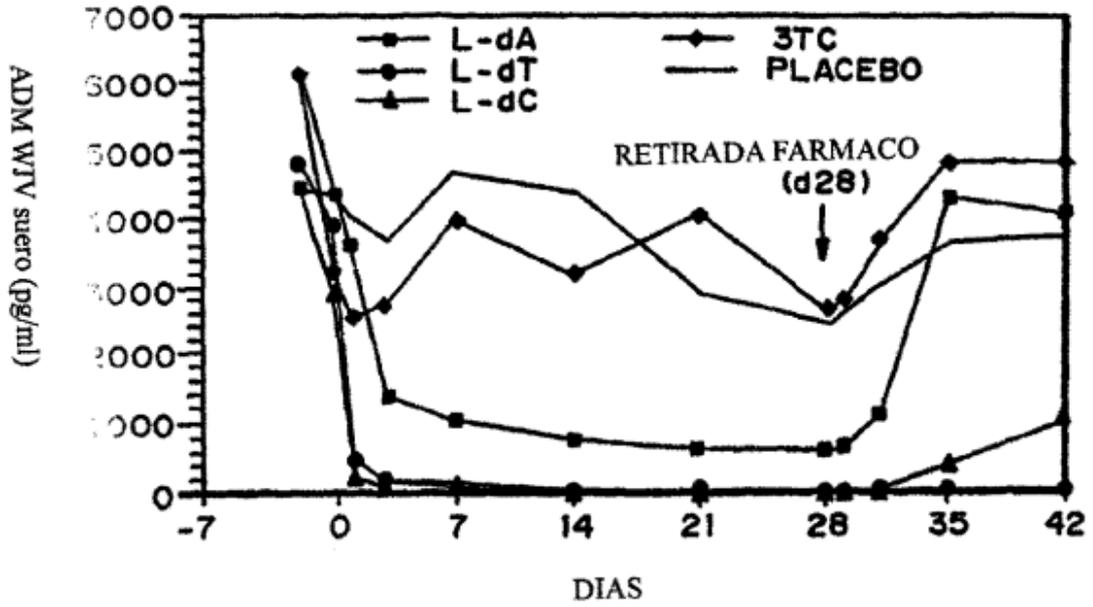


FIG. 3