

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 836**

51 Int. Cl.:

C07H 19/14 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2002 E 02709095 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1539188**

54 Título: **Derivados de nucleósidos como inhibidores de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN**

30 Prioridad:

22.01.2001 US 263313 P

06.04.2001 US 282069 P

19.06.2001 US 299320 P

25.10.2001 US 344528 P

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

01.04.2015

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (50.0%)

126 East Lincoln Avenue

Rahway, NJ 07065-0907, US y

ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

CARROLL, STEVEN S.;

LAFEMINA, ROBERT L.;

HALL, DAWN L.;

HIMMELBERGER, AMY L.;

KUO, LAWRENCE C.;

MACCOSS, MALCOLM;

OLSEN, DAVID B.;

RUTKOWSKI, CARRIE A.;

TOMASSINI, JOANNE E.;

AN, HAOYUN;

BHAT, BALKRISHEN;

BHAT, NEELIMA;

COOK, PHILLIP DAN;

ELDRUP, ANNE B.;

GUINOSSO, CHARLES J.;

PRHAVC, MARIJA y

PRAKASH, THAZHA P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 532 836 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

Derivados de nucleósidos como inhibidores de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona derivados de nucleósidos que son inhibidores de la polimerasa NS5B del virus de la hepatitis C (VHC) que son útiles como inhibidores de la replicación del VHC y para el tratamiento de la infección por hepatitis C.

10

Antecedentes de la invención

La infección por virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud importante que conduce a enfermedad hepática crónica, tal como cirrosis y carcinoma hepatocelular en un número importante de individuos infectados, que se estima que es un 2 - 15 % de la población mundial. De acuerdo con el Centro de EE.UU. para el control de enfermedades se ha estimado que hay 4,5 millones de personas infectadas solo en Estados Unidos. Conforme a la Organización Mundial de la Salud hay más de 200 millones de individuos infectados en todo el mundo y al menos 3 o 4 millones se infectan anualmente. Una vez infectados, aproximadamente el 20 % de las personas eliminan el virus, pero el resto alojan el VHC durante toda su vida. Del diez al veinte por ciento de los individuos infectados de forma crónica terminan desarrollando cirrosis con destrucción del hígado o cáncer. La enfermedad viral se transmite parenteralmente por sangre contaminada y productos derivados de la sangre, agujas contaminadas, o sexualmente y verticalmente de madres infectadas o madres portadoras a su descendencia. Los tratamientos actuales para la infección por VHC, restringidos a inmunoterapia con interferón- α recombinante en solitario o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina, tienen un beneficio clínico limitado. Además, no existe una vacuna establecida para el VHC. En consecuencia, existe una urgente necesidad de mejores agentes terapéuticos que combatan con eficacia la infección crónica por VHC. Los actuales tratamientos de la infección por VHC se han revisado y se mencionan las publicaciones siguientes: B. Dymock, et al., "Novel approaches to the treatment of hepatitis C virus infection," *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11: 79 - 96 (2000); H. Rosen, et al., "Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies," *Molecular Medicine Today*, 5: 393 - 399 (1999); D. Moradpour, et al., "Current and evolving therapies for hepatitis C," *European J. Gastroenterol. Hepatol.*, 11: 1189 - 1202 (1999); R. Bartenschlager, "Candidate Targets for Hepatitis C Virus-Specific Antiviral Therapy," *Intervirology*, 40: 378 - 393 (1997); G.M. Lauer y B.D. Walker, "Hepatitis C Virus Infection," *N. Engl. J. Med.*, 345: 41 - 52 (2001); B.W. Dymock, "Emerging therapies for hepatitis C virus infection," *Emerging Drugs*, 6: 13 - 42 (2001); y C. Crabb, "Hard-Won Advances Spark Excitement about Hepatitis C," *Science*: 506 - 5 07 (2001); los contenidos de todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

35

Se han adoptado diferentes abordajes a la terapia del VHC que incluyen la inhibición de la serín proteasa viral (proteasa NS3), helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5B) y el desarrollo de una vacuna.

40

El virión del VHC es un virus de ARN de hebra positiva con cubierta con una secuencia genómica de un solo oligorribonucleótido de aproximadamente 9.600 bases que codifica una poliproteína de aproximadamente 3.010 aminoácidos. Los productos proteicos del gen del VHC consisten en las proteínas estructurales C, E1 y E2, y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A y NS4B, y NS5A y NS5B. Se cree que las proteínas no estructurales (NS) proporcionan la maquinaria catalítica para la replicación viral. La proteasa NS3 libera NS5B, la ARN polimerasa dependiente de ARN de la cadena poliproteica. La polimerasa NS5B del VHC es necesaria para la síntesis de un ARN bicatenario a partir de un ARN viral monocatenario que sirve como molde en el ciclo de replicación del VHC. Por tanto, se considera que la polimerasa NS5B es un componente esencial en el complejo de replicación del VHC [véase K. Ishi, et al., "Expression of Hepatitis C Virus NS5B Protein: Characterization of Its RNA Polymerase Activity and RNA Binding," *Hepatology*, 29: 1227 - 1235 (1999) y V. Lohmann, et al., "Biochemical and Kinetic Analyses of NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase of the Hepatitis C Virus," *Virology*, 249: 108 - 118 (1998)]. La inhibición de la polimerasa NS5B del VHC evita la formación del ARN bicatenario del VHC y, por tanto, constituye un atractivo abordaje al desarrollo de terapias antivirales específicas del VHC.

50

El documento US-A-6063628 (University of Washington) divulga nucleótidos modificados, tales como 5-bromocitidina y 5-hidroxiuridina, para su uso en el tratamiento del VHC.

55

Ahora se ha descubierto que compuestos nucleosídicos de la presente invención y determinados derivados de los mismos son potentes inhibidores de la replicación del VHC. Los derivados de 5'-trifosfato de los compuestos nucleosídicos son inhibidores de la polimerasa NS5B del VHC. Los presentes compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos son útiles para tratar la infección por VHC.

60

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar compuestos nucleosídicos y determinados derivados de los mismos que son útiles como inhibidores de la polimerasa NS5B del VHC.

65

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar derivados nucleosídicos que son útiles como inhibidores de la replicación de un virus de la hepatitis C.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar compuestos nucleosídicos y determinados derivados de los mismos que son útiles en el tratamiento de la infección por VHC.

5 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden los nuevos compuestos de la presente invención en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos para su uso como inhibidores de la polimerasa NS5B del VHC.

10 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos para su uso como inhibidores de la replicación del VHC.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos para su uso en el tratamiento de la infección por el VHC.

15 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos en combinación con otros agentes activos contra el VHC.

También se describen métodos para la inhibición de la polimerasa NS5B del VHC.

20 También se describen métodos para la inhibición de la replicación del VHC.

También se describen métodos para el tratamiento de la infección por el VHC.

25 Por tanto, se describen métodos para el tratamiento de la infección por VHC en combinación con otros agentes activos contra el VHC.

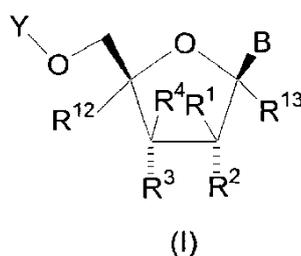
30 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar compuestos nucleosídicos y determinados derivados de los mismos y sus composiciones farmacéuticas para su uso como medicamento para la inhibición de la replicación y/o el tratamiento de la infección por VHC.

35 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar el uso de los compuestos nucleosídicos y determinados derivados de los mismos de la presente invención y sus composiciones farmacéuticas para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la replicación del VHC y/o el tratamiento de la infección por VHC.

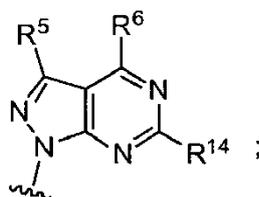
Estas y otros objetivos se apreciarán fácilmente a partir de la siguiente descripción detallada.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula estructural I que tiene la configuración estereoquímica:

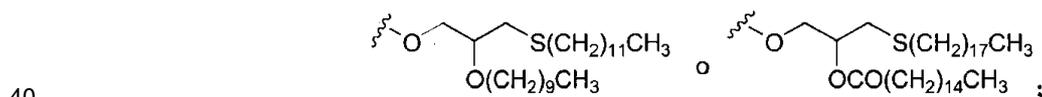


45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para inhibir la polimerasa NS5B del VHC, inhibir la replicación del VHC o tratar la infección del VHC en la que B es



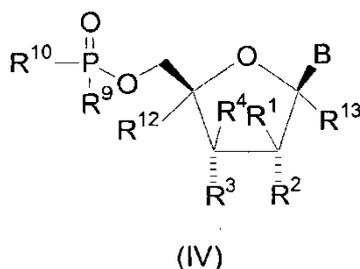
50 Y es alquilcarbonilo C₁₋₁₀, P₃O₉H₄, P₂O₆H₃ o P(O)R⁹R¹⁰;
R¹ es hidrógeno, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo o de 1 a 3

- átomos de flúor y uno de R² y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R² y R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno; hidroxilo; halógeno;
- 5 alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor, alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con alcoxi C₁₋₃ o de 1 a 3 átomos de flúor, alquenoiloxi C₂₋₆, alquiltio C₁₋₄, alquilcarboniloxi C₁₋₈,
- 10 ariloxicarbonilo, azido, amino, alquilamino C₁₋₄ y di(alquilo C₁₋₄)amino; o
- 15 R² es hidrógeno, alquenoil C₂₋₄, alquinoil C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo o de 1 a 3 átomos de flúor y uno de R¹ y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R¹ y R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno; hidroxilo; halógeno;
- 20 alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor, alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcoxi C₁₋₃, carboxi o de 1 a 3 átomos de flúor, alquenoiloxi C₂₋₆, alquiltio C₁₋₄, alquilcarboniloxi C₁₋₈,
- 25 ariloxicarbonilo, azido, amino, alquilamino C₁₋₄ y di(alquilo C₁₋₄)amino; o
- 30 R¹ y R² junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un sistema de anillo monocíclico saturado de 3 a 6 miembros que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de O, S y N-alquilo C₀₋₄; R⁴ y R⁶ son cada uno de forma independiente H, OH, SH, NH₂, alquilamino C₁₋₄, di(alquilo C₁₋₄)amino, cicloalquilamino C₃₋₆, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ o CF₃; R⁵ es H, alquilo C₁₋₆, alquenoil C₂₋₆, alquinoil C₂₋₆, alquilamino C₁₋₄, CF₃ o halógeno;
- 35 R¹⁴ es H, CF₃, alquilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, cicloalquilamino C₃₋₆ o di(alquilo C₁₋₄)amino; R¹² y R¹³ son cada uno de forma independiente hidrógeno, metilo, hidroximetilo o fluorometilo; y R⁹ y R¹⁰ son cada uno de forma independiente hidroxilo, OCH₂CH₂SC(=O)alquilo C₁₋₄, OCH₂O(C=O)alquilo C₁₋₄, NHCHMeCO₂Me, OCH(alquilo C₁₋₄)O(C=O)alquilo C₁₋₄,

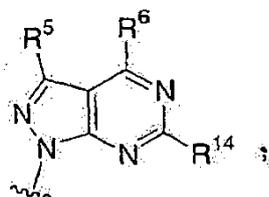


- en el que arilo es fenilo, naftilo o piridilo sustituido opcionalmente con de uno a tres grupos seleccionados de forma independiente de alquilo C₁₋₄, halógeno, ciano, nitro, CF₃, alcoxi C₁₋₄ y alquiltio C₁₋₄ con las condiciones de que (a) cuando R¹ es hidrógeno, uno de R³ y R⁴ es hidrógeno y R² es flúor, el otro de R³ y R⁴ no es hidrógeno, halógeno, azido, trifluorometilo, alquilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, di(alquilo C₁₋₄)amino o alcoxi C₁₋₁₀; (b) cuando R¹ es hidrógeno, uno de R³ y R⁴ es hidrógeno y R² es halógeno, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆ o alquenoiloxi C₂₋₆, el otro de R³ y R⁴ no es hidrógeno, flúor o azido; y (c) cuando R¹ y R³ son hidrógeno y R² es hidroxilo, R⁴ no es hidroxilo.
- 45

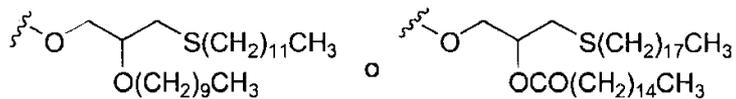
- La presente invención también proporciona nuevos compuestos de fórmula estructural IV de la configuración estereoquímica indicada que son útiles como inhibidores de la polimerasa del VHC. Los compuestos de fórmula IV también son inhibidores de la replicación viral del VHC y son útiles para el tratamiento de la infección viral del VHC:
- 50



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 en la que B es



- 5
 R¹ es hidrógeno, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo o de 1 a 3 átomos de flúor y uno de R² y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R² y R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno; hidroxilo, halógeno;
 10 alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor, alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con alcoxi C₁₋₃ o de 1 a 3 átomos de flúor, alqueno C₂₋₆, alquino C₁₋₄, alquilcarbonilo C₁₋₈, ariloxicarbonilo, azido, amino, alquilamino C₁₋₄ y
 20 di(alquil C₁₋₄)amino; o R² es hidrógeno, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo o de 1 a 3 átomos de flúor y uno de R¹ y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R¹ y R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno; hidroxilo, halógeno;
 25 alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor, alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcoxi C₁₋₃, carboxilo o de 1 a 3 átomos de flúor, alqueno C₂₋₆, alquino C₁₋₄, alquilcarbonilo C₁₋₈, ariloxicarbonilo, azido, amino, alquilamino C₁₋₄ y
 30 di(alquil C₁₋₄)amino; o R¹ y R² junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un sistema de anillo monocíclico saturado de 3 a 6 miembros que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de O, S y N-alquilo C₀₋₄; R⁴ y R⁶ son cada uno de forma independiente H, OH, SH, NH₂, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, cicloalquilamino C₃₋₆, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ o CF₃;
 40 R⁵ es H, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, alquilamino C₁₋₄, CF₃ o halógeno; R¹⁴ es H, CF₃, alquilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, cicloalquilamino C₃₋₆ o di(alquil C₁₋₄)amino; R¹² y R¹³ son cada uno de forma independiente hidrógeno, metilo, hidroximetilo o fluorometilo; y R⁹ y R¹⁰ son cada uno de forma independiente hidroxilo, OCH₂CH₂SC(=O)alquilo C₁₋₄, OCH₂O(C=O)alquilo C₁₋₄, NHCHMeCO₂Me, OCH(alquilo C₁₋₄)O(C=O)alquilo C₁₋₄,
 45



50 en la que arilo es fenilo, naftilo o piridilo sustituido opcionalmente con de uno a tres grupos seleccionados de forma independiente de alquilo C₁₋₄, halógeno, ciano, nitro, CF₃, alcoxi C₁₋₄ y alquino C₁₋₄, con la condición de que al menos uno de R⁹ y R¹⁰ no es hidroxilo.

55 Ilustrativo del uso de la invención es cuando el compuesto es 1-(β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(3H)-ona, 4-amino-1-(β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, los correspondientes 5'-trifosfatos; 5'-[bis(isopropiloxicarboniloximetil)]monofosfatos, 5'-mono-(S-C₁₋₄ alcanoil-2-tioetil) monofosfatos y 5'-bis-(S-alcanoil C₁₋₄-2-tioetil)monofosfatos de los mismos;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un derivado nucleosídico de la presente invención que es útil como inhibidor de la polimerasa del VHC es:

5 4-amino-1-(2-*C*-metil-β-*D*-ribofuranosil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina; o los correspondientes 5'-trifosfatos;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

A lo largo de la presente solicitud, los términos siguientes tienen los significados indicados:

10

En los grupos alquilo especificados anteriormente se pretende incluir los grupos alquilo de la longitud indicada en una configuración lineal o ramificada. Ejemplos de dichos grupos alquilo son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, butilo terciario, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo y similares.

15 El término "alqueno" deberá significar alquenos de cadena lineal o ramificada de dos a seis átomos de carbono totales o cualquier número dentro de este intervalo (p. ej., etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo etc.).

El término "alquino" deberá significar alquinos de cadena lineal o ramificada de dos a seis átomos de carbono totales o cualquier número dentro de este intervalo (p. ej., etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo etc.).

20

El término "cicloalquilo" significará anillos cíclicos de alcanos de tres a ocho átomos de carbono totales o cualquier número dentro de este intervalo (es decir, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo).

25 El término "alcoxi" hace referencia a alcóxidos de cadena lineal o ramificada del número de átomos de carbono especificados (p. ej., alcoxi C₁₋₄) o cualquier número dentro de este intervalo [es decir, metoxi (MeO-), etoxi, isopropoxi etc.].

30 El término "alquiltio" hace referencia a alquilsulfuros de cadena lineal o ramificada del número de átomos de carbono especificado (p. ej., alquiltio C₁₋₄) o cualquier número dentro de este intervalo [es decir, metiltio (MeS-), etiltio, isopropiltio etc.].

35 El término "alquilamino" hace referencia a alquilaminas de cadena lineal o ramificada del número de átomos de carbono especificado (p. ej., alquilamino C₁₋₄) o cualquier número dentro de este intervalo [es decir, metilamino, etilamino, isopropilamino, t-butilamino etc.].

40

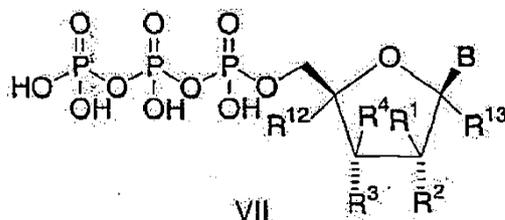
El término "arilo" incluye fenilo, naftilo y piridilo. El grupo arilo está sustituido opcionalmente con de uno a tres grupos seleccionados de forma independiente de alquilo C₁₋₄, halógeno, ciano, nitro, trifluorometilo, alcoxi C₁₋₄ y alquiltio C₁₋₄.

40 Con el término "halógeno" se pretende incluir los átomos de halógeno flúor, bromo y yodo.

Se estimará que el término "sustituido" incluye múltiples grados de sustitución por un sustituyente citado. Cuando se divulgan o reivindican múltiples restos sustituyentes, el compuesto sustituido se puede sustituir de forma independiente con uno o más de los restos sustituyentes divulgados o reivindicados, individual o pluralmente.

45

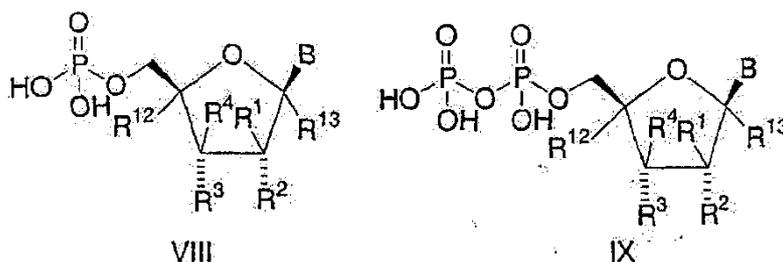
El término "5'-trifosfato" hace referencia a un derivado de éster de ácido trifosfórico del grupo 5-hidroxilo de un compuesto nucleosídico de la presente invención que tiene la fórmula estructural general VII siguiente:



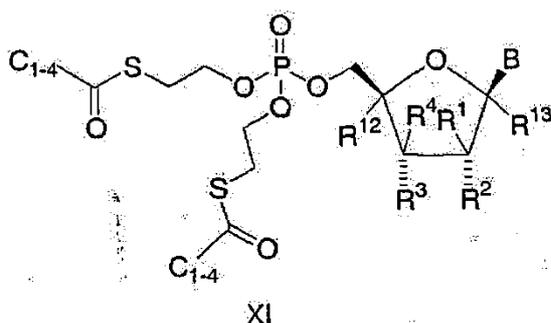
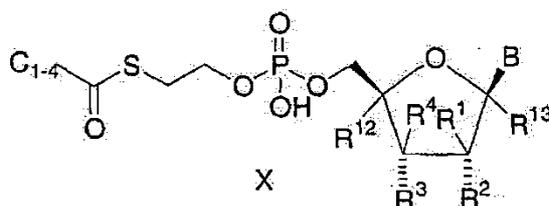
50

en la que B, Z, R¹-R⁴, R¹² y R¹³ son como se ha definido anteriormente. En los compuestos de la presente invención también se pretende incluir las sales farmacéuticamente aceptables del éster trifosfato, así como las sales farmacéuticamente aceptables de los derivados de éster 5'-monofosfato y 5'-difosfato de las fórmulas estructurales VIII y IX, respectivamente.

55



5 El término "5'-(S-acil-2-tioetil)fosfato" o "SATE" hace referencia a un derivado mono o di-éster de un nucleósido 5'-monofosfato de la presente invención de las fórmulas estructurales X y XI, respectivamente, así como sales farmacéuticamente aceptables del mono-éster.



10 Con el término "composición", como en composición farmacéutica, se pretende abarcar un producto que comprende el/los ingrediente(s) activo(s), el(los) ingrediente(s) inerte(s) que forman el transportador, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o agregación de cualesquiera dos o más ingredientes, o de la disociación de uno o más ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la presente
15 invención abarcan cualquier composición formada mezclando un compuesto de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

20 Debe entenderse que los términos "administración de" y "administrar un" compuesto significan proporcionar un compuesto de la invención o un profármaco de un compuesto de la invención al individuo que lo necesite.

25 Se divulga un método de inhibición de la polimerasa NS5B del VHC, inhibición de la replicación del VHC o tratamiento de la infección del VHC con un compuesto de la presente invención en combinación con uno o más agentes útiles para tratar la infección por VHC. Dichos agentes activos contra el VHC incluyen, entre otros, ribavirina, levovirina, viramidina, timosina alfa-1, interferón α , interferón α pegilado (peginterferón α), una
30 combinación de interferón α y ribavirina, una combinación de peginterferón α y ribavirina, una combinación de interferón α y levovirina y una combinación de peginterferón α y levovirina. El interferón α incluye, entre otros, interferón- α 2a (tal como interferón Roferon disponible en Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ), interferón- α 2a pegilado (PegasysTM), interferón- α 2b (tal como interferón Intron-A disponible en Schering Corp., Kenilworth, NJ), interferón- α 2b pegilado (PegIntronTM), un interferón consenso recombinante (tal como interferón alphacon-1) y un producto de
35 interferón- α purificado. El interferón consenso recombinante de Amgen tiene la denominación comercial Infergen®. La levovirina es el L-enantiómero de la ribavirina que ha exhibido actividad inmunomoduladora similar a la de la ribavirina. La viramidina es un análogo amidino de la ribavirina divulgado en el documento WO 01/60379 (asignado a ICN Pharmaceuticals). Los componentes individuales de la combinación se pueden administrar por separado a diferentes momentos durante el curso de la terapia o de forma concurrente en formas de combinación divididas o
únicas. Todos estos regímenes de tratamiento simultáneo o alterno se divulgan y el término "administrar" se debe interpretar en consecuencia. Debe entenderse que el alcance de las combinaciones de los compuestos de la presente invención con otros agentes útiles para tratar la infección por el VHC incluye, en principio, cualquier

combinación con cualquier composición farmacéutica para tratar la infección por VHC. Cuando un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se usan en combinación con un segundo agente terapéutico activo contra el VHC, la dosis de cada compuesto puede ser igual o diferente de la dosis cuando el compuesto se usa en solitario.

5 Para el tratamiento de la infección por VHC, los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con un agente que es un inhibidor de la serín proteasa NS3 del VHC, tal como LY570310 (VX-950). La serín proteasa NS3 del VHC es una enzima viral esencial y se ha descrito que es una diana excelente para la inhibición de la replicación del VHC. Los inhibidores de la proteasa NS3 del VHC basados en sustrato y no basados
10 en sustrato se divulgan en los documentos WO 98/17679, WO 98/22496, WO 98/46630, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/38888, WO 99/50230, WO 99/64442, WO 00/09543, WO 00/59929, WO 01/74768, WO 01/81325 y GB-2337262. La proteasa NS3 del VHC como diana para el desarrollo de inhibidores de la replicación del VHC y para el tratamiento de la infección por VHC se trata en B.W. Dymock, "Emerging therapies for hepatitis C virus infection," *Emerging Drugs*, 6: 13 - 42 (2001).

15 Ribavirina, levovirina y viramidina pueden ejercer sus efectos anti-VHC a través de la modulación de conjuntos intracelulares de los nucleótidos de guanina mediante la inhibición de la enzima intracelular inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). La IMPDH es la enzima limitante de la velocidad de la ruta biosintética en la biosíntesis *de novo* del nucleótido guanina. La ribavirina se fosforila fácilmente intracelularmente y el derivado monofosfato es un
20 inhibidor de la IMPDH. Por tanto, la inhibición de la IMPDH representa otra diana útil para el descubrimiento de los inhibidores de la replicación del VHC. Por tanto, los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con un inhibidor de la IMPDH, tal como VX-497, que se divulga en los documentos WO 97/41211 y WO 01100622, (asignados a Vertex); otro inhibidor de la IMPDH, tal como el divulgado en el documento WO 00/25780 (asignado a Bristol-Myers Squibb); o micofenolato mofetilo [véase A.C. Allison y E.M. Eugui, *Agents Action*, 44 (Suppl.): 165 (1993)].

Para el tratamiento de la infección por VHC, los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con el agente antiviral amantadina (1-aminoadamantano) [véase una descripción exhaustiva de este agente en J. Kirschbaum, *Anal. Profiles Drug Subs.* 12: 1 - 36 (1983)].

30 Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar para el tratamiento de la infección por VHC con ribonucleósidos 2'-C ramificados antivirales divulgados en R. E. Harry-O'kuru, et al., *J. Org. Chem.*, 62: 1754 - 1759 (1997); M. S. Wolfe, et al., *Tetrahedron Lett.*, 36: 7611 - 7614 (1995); y la patente de EE.UU. N° 3.480.613 (Nov. 25, 1969). Dichos ribonucleósidos 2'-C ramificados incluyen, entre otros, 2'-C-metilcitidina, 2'-C-metiladenosina, 2'-C-metilguanosina; y 9-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-2,6-diaminopurina.

35 Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de la misma.

40 También se incluyen en la presente invención composiciones farmacéuticas que comprenden los nuevos compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos de la presente invención en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otro ejemplo de la invención una composición farmacéutica preparada combinando cualquiera de los compuestos descritos con anterioridad y un transportador farmacéuticamente aceptable. Otra
45 ilustración de la invención un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende combinar cualquiera de los compuestos descritos con anterioridad y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se incluyen en la presente invención las composiciones farmacéuticas útiles para inhibir la polimerasa NS5B del VHC que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas útiles para tratar la infección por VHC también
50 están abarcadas por la presente invención. Se divulga un método de inhibición de la polimerasa NS5B del VHC y un método de tratar la replicación del VHC. Adicionalmente, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo contra el VHC. Agentes activos contra el VHC incluyen, entre otros, ribavirina, levovirina, viramidina, timosina alfa-1, un inhibidor de la serín proteasa NS3
55 del VHC, interferón α, interferón α pegilado (peginterferón α), una combinación de interferón α y ribavirina, una combinación de peginterferón α y ribavirina, una combinación de interferón α y levovirina y una combinación de peginterferón α y levovirina. El interferón α incluye, entre otros, interferón-α2a (tal como interferón Roferon disponible en Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ), interferón-α2b (tal como interferón Intron-A disponible en Schering Corp., Kenilworth, NJ), un interferón consenso y un producto de interferón-α purificado. Véase una discusión sobre ribavirina y su actividad contra el VHC en J.O. Saunders y S.A. Raybuck, "Inosine Monophosphate Dehydrogenase: Consideration of Structure, Kinetics, and Therapeutic Potential," *Ann. Rep. Med. Chem.*, 35: 201 - 210 (2000).

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de los compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos y sus composiciones farmacéuticas para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la replicación del VHC y/o el tratamiento de la infección por VHC. Otro objetivo más de la presente invención
65 proporciona compuestos nucleosídicos y determinados derivados de los mismos y sus composiciones farmacéuticas

para su uso como medicamento para la inhibición de la replicación del VHC y/o el tratamiento de la infección por VHC.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un compuesto de Fórmula estructural IV como ingrediente activo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

10 Las composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), ocular (oftálmica), pulmonar (inhalación nasal o bucal) o nasal, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y la gravedad de las afecciones que se estén tratando y de la naturaleza del ingrediente activo. Se pueden presentar cómodamente en una forma de monodosis y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia.

15 En el uso práctico, los compuestos de las fórmulas estructurales I y IV se pueden combinar como el ingrediente activo en una mezcla íntima con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas de mezclado farmacéutico convencionales. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas según la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones para forma de dosificación oral se puede usar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales
20 tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de las preparaciones líquidas, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas y comprimidos, prefiriéndose las preparaciones sólidas
25 orales por encima de las preparaciones líquidas.

Por su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan la forma de monodosis oral más ventajosa en cuyo caso obviamente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas estándar acuosas o no acuosas. Tales composiciones y preparaciones deben
30 contener al menos 0,1 por ciento de compuesto activo. El porcentaje de compuesto activo en estas composiciones puede, por supuesto, variarse y puede estar, de forma conveniente, entre aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente un 60 por ciento del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación eficaz. Los compuestos activos también se pueden administrar por vía intranasal como, por ejemplo, gotas o pulverizador líquidos.

35 Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite
40 graso.

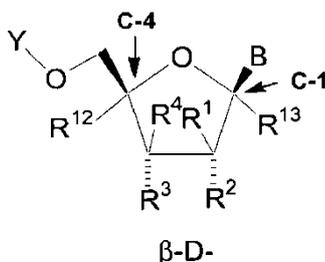
Puede haber presentes otros diversos materiales como revestimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o
45 elixir puede contener, además del ingrediente activo, sacarosa como agente edulcorante, metilo y propilparabenes como conservantes, un pigmento y un aromatizante, tal como sabor a cereza o a naranja.

Los compuestos de las fórmulas estructurales I y IV también se pueden administrar por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones de estos compuestos activos se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

50 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol
60 líquido), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

Para proporcionar a un mamífero, especialmente a un ser humano, una dosis eficaz de un compuesto de la presente invención se puede emplear cualquier vía de administración adecuada. Por ejemplo, se pueden emplear las vías oral, rectal, tópica, parenteral, ocular, pulmonar, nasal y similares. Las formas de dosificación incluyen comprimidos,
65 trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, cremas, pomadas, aerosoles y similares. Preferentemente, los compuestos de las fórmulas estructurales I y IV se administran por vía oral.

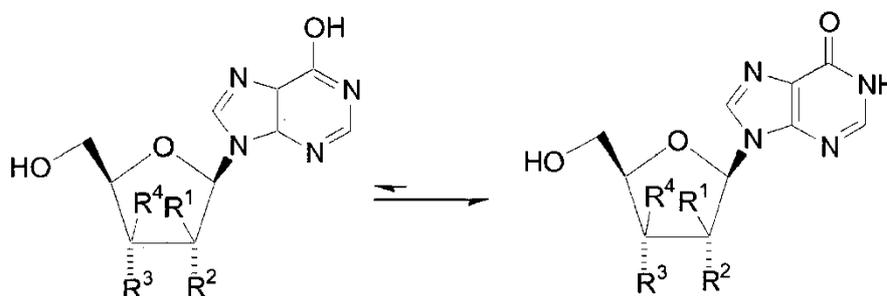
- Para la administración oral a seres humanos, el intervalo de dosis es de 0,01 a 1.000 mg/kg de peso corporal en dosis divididas. En una forma de realización, el intervalo de dosificación es de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal en dosis divididas. En otra forma de realización, el intervalo de dosificación es de 0,5 a 20 mg/kg de peso corporal en dosis divididas. Para administración oral, las composiciones se proporcionan, preferentemente, en forma de comprimidos o cápsulas que contienen de 1,0 a 1.000 mg del ingrediente activo, particularmente, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900 y 1000 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar.
- La dosis eficaz del ingrediente activo empleada puede variar en función del compuesto concreto empleado, del modo de administración, de la afección que se esté tratando y de la gravedad de la afección que se esté tratando. Un experto en la materia puede determinar fácilmente dicha dosis, Este régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.
- Los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros asimétricos y, por tanto, encontrarse en forma de racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diaestereómeros individuales y mezclas de diaestereómeros. Se pretende que la presente invención comprenda derivados nucleosídicos que tengan la configuración estereoquímica β -D para el anillo de furanosa de cinco miembros como se representa en la fórmula estructural siguiente, es decir los compuestos nucleosídicos en los que los sustituyentes en C-1 y C-4 del anillo de furanosa de cinco miembros tienen la configuración estereoquímica β (orientación "hacia arriba" como indica una línea en negrita).



- La estereoquímica de los sustituyentes en las posiciones C-2 y C-3 del anillo de furanosa de los compuestos de la presente invención se indica con una línea discontinua que significa que el sustituyente, por ejemplo R^2 en la fórmula estructural VI anterior, tiene la configuración α (sustituyente "hacia abajo").

- Algunos de los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden contener enlaces dobles olefínicos y, a menos que se especifique lo contrario, están destinados a incluir isómeros geométricos E y Z.

- Algunos de los compuestos descritos en el presente documento pueden existir como tautómeros, tales como tautómeros ceto-enol. Los tautómeros individuales, así como las mezclas de los mismos, son abarcados con los compuestos de las fórmulas estructurales I y IV. Un ejemplo de tautómeros ceto-enol que se pretende que estén abarcados dentro de los compuestos de la presente invención se ilustra a continuación:



- Los compuestos de las fórmulas estructurales I y IV pueden separarse en sus diaestereoisómeros individuales mediante, por ejemplo, cristalización fraccionada de un disolvente adecuado, por ejemplo metanol o acetato de etilo o una mezcla de los mismos, o mediante cromatografía quiral usando una fase estacionaria ópticamente activa.

- Como alternativa, cualquier estereoisómero o isómero de un compuesto de las fórmulas estructurales I y IV se puede obtener mediante síntesis estereoespecífica usando materiales de partida ópticamente puros o reactivos de configuración conocida.

Los compuestos usados en la presente invención se pueden administrar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos

inocuos farmacéuticamente aceptables, entre las que se incluyen bases inorgánicas u orgánicas y ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales de compuestos básicos abarcados dentro de la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" hacen referencia a las sales no tóxicas de los compuestos de la presente invención que generalmente se preparan haciendo reaccionar la base libre con un ácido inorgánico u orgánico adecuado. Sales representativas de los compuestos básicos de la presente invención incluyen, entre otros, los siguientes: acetato, benzenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, sal amónica de N-metilglucamina, oleato, oxalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, sulfato, subacetato, succinato, tanato, tartrato, teocato, tosionato, trietioduro, trimetilamonio y valerato. Adicionalmente, cuando los compuestos usados en la invención son portadores de un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen sales derivadas de bases inorgánicas, incluidas de aluminio, de amoníaco, de calcio, de cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio, de cinc y similares. Particularmente preferidas son las sales amónicas, de calcio, magnesio, potasio y sodio. Entre las sales derivadas de bases orgánicas inocuas farmacéuticamente aceptables se incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas cíclicas y resinas de intercambio de iones básicos tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletildiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glutamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

Asimismo, en el caso de que un grupo ácido carboxílico (-COOH) o alcohol está presente en los compuestos de la presente invención, se pueden usar ésteres farmacéuticamente aceptables de derivados de ácido carboxílico, tales como metilo, etilo o pivaloiloximetilo o derivados acilo de alcoholes tales acetato o maleato. Se incluyen los ésteres y grupos acilo conocidos en la técnica para modificar las características de solubilidad o de hidrólisis para uso como formulaciones de liberación sostenida o de profármacos.

30 Preparación de los compuestos nucleosídicos y derivados que no forman parte de la invención

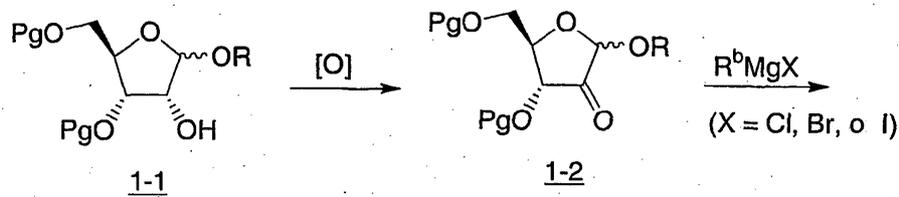
Los compuestos nucleosídicos y derivados de los mismos de la presente invención se pueden preparar siguiendo metodologías sintéticas bien establecidas en la práctica de la química de nucleósidos y nucleótidos. Se hace referencia al texto siguiente para una descripción de los métodos sintéticos usados en la preparación de los compuestos de la presente invención: "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides," L. B. Townsend, ed., Vols. 1 - 3, Plenum Press, 1988, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Un método general representativo para la preparación de compuestos de la presente invención se resume en el Esquema 1 más adelante. Este esquema ilustra la síntesis de compuestos de la fórmula estructural 1-7, en las que el anillo furanosa tiene la configuración β -D-ribo. El material de partida es un furanosido de alquilo 3,5-bis-O-prottegido, tal como metilfuranosido de la fórmula estructural 1-1. Después, el grupo hidroxilo C-2 se oxida con un agente oxidante adecuado, tal como un reactivo de trióxido de cromo o cromato o peryodinano de Dess-Martin, o mediante oxidación de Swern, dando una cetona C-2 de fórmula estructural 1-2. La adición de un reactivo de Grignard, tal como un haluro de alquilo, alquenilo o alquinilo magnesio (por ejemplo MeMgBr, EtMgBr, vinilMgBr, alilMgBr y etinilMgBr) o un alquilo, alquenilo o alquinilo de litio, tal como MeLi, en el doble enlace carbonilo de 1-2 en un disolvente orgánico adecuado, tal como tetrahydrofurano, éter dietílico y similares, da el alcohol terciario C-2 de la fórmula estructural 1-3. A continuación se introduce un buen grupo saliente (tal como Cl, Br y I) en la posición C-1 (anomérica) del derivado de azúcar furanosa mediante el tratamiento del furanosido de la fórmula 1-3 con un haluro de hidrógeno en un disolvente orgánico adecuado, tal como bromuro de hidrógeno en ácido acético, dando el intermedio haluro de furanosilo 1-4. Un sulfonato C-1, tal como metanosulfonato (MeSO₂O-), trifluorometanosulfonato (CF₃SO₂O-), o p-toluenosulfonato (-OTs), también puede servir como un grupo saliente útil en la posterior reacción para generar el enlace glicosídico (nucleosídico). El enlace nucleosídico se construye mediante el tratamiento del intermedio de la fórmula estructural 1-4 con la sal metálica (tal como litio, sodio o potasio) de una 1H-pirrol[2,3-d]pirimidina adecuadamente sustituida 1-5, tal como una 4-halo-1H-pirrol[2,3-d]pirimidina adecuadamente sustituida, que se puede generar *in situ* mediante el tratamiento con un hidruro de álcali (tal como hidruro sódico), un hidróxido de álcali (tal como hidróxido potásico), un carbonato de álcali (tal como carbonato potásico) o una hexametildisilazida de álcali (tal como NaHMDS) en un disolvente orgánico anhidro adecuado, tal como acetonitrilo, tetrahydrofurano, 1-metil-2-pirrolidinona o N,N-dimetilformamida (DMF). La reacción de desplazamiento se puede catalizar usando un catalizador de transferencia de fase, tal como TDA-1 o cloruro de trietilbencilamonio, en un sistema de dos fases (sólido-líquido o líquido-líquido). Los grupos protectores opcionales en el nucleósido protegido de la fórmula estructural 1-6 se escinden después siguiendo metodologías de desprotección establecidas, tales como las descritas en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3^a ed., John Wiley & Sons, 1999. La introducción opcional de un grupo amino en la posición 4 del núcleo de pirrolo[2,3-d]pirimidina se efectúa mediante el tratamiento del intermedio 4-halo 1-6 con la amina adecuada, tal como amoniaco alcohólico o amoniaco líquido, para generar una amina primaria en la posición C-4 (NH₂), una alquilamina para generar una amina secundaria (-NHR), o una dialquilamina para generar una amina terciaria (-

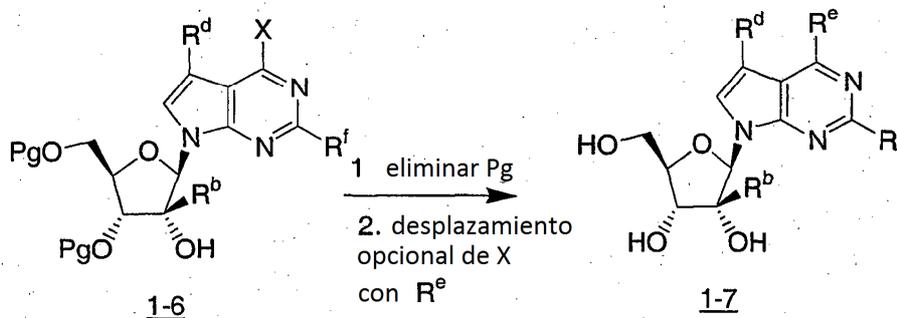
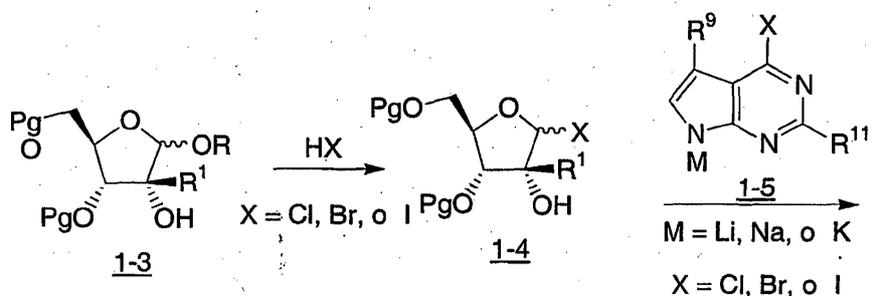
NRR'). Se puede derivar un compuesto de 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(3H)ona mediante hidrólisis de 1-6 con una base acuosa, tal como hidróxido sódico acuoso. La alcoholisis (tal como metanolisis) de 1-6 da un alcóxido C-4 (-OR), mientras que el tratamiento con un mercapturo de alquilo da un derivado de alquiltio C-4 (-SR). Pueden ser necesarias posteriores manipulaciones químicas bien conocidas para los practicantes expertos en la técnica de química orgánica/médica para conseguir los compuestos deseados.

5

Esquema 1



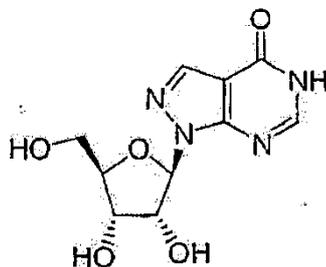
Pg = grupo protector
R = alquilo inferior



10

Los ejemplos siguientes proporcionan citas de las publicaciones de la literatura que contienen detalles para la preparación de compuestos finales o intermedios usados en la preparación de los compuestos finales de la presente invención. Los compuestos nucleosídicos de la presente invención se prepararon de acuerdo con procedimientos detallados en los ejemplos siguientes. No se pretende que los ejemplos sean limitaciones del alcance de la presente invención de ningún modo y no deben interpretarse de ese modo. Los expertos en la técnica de la síntesis de nucleósidos y nucleótidos apreciarán fácilmente las variaciones conocidas de las condiciones y se pueden usar procesos de los siguientes procedimientos preparativos para preparar estos y otros compuestos de la presente invención. Todas las temperaturas están en grados centígrados a menos que se indique lo contrario.

20

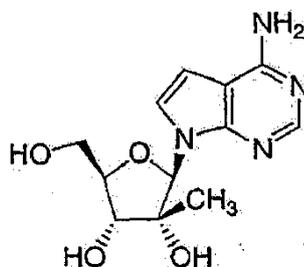
EJEMPLO 11-(β-D-Ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(3H)-ona (ribósido de alopurinol)

5

Este compuesto se obtuvo de fuentes comerciales.

EJEMPLO comparativo

10

4-amino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[2,3-d]pirimidina15 Etapa A: 3,5-bis-O-(2,4-diclorofenilmetil)-1-O-metil-α-ribofuranosa

Una mezcla de 2-O-acetil-3,5-bis-O-(2,4-diclorofenilmetil)-1-O-metil-α-D-ribofuranosa [véase una preparación: Helv. Chim. Acta 78: 486 (1995)] (52,4 g, 0,10 mol) en K₂CO₃ metanólico (500 ml, saturado a temperatura ambiente) se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y después se concentró a presión reducida. El residuo oleoso se suspendió en CH₂Cl₂ (500 ml), se lavó con agua (300 ml + 5 x 200 ml) y salmuera (200 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró, dando el compuesto del título (49,0 g) como aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional en la etapa B a continuación.

20

RMN de ¹H (DMSO-d₆): δ 3,28 (s, 3H, OCH₃), 3,53 (d, 2H, J_{5,4} = 4,5 Hz, H-5a, H-5b), 3,72 (dd, 1H, J_{3,4} = 3,6 Hz, J_{3,2} = 6,6 Hz, H-3), 3,99 (ddd, 1H, J_{2,1} = 4,5 Hz, J_{2,OH-2} = 9,6 Hz, H-2), 4,07 (m, 1H, H-4), 4,50 (s, 2H, CH₂Ph), 4,52, 4,60 (2d, 2H, J_{gem} = 13,6 Hz, CH₂Ph), 4,54 (d, 1H, OH-2), 4,75 (d, 1H, H-1), 7,32 - 7,45, 7,52 - 7,57 (2m, 10H, 2Ph).

25

RMN de ¹³C (DMSO-d₆) δ 55,40, 69,05, 69,74, 71,29, 72,02, 78,41, 81,45, 103,44, 127,83, 127,95, 129,05, 129,28, 131,27, 131,30, 133,22, 133,26, 133,55, 133,67, 135,45, 135,92.

Etapa B: 3,5-Bis-O-(2,4-diclorofenilmetil)-1-O-metil-α-D-eritro-pentofuranos-2-ulosas

30

A una suspensión helada de peryodinano de Dess-Martin (50,0 g, 118 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (350 ml) en argón (Ar) se añadió una solución del compuesto de la etapa A (36,2 g, 75 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (200 ml) gota a gota durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 0,5 horas y después a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla se diluyó con Et₂O anhidro (600 ml) y se vertió en una mezcla helada de Na₂S₂O₃·5H₂O (180 g) en NaHCO₃ acuoso saturado (1400 ml). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (600 ml), agua (800 ml) y salmuera (600 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron, dando el compuesto del título (34,2 g) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional en la etapa C a continuación.

35

RMN de ¹H δ 3,50 (s, 3H, OCH₃), 3,79 (dd, 1H, J_{5a,5b} = 11,3 Hz, J_{5a,4} = 3,5 Hz, H-5a), 3,94 (dd, 1H, J_{5b,4} = 2,3 Hz, H-5b), 4,20 (dd, 1H, J_{3,1} = 1,3 Hz, J_{3,4} = 8,4 Hz, H-3), 4,37 (ddd, 1H, H-4), 4,58, 4,69 (2d, 2H, J_{gem} = 13,0 Hz, CH₂Ph), 4,87 (d, 1H, H-1), 4,78, 5,03 (2d, 2H, J_{gem} = 12,5 Hz, CH₂Ph), 7,19 - 7,26, 7,31 - 7,42 (2m, 10H, 2Ph).

40

RMN de ¹³C (DMSO-d₆) δ 55,72, 69,41, 69,81, 69,98, 77,49, 78,00, 98,54, 127,99, 128,06, 129,33, 129,38, 131,36, 131,72, 133,61, 133,63, 133,85, 133,97, 134,72, 135,32, 208,21.

Etapa C: 3,5-Bis-O-(2,4-diclorofenilmetil)-2-C-metil-1-O-metil-α-D-ribofuranosa

45

A una solución de MeMgBr en Et₂O anhidro (0,48 M, 300 ml) a -55 °C se añadió, gota a gota, una solución del compuesto de la etapa B (17,40 g, 36,2 mmol) en Et₂O anhidro (125 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar

hasta -30 °C y se agitó durante 7 horas a -30 °C hasta -15 °C, después se vertió en agua helada (500 ml) y la mezcla se agitó enérgicamente a temperatura ambiente durante 0,5 horas. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite (10 x 5 cm), que se lavó enérgicamente con Et₂O. La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró.

5 El residuo se disolvió en hexanos (≈30 ml), se aplicó sobre una columna de gel de sílice (10 x 7 cm, preempaquetada en hexanos) y eluyó con hexanos y hexanos EtOAc (9/1), dando el compuesto del título (16,7 g) como un jarabe incoloro.

RMN de ¹H (CDCl₃): δ 1,36 (d, 3H, *J*_{Me,OH} = 0,9 Hz, 2C-Me), 3,33 (q, 1H, OH), 3,41 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3,3 Hz), 3,46 (s, 3H, OCH₃), 3,66 (d, 2H, *J*_{5,4} = 3,7 Hz, H-5a, H-5b), 4,18 (c aparente, 1H, H-4), 4,52 (s, 1H, H-1), 4,60 (s, 2H, CH₂Ph), 4,63, 4,81 (2d, 2H, *J*_{gem} = 13,2 Hz, CH₂Ph), 7,19 – 7,26, 7,34 – 7,43 (2m, 10H, 2Ph).

10 RMN de ¹³C (CDCl₃): δ 24,88, 55,45, 69,95, 70,24, 70,88, 77,06, 82,18, 83,01, 107,63, 127,32, 129,36, 130,01, 130,32, 133,68, 133,78, 134,13, 134,18, 134,45, 134,58.

Etapa D: 4-cloro-7-(3,5-bis-O-(2,4-diclorofenilmetil)-2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirrolol[2,3-d]pirimidina

15 A una solución del compuesto de la etapa C (9,42 g, 19 mmol) en diclorometano anhidro (285 ml) a 0 °C se añadió HBr (5,7 M en ácido acético, 20 ml, 114 mmol) gota a gota. La solución resultante se agotó a 0 °C durante 1 hora y después a temperatura ambiente durante 3 horas, se evaporó al vacío y se coevaporó con tolueno anhidro (3 x 40 ml). El residuo oleoso se disolvió en acetonitrilo anhidro (50 ml) y se añadió a una solución de sal de sodio de 4-cloro-1H-pirrolol[2,3-d]pirimidina [véase la preparación en J. Chem. Soc., 131 (1960)] en acetonitrilo [generado *in situ*

20 a partir de 4-cloro-1H-pirrolol[2,3-d]pirimidina (8,76 g, 57 mmol) en acetonitrilo anhidro (1.000 ml) y NaH (60 % en aceite mineral, 2,28 g, 57 mmol), tras 4 horas de agitación enérgica a temperatura ambiente]. La mezcla combinada se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y después se evaporó hasta sequedad. El residuo se suspendió en agua (250 ml) y se extrajo con acetato de EtOAc (2 x 500 ml). Los extractos combinados se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron. El producto bruto se purificó en una columna de gel de sílice (10 cm x 10 cm) usando acetato de etilo/hexano (1:3 y 1:2) como eluyente. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron al vacío, dando el producto deseado (5,05 g) como una espuma incolora.

25 RMN de ¹H (CDCl₃): δ 0,93 (s, 3H, CH₃), 3,09 (s, 1H, OH), 3,78 (dd, 1H, *J*_{5,5'} = 10,9 Hz, *J*_{5,4} = 2,5 Hz, H-5'), 3,99 (dd, 1H, *J*_{5,4} = 2,2 Hz, H-5''), 4,23 - 4,34 (m, 2H, H-3', H-4'), 4,63, 4,70 (2d, 2H, *J*_{gem} = 12,7 Hz, CH₂Ph), 4,71, 4,80 (2d, 2H, *J*_{gem} = 12,1 Hz, CH₂Ph), 6,54 (d, 1H, *J*_{5,6} = 3,8 Hz, H-5), 7,23 - 7,44 (m, 10H, 2Ph).

30 RMN de ¹³C (CDCl₃): δ 21,31, 69,10, 70,41, 70,77, 79,56, 80,41, 81,05, 91,11, 100,57, 118,21, 127,04, 127,46, 127,57, 129,73, 129,77, 130,57, 130,99, 133,51, 133,99, 134,33, 134,38, 134,74, 135,21, 151,07, 151,15 152,47.

Etapa E: 4-cloro-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[2,3-d]pirimidina

35 A una solución del compuesto de la etapa D (5,42 g, 8,8 mmol) en diclorometano (175 ml) a -78 °C se añadió tricloruro de boro (1 M en diclorometano, 88 ml, 88 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a -78 °C durante 2,5 horas, después a -30 °C a -20 °C durante 3 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de metanol/diclorometano (1:1) (90 ml) y la mezcla resultante se agitó a -15 °C durante 30 minutos, después se neutralizó con amoníaco acuoso a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El sólido se filtró y se lavó con CH₂Cl₂/MeOH (1/1, 250 ml). El filtrado combinado se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH₂Cl₂ y gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (99:1, 98:2, 95:5 y 90:10) como eluyente para obtener el compuesto deseado (1,73 g) como una espuma incolora, que se convirtió en un sólido amorfo tras el tratamiento con MeCN.

45 RMN de ¹H (DMSO-*d*₆) δ 0,64 (s, 3H, CH₃), 3,61 - 3,71 (m, 1H, H-5'), 3,79 - 3,88 (m, 1H, H-5''), 3,89 - 4,01 (m, 2H, H-3', H-4'), 5,15 - 5,23 (m, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 6,24 (s, 1H, H-1'), 6,72 (d, 1H, *J*_{5,6} = 3,8 Hz, H-5), 8,13 (d, 1H, H-6), 8,65 (s, 1H, H-2).

RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 20,20, 59,95, 72,29, 79,37, 83,16, 91,53, 100,17, 117,63, 128,86, 151,13, 151,19, 151,45.

Etapa F: 4-amino-7-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[2,3-d]pirimidina

50 Al compuesto de la etapa E (1,54 g, 5,1 mmol) se añadió amoníaco metanólico (saturado a 0 °C, 150 ml). La mezcla se calentó en una autoclave de acero inoxidable a 85 °C durante 14 horas, después se enfrió y se evaporó al vacío. La mezcla bruta se purificó en una columna de gel de sílice con CH₂Cl₂/MeOH (9/1) como eluyente, dando el compuesto del título como una espuma incolora (0,8 g), que se separó como un sólido amorfo tras el tratamiento con MeCN. El sólido amorfo se recrystalizó en metanol/acetonitrilo; p. f. 222 °C.

55 RMN de ¹H (DMSO-*d*₆): δ 0,62 (s, 3H, CH₃), 3,57 - 3,67 (m, 1H, H-5'), 3,75 - 3,97 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5,00 (s, 1H, 2'-OH), 5,04 (d, 1H, *J*_{3'OH,3'} = 6,8 Hz, 3'-OH), 5,06 (t, 1H, *J*_{5'OH,5,5'} = 5,1 Hz, 5'-OH), 6,11 (s, 1H, H-1'), 6,54 (d, 1H, *J*_{5,6} = 3,6 Hz, H-5), 6,97 (s a, 2H, NH₂), 7,44 (d, 1H, H-6), 8,02 (s, 1H, H-2).

RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 20,26, 60,42, 72,72, 79,30, 82,75, 91,20, 100,13, 103,08, 121,96, 150,37, 152,33, 158,15.

60 CL-EM: Hallado: 279,10 (M-H⁺); calc. para C₁₂H₁₆N₄O₄+H⁺: 279,11.

EJEMPLO 2Proceso general para el resto profármaco SATE

5 Los pronucleótidos de S-acil-2-tioetilo (SATE) se tratan en C. R. Wagner, V. V. Iyer y E. J. McIntee, "Pronucleotides: Toward the In Vivo Delivery of Antiviral and Anticancer Nucleotides," Med. Res. Rev., 20: 1 - 35 (2000), que se incorpora en el presente documento en su totalidad por referencia. Los derivados de SATE de los nucleósidos también se divulgan en las patentes de EE.UU. Nº 5.770.725; 5.849.905 07 y 6.020.482, los contenidos de todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

10

Bis(S-acetil-2-tioetilo)-N,N-diisopropilfosforoamidita:

15

Se disolvió 2-mercaptoetanol (5 g, 64 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml). A esta solución se añadió trietilamina (7,67 mL, 57,6 mmol), y la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo hasta 0 °C. Gota a gota se añadió anhídrido acético (4,54 ml, 48 mmol) en 10 minutos y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C. Después, la mezcla de reacción se dejó llegar hasta la temperatura ambiente durante un periodo de 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml), se lavó con agua (75 ml), 5 % de NaHCO₃ acuoso (75 ml) y salmuera (75 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío para dar un aceite. El aceite se disolvió después en THF anhidro (40 ml) y se añadió trietilamina anhidro (7,76 ml). A esta mezcla se añadieron tamices moleculares activados (4Å) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo hasta 0 °C y se añadió dicloruro diisopropilfosforoamidoso (6,47 g, 32,03 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 horas en atmósfera inerte. A la mezcla de reacción se añadió hexano (40 ml) y se filtró el precipitado formado. El filtrado se concentró hasta un cuarto del volumen, se purificó mediante cromatografía en columna de sílice cargada y se eluyó con hexano que contiene 3 % de trietilamina y una cantidad creciente de acetato de etilo (de 0 a 7 %), dando el compuesto del título como un aceite (2,36 g).

20

RMN de ¹H (CDCl₃): δ 1,17 (s, 6H), 1,21 (s, 6H), 2,36 (s, 6H), 3,14 (t, J = 6,44 Hz), 3,51 - 3,84 (m, 6H); RMN de ¹³C (CDCl₃): δ 24,47, 24,61, 30,48, 42,85, 43,1, 61,88, 62,23, 195,25; RMN de ³¹P (CDCl₃): δ 146,96.

25

EJEMPLO 3

30

Nucleósido 5'-trifosfatos

Los nucleósidos 5'-trifosfatos de la presente invención se prepararon de acuerdo con los procedimientos generales descritos en Chem. Rev.100:2047 (2000).

35

EJEMPLO 4Purificación y análisis de la pureza de los nucleósido 5'-trifosfatos

40

Os trifosfatos se purificaron mediante cromatografía de intercambio aniónico (AX) usando una columna Mono Q de 30 x 100 mm (Pharmacia) con un sistema de tamponamiento de Tris 50 mM, pH 8. Los gradientes de elución fueron normalmente de NaCl 0,8 M en dos volúmenes de columna a 6,5 ml/min. Las fracciones adecuadas de la cromatografía de intercambio aniónico se recogieron y desalaron mediante cromatografía de fase inversa (RP) usando una columna Luna C18 de 250 x 21 mm (Phenomenex) con un caudal de 10 ml/min. Los gradientes de elución fueron, generalmente, de 1 % a 95 % de metanol en 14 minutos a una concentración constante de acetato de tetrametilamonio 5 mM (TEAA).

45

Los espectros de masas de los trifosfatos purificados se determinaron usando espectrometría de masas en línea con HPLC en un Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) MSD 1100. Se usó una columna de guardia Phenomenex Luna (C18(2)), 150 x 2 mm más 30 x 2 mm, tamaño de partícula de 3 µm para la HPLC de RP. Se realizó un gradiente lineal de 0 a 50 % (16 minutos) de acetonitrilo en TEAA (acetato de trimetilamonio) 20 mM a pH 7 en serie con detección de espectros de masas en modo de ionización negativa. Se usaron gas nitrógeno y un nebulizador neumático para generar la electropulverización. Se muestreó el intervalo de masas de 150 - 900. Las masas moleculares se determinaron usando el paquete de análisis de HP Chemstation.

50

55

La pureza de los trifosfatos purificados se determinó mediante HPLC RP y AX analítico. La HPLC de RP con una columna Phenomenex Luna o Jupiter (250 x 4,6 mm), con tamaño de partícula de 5 µm, se llevó a cabo normalmente un gradiente acetonitrilo del 2 - 70 % en 15 minutos en TEAA 100 mM, pH 7. La HPLC de AX se realizó en una columna Mono Q de 1,6 x 5 mm (Pharmacia). Los trifosfatos se eluyeron con un gradiente de NaCl de 0 a 0,4 M a una concentración constante de Tris 50 mM pH 8. La pureza de los trifosfatos fue generalmente >80 %.

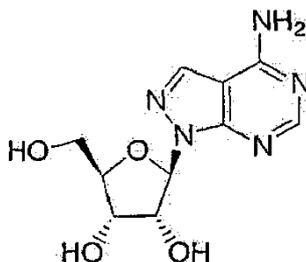
60

EJEMPLO 5Nucleósido 5'-monofosfatos

- 5 Los nucleósido 5'-monofosfatos de la presente invención se prepararon de acuerdo con el procedimiento general descrito en Tetrahedron Lett. 50: 5065 (1967).

EJEMPLO 6

- 10 4-Amino-1-(β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina



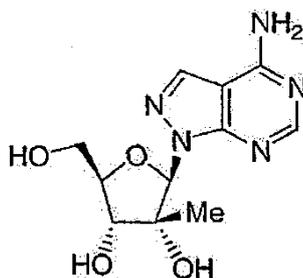
- 15 Este compuesto se preparó siguiendo los procedimientos descritos en Nucleic Acids Res., 11: 871 - 872 (1983).

EJEMPLO 7Caracterización por espectros de masas de los nucleósido 5'-trifosfatos

- 20 Los espectros de masas de los nucleósido 5'-trifosfatos se determinaron como se describe en el ejemplo 5. En la siguiente tabla se enumeran las masas calculadas y experimentales para los nucleósidos 5'-trifosfatos preparados de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 4. Los números de los ejemplos corresponden al nucleósido parental del nucleósido 5'-trifosfato.

Ejemplo	Calculado	Hallado
2	520,0	520,0

25

EJEMPLO 84-amino-1-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

30

Etapa A: 4-amino-1-(3,5-bis-O-(2,4-diclorofenilmetil)-2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirrozolo[3,4-d]pirimidina

- 35 En el compuesto de la etapa C del ejemplo 2 (1,00 g, 2,02 mmol) en diclorometano (20 ml) se introdujeron burbujas de gas HBr durante 5 minutos hasta que se saturó. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se evaporó al vacío y se coevaporó con tolueno anhidro (10 ml). La 4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (Aldrich, 0,43 g, 3,18 mmol) y el NaH (60 %, 150 mg, 3,8 mmol) se agitaron 1-metil-2-pirrolidinona (10 ml) durante 30 minutos. La solución resultante se vertió en al residuo de bromo azúcar anterior y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla se diluyó con tolueno (50 ml), se lavó con salmuera (10 %, 3 x 50 ml) y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice (EtOAc como eluyente), dando un sólido (400 mg).

40

Etapa B: 4-amino-1-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

- 45 A una solución del compuesto de la etapa A (0,20 g, 0,33 mmol) en diclorometano (10 ml) a -78 °C se añadió tricloruro de boro (1 M en diclorometano) (3 ml, 3 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a -78 °C durante 0,5 horas, después a -45 °C a -30 °C durante 2 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de acetato sódico (1,0 g) y

metanol (10 ml). La solución se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH_2Cl_2 y gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5 - 90:10) como eluyente para obtener el compuesto deseado (60 mg) como un sólido, que se recrystalizó en metanol y acetonitrilo, dando el compuesto del título como un sólido blanquecino (40 mg).

- 5 RMN de ^1H (DMSO-d_6): δ 0,75 (s, 3H), 3,59 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 3,91 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 4,69 (t, 1H, J 5,1 Hz), 5,15 (m, 2H), 6,13 (s, 1H), 7,68 (s, a, 1H), 7,96 (s, a, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,21 (s, 1H).
 RMN de ^{13}C (DMSO-d_6): 19,32, 62,78, 74,11, 78,60, 83,65, 90,72, 99,79, 133,50, 153,89, 156,21, 158,05.
 CL-EM: Hallado: 282,1 ($\text{M}+\text{H}^+$); calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4+\text{H}^+$: 282,1.

10 Ensayos biológicos

Los ensayos usados para medir la inhibición de la polimerasa NS5B del VHC y la replicación del VHC se describen a continuación.

- 15 La eficacia de los compuestos de la presente invención como inhibidores de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) NS5B del VHC se midió en el ensayo siguiente.

A. Ensayo de inhibición de la polimerasa NS5B del VHC

- 20 Este ensayo se usó para medir la capacidad de los derivados nucleosídicos de la presente invención para inhibir la actividad enzimática de la ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5B) del virus de la hepatitis C (VHC) e un molde de ARN heteromérico.

Procedimiento:

- 25 Condiciones del tampón de ensayo: (50 μl -total/reacción)
- Tris 20 mM, pH 7,5
 EDTA 50 μM
 30 DTT, 5 mM
 MgCl_2 2 mM
 KCl 80 mM
 0,4 U/ μl de RNAsin (Promega, la reserva es de 40 unidades/ μl)
 0,75 μg de t500 (un ARN de 500-nt fabricado usando transcripción primaria T7 con una secuencia de la
 35 región NS2/3 del genoma de la hepatitis C)
 1,6 μg de NS5B purificada de hepatitis C (forma con 21 aminoácidos truncados en el extremo C)
 A, C, U, GTP 1 μM de (mezcla de nucleósido trifosfatos)
 [α - ^{32}P]-GTP o [α - ^{33}P]-GTP
- 40 Los compuestos se analizaron a varias concentraciones hasta una concentración final de 100 μM .

- Se realizó un volumen adecuado del tampón de reacción incluyendo enzima y molde t500. Los derivados nucleosídicos de la presente invención se pipetearon en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Una mezcla de nucleósido trifosfatos (NTP), incluyendo el GTP radiomarcado, se preparó y se pipeteó en los pocillos de una placa
 45 de 96 pocillos. La reacción se inició mediante la adición de la solución de reacción enzima-molde y se dejó proceder a temperatura ambiente durante 1 - 2 horas.

- La reacción se inactivó mediante la adición de 20 μl de EDTA 0,5 M, pH 8,0. Se incluyeron las reacciones blanco en las que se añadió a los NTP la solución de inactivación antes de la adición del tampón de reacción.

- 50 Se colocaron 50 μl de la reacción inactivada sobre discos de filtro DE81 (Whatman) y se dejaron secar durante 30 minutos. Los filtros se lavaron con formiato amónico 0,3 M a pH 8 (150 ml/lavado hasta que las cpm en 1 ml de lavado son inferiores a 100, normalmente 6 lavados). Los filtros se contaron en líquido de centelleo de 5 ml en un contador de centelleo.

- 55 **El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:**

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{[1 - (\text{cpm en la reacción de ensayo} - \text{cpm en el blanco})]}{(\text{cpm en la reacción control} - \text{cpm en blanco})} \times 100$$

- 60 Los compuestos representativos analizados en el ensayo de la polimerasa NS5B del VHC exhibieron CI_{50} inferiores a 100 micromolar.

B. Ensayo de la inhibición de la replicación del ARN del VHC:

Los compuestos de la presente invención también se evaluaron para determinar su capacidad para afectar a la replicación del ARN del virus de la hepatitis C en células de hepatoma cultivadas (HuH-7) que contienen un replicón del VHC subgenómico. Los detalles del ensayo se describen a continuación. Este ensayo del replicón es una modificación del descrito en V. Lohmann, F. Korner, J-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann y R. Bartenschlager, "Replication of a Sub-genomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line," Science 285:110 (1999).

Protocolo:

El ensayo fue un ensayo *in situ* de protección de ribonucleasa en placas basado en centelleo por proximidad (SPA). Se sembraron 10.000 - 40.000 células en 100 - 200 μ l de medio que contiene 0,8mg/ml de G418 en placas cytostar de 96 pocillos (Amersham). Los compuestos se añadieron a las células a varias concentraciones de hasta 100 μ M en 1 % de DMSO a tiempo 0 a 18 horas y después se cultivaron durante 24 - 96 horas. Las células se fijaron (20 minutos, 10 % de formalina), se permeabilizaron (20 minutos, 0,25 % de Triton X-100/PBS) y se hibridaron (durante la noche, 50 °C) con una sonda de ARN monocatenario con ³³P complementaria a la hebra (+) de NS5B (u otros genes) contenida en el genoma viral del ARN. Las células se lavaron, se trataron con RNAsa, se lavaron, se calentaron hasta 65 °C y se contaron en un Top-Count. La inhibición de la replicación se leyó como una disminución de las cuentas por minuto (cpm).

Las células de hepatoma humano HuH-7, que se seleccionaron de modo que contuvieran un replicón subgenómico, portan un ARN citoplásmico que consiste en una región no traducida (NTR) en 5' del VHC, un marcador seleccionable de neomicina, un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) del EMCV y proteínas no estructurales del VHC NS3 a través de NS5B, seguido de la NTR 3'.

Los compuestos representativos analizados en el ensayo de replicación exhibieron CE₅₀ inferiores a 100 micromolar.

Los derivados nucleosídicos de la presente invención también se evaluaron para determinar la toxicidad celular y la especificidad antiviral en los contracrribados descritos más adelante.

C. CONTRACRIBADOS:

La capacidad de los derivados nucleosídicos de la presente invención para inhibir las ADN polimerasas humanas se midió en los ensayos siguientes.

a. Inhibición de las ADN polimerasas alfa y beta humanas:Condiciones de la reacción:

50 μ l de volumen de reacción

Componentes del tampón de reacción:

Tris-HCl 20 mM, pH 7,5

200 μ g/ml de seroalbúmina bovina

KCl 100 mM

β -mercaptoetanol 2 mM

MgCl₂ 10 mM

dA, dG, dC, dTTP 1,6 μ M

α -³³P-dATP

Enzima y molde:

0,05 mg/ml del molde de ADN discontinuo de esperma de pez

0,01 U/ μ l de ADN polimerasa α o β

Preparación del molde de ADN discontinuo de esperma de pez

Añadir 5 μ l de MgCl₂ 1 M a 500 μ l de ADN activado de esperma de pez (USB 70076);

Calentar hasta 37 °C y añadir 30 μ l de 65 U/ μ l de exonucleasa III (GibcoBRL 18013 - 011);

Incubar 5 minutos a 37 °C;

Terminar la reacción mediante calentamiento a 65 °C durante 10 minutos;

Cargar partes alícuotas de 50 - 100 μ l en columnas de cromatografía Bio-spin 6 (Bio-Rad 732 - 6002) equilibradas con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5;

Eluir mediante centrifugación a 1.000 X g durante 4 minutos;

Juntar los eluatos y medir la absorbancia a 260 nm para determinar la concentración.

El molde del ADN se diluyó en un volumen adecuado de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y la enzima se diluyó en un volumen adecuado de Tris-HCl 20 mM, que contenía β -mercaptoetanol 2 mM y KCl 100 mM. El molde y la enzima se pipetearon en tubos de microcentrífuga o una placa de 96 pocillos. Las reacciones blanco, excluyendo la enzima y las reacciones control excluyendo el compuesto de ensayo, también se prepararon usando tampón de dilución enzimática y el disolvente del compuesto de ensayo, respectivamente. La reacción se inició con tampón de reacción con los componentes como se ha indicado anteriormente. La reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C. La reacción se inactivó mediante la adición de 20 μ l de EDTA 0,5M. Se aplicaron manchas de 50 μ l de la reacción inactivada sobre discos de filtro Whatman DE81 y se secaron al aire. Los discos de filtro se lavaron repetidamente con 150 ml de formiato amónico 0,3M a pH 8 hasta que 1 ml de lavado era < 100 cpm. Los discos se lavaron dos veces con 150 ml de etanol absoluto y una vez con 150 ml de éter anhidro, se secaron y se contaron en 5 ml de líquido de centelleo.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: % de inhibición = $[1 - (\text{cpm en la reacción de ensayo} - \text{cpm en el blanco}) / (\text{cpm en la reacción control} - \text{cpm en el blanco})] \times 100$.

b. Inhibición de la ADN polimerasa gamma humana:

El potencial de inhibición de la ADN polimerasa gamma humana se midió en reacciones que incluyeron 0,5 ng/ μ l de enzima; dATP dGTP, dCTP y TTP 10 μ M; 2 μ Ci/reacción [α -³³P]-dATP, y 0,4 μ g/ μ l de ADN inactivado de esperma de pez (adquirido en US Biochemical) en un tampón que contenía Tris 20 mM a pH8, β -mercaptoetanol 2 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y 0,1 μ g/ μ l de BSA. Se dejó que las reacciones procedieran durante 1 hora a 37 °C y se inactivaron mediante la adición de EDTA 0,5M hasta una concentración final de 142 mM. La formación de producto se cuantificó mediante la unión al filtro de intercambio aniónico y recuento por centelleo. Los compuestos se analizaron a hasta 50 μ M.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = [1 - (\text{cpm en la reacción de ensayo} - \text{cpm en el blanco}) / (\text{cpm en la reacción control} - \text{cpm en el blanco})] \times 100$$

La capacidad de los derivados nucleosídicos de la presente invención para inhibir la infectividad del VIH y la diseminación del VIH se midió en los ensayos siguientes.

c. Ensayo de infectividad del VIH

Se realizaron los ensayos con una variante de las células HeLa Magi que expresan tanto CXCR4 como CCR5 seleccionados según la expresión de fondo baja de β -galactosidasa (β -gal). Las células se infectaron durante 48 horas y se cuantificó la producción de β -gal a partir del promotor integrado LTR del HTV-1 con un sustrato quimioluminiscente (Galactolight Plus, Tropix, Bedford, MA). Los inhibidores se valoraron (por duplicado) en diluciones seriadas por dos comenzando en 100 μ M; el porcentaje de inhibición en cada concentración se calculó en relación con la infección control.

d. Inhibición de la diseminación del VIH

La capacidad de los compuestos de la presente invención para inhibir la diseminación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se midió mediante el método descrito en la patente de EE.UU. N° 5.413.999 (9 de mayo de 1995) y J. P. Vacca, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4096 - 4100 (1994), que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Los derivados nucleosídicos de la presente invención también se sometieron a detección selectiva de la citotoxicidad contra células de hepatoma cultivadas (HuH-7) que contienen un replicón del VHC subgenómico en un ensayo basado en células con MTS como se describe en el ensayo siguiente. La línea celular HuH-7 se describe en H. Nakabayashi, et al., Cancer Res., 42: 3858 (1982).

e. Ensayo de citotoxicidad:

Los cultivos celulares se prepararon en medio adecuado a concentraciones de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/ml para cultivos en suspensión en incubaciones de 3 días y $5,0 \times 10^4$ células/ml para cultivos adherentes en incubaciones de 3 días. Se transfirieron 99 μ l del cultivo celular a los pocillos de una placa tratada de cultivo tisular de 96 pocillos y se añadió 1 μ l de 100 veces la concentración final del compuesto de ensayo en DMSO. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante un periodo de tiempo especificado. Tras el periodo de incubación, a cada pocillo se añadieron 20 μ l del reactivo de ensayo de proliferación celular de una solución CellTiter 96 Aqueous One Solution (MTS) y las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante un periodo de tiempo adicional de hasta 3 horas. Las placas se agitaron para mezclar bien y se leyó la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas. Se preparó una curva patrón de las células del cultivo en suspensión con un número de células conocido justo antes de la adición del reactivo MTS. Las células activas metabólicamente reducen el MTS en formazán. El formazán absorbe

a 490 nm. La absorbancia a 490 nm en presencia del compuesto se comparó con la absorbancia en las células sin ningún compuesto añadido. Referencia: Cory, A. H. et al., "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture," *Cancer Commun.* 3: 207 (1991).

5 Los siguientes ensayos se realizaron para medir la actividad de los compuestos de la presente invención contra otros virus de ARN dependientes de ARN.

a. Determinación de la actividad antiviral *in vitro* de compuestos contra rinovirus (ensayo de inhibición del efecto citopático):

10 Las condiciones de ensayo se describen en el artículo de Sidwell y Huffman, "Use of disposable microtissue culture plates for antiviral and interferon induction studies," *Appl. Microbiol.* 22: 797 - 801 (1971).

Virus:

15 Se usó la cepa HGP del rinovirus de tipo 2 (RV-2) con células KB y medio (0,1 % de NaHCO₃, sin antibióticos) como se indica en la referencia de Sidwell y Huffman. El virus, obtenido de la ATCC, procedía de un frotis de garganta de un varón adulto con una enfermedad de las vías respiratorias superiores febril aguda leve.

20 La cepa 211 del rinovirus de tipo 9 (RV-9) y la cepa Tow del rinovirus de tipo 14 (RV-14) también se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en Rockville, MD. RV-9 procedía de lavados de garganta humana y RV-14 de un frotis de garganta de un adulto joven con enfermedad de las vías respiratorias altas. Ambos virus se usaron con células HeLa Ohio-1 (Dr. Fred Hayden, Univ. of VA) que eran células de carcinoma epiteloides cervical humano. Como medio de crecimiento se usó medio MEM (medio mínimo esencial de Eagle) con 5 % de suero bovino fetal (FBS) y 0,1 % de NaHCO₃.

El medio para el ensayo antiviral para los tres tipos de virus fue MEM con 5 % de FBS, 0,1 % de NaHCO₃, 50 µg de gentamicina/ml y MgCl₂ 10 mM.

30 La concentración más elevada usada para analizar los compuestos de la presente invención fue 2.000 µg/ml. El virus se añadió a la placa de ensayo aproximadamente 5 minutos después del compuesto de ensayo. También se realizaron controles adecuados. Las placas de ensayo se incubaron con aire humidificado y 5 % de CO₂ a 37 °C. La citotoxicidad se controló en las células control microscópicamente respecto a los cambios morfológicos. El análisis de regresión de los datos de ECP del virus y los datos de control de la toxicidad dieron la DE₅₀ (dosis eficaz al 50 %) y la CC₅₀ (concentración citotóxica al 50 %). El índice de selectividad (IS) se calculó mediante la fórmula: $IS = C_{50} \div CE_{50}$.

b. Determinación de la actividad antiviral *in vitro* de compuestos contra el dengue, banzi y la fiebre amarilla (Ensayo de inhibición del ECP).

40 Los detalles del ensayo se proporcionan en la referencia Sidwell y Huffman citada anteriormente.

Virus:

45 El virus del dengue de tipo 1, cepa Nueva Guinea, se obtuvo del Centro para el Control de Enfermedades. Se usaron dos líneas de células de riñón de mono verde africano para cultivar el virus (Vero) y realizar ensayos antivirales (MA-104). Tanto el virus de la fiebre amarilla, cepa 17D, preparado a partir de cerebro de ratón infectado, como el virus Banzi, cepa H336, aislado del suero de un chico febril en Sudáfrica, se obtuvieron de la ATCC. Las células Vero se usaron con ambos virus y para el ensayo.

Células y medios:

50 Se usaron células MA-104 (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) y células Vero (ATCC) en medio 199 con 5 % de FBS y 0,1 % de NaHCO₃ y sin antibióticos.

55 El medio de ensayo para los virus del dengue, la fiebre amarilla y Banzi fue MEM, 2 % de FBS, 0,18 % de NaHCO₃ y 50 µg gentamicina/ml.

60 El ensayo antiviral de los compuestos de la presente invención se realizó de acuerdo con la referencia Sidwell y Huffman y de forma similar a los ensayos antivirales de rinovirus anteriores. Las lecturas adecuadas del efecto citopático (ECP) se realizaron tras 5 – 6 días para cada uno de estos virus.

c. Determinación de la actividad antiviral *in vitro* de compuestos contra el virus del Nilo occidental (ensayo de inhibición del ECP):

5 Los detalles del ensayo se proporcionan en la referencia Sidwell y Huffman citada anteriormente. El virus del Nilo occidental, aislado de Nueva York derivado de cerebro de cuervo, se obtuvo del Centro para el Control de Enfermedades. Las células Vero se cultivaron y se prepararon tal como se ha descrito anteriormente. El medio de ensayo fue MEM, 1 % de FBS, 0,1 % de NaHCO₃ y 50 µg de gentamicina/ml.

10 El ensayo antiviral de los compuestos de la presente invención se realizó siguiendo los métodos de Sidwell y Huffman que son similares a los usados para el ensayo de la actividad del rinovirus. Las lecturas adecuadas del efecto citopático (ECP) se obtuvieron tras 5 - 6 días.

d. Determinación de la actividad antiviral *in vitro* de los compuestos contra los virus rinovirus, fiebre amarilla, dengue, Banzai y del Nilo occidental (ensayo de captación de rojo neutro)

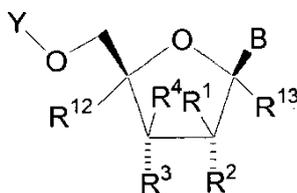
15 Después de realizar los ensayos de inhibición del ECP anteriores se usó un método de detección citopático adicional, que se describe en "Microtiter Assay for Interferon: Microspectrophotometric Quantitation of Cytopathic Effect," Appl. Environ. Microbiol. 31: 35 - 38 (1976). Para leer la placa de ensayos se usó un lector de microplacas Modelo EL309 (Bio-Tek Instruments Inc.). La DE₅₀ y la CD₅₀ se calcularon del siguiente modo.

20 EJEMPLO DE UNA FORMULACIÓN FARMACÉUTICA

25 Como forma de realización específica de una composición oral de un compuesto de la presente invención, 50 mg del compuesto n° 2, preparado como en el Ejemplo 7 anterior, se formula con suficiente lactosa finamente dividida para proporcionar una cantidad total de 580 a 590 mg para cargar una cápsula de gelatina dura de tamaño O.

REIVINDICACIONES

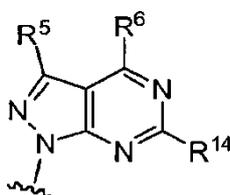
1. El uso de un compuesto de fórmula estructural I que tiene la configuración estereoquímica:



(I)

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para inhibir la polimerasa NS5B del VHC, inhibir la replicación del VHC o tratar la infección del VHC, en la que B es:



10

Y es alquilcarbonilo C₁₋₁₀, P₃O₉H₄, P₂O₆H₃ o P(O)R⁹R¹⁰;

R¹ es hidrógeno, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo o de 1 a 3 átomos de flúor y uno de R² y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R² y R³ se selecciona del grupo que consiste en

15 hidrógeno;

hidroxilo,

halógeno;

alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor,alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con alcoxi C₁₋₃ o de 1 a 3 átomos de flúor,20 alquenilo C₂₋₆,alquilo C₁₋₄,alquilcarbonilo C₁₋₈,

ariloxycarbonilo,

azido,

25 amino,

alquilamino C₁₋₄ ydi(alquil C₁₋₄)amino; o

R² es hidrógeno, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo, de 1 a 3 átomos de flúor, y uno de R¹ y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R¹ y R³ se selecciona del grupo que consiste en

30 hidrógeno;

hidroxilo,

halógeno;

alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor,alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcoxi C₁₋₃, carboxilo o de 1 a 3 átomos de flúor,35 alquenilo C₂₋₆,alquilo C₁₋₄,alquilcarbonilo C₁₋₈,

ariloxycarbonilo,

azido,

40 amino,

alquilamino C₁₋₄ ydi(alquil C₁₋₄)amino; o

R¹ y R² junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un sistema de anillo monocíclico saturado de 3 a 6 miembros que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de O, S y N-alquilo C₀₋₄;

45 R⁴ y R⁶ son cada uno de forma independiente H, OH, SH, NH₂, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, cicloalquilamino C₃₋₆, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ o CF₃;

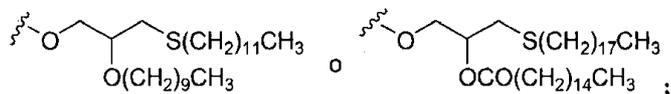
R⁵ es H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, alquilamino C₁₋₄, CF₃ o halógeno;

R¹⁴ es H, CF₃, alquilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, cicloalquilamino C₃₋₆ o

di(alquil C₁₋₄)amino;

R¹² y R¹³ son cada uno de forma independiente hidrógeno, metilo, hidroximetilo o fluorometilo; y R⁹ y R¹⁰ son cada uno de forma independiente hidroxilo, OCH₂CH₂SC(=O)alquilo C₁₋₄, OCH₂O(C=O)Oalquilo C₁₋₄, NHCHMeCO₂Me, OCH(alquilo C₁₋₄)O(C=O)alquilo C₁₋₄,

5



en donde el arilo es fenilo, naftilo o piridilo sustituido opcionalmente con de uno a tres grupos seleccionados de forma independiente de alquilo C₁₋₄, halógeno, ciano, nitro, , CF₃, alcoxi C₁₋₄ y alquiltio C₁₋₄;

10 con las condiciones de que (a) cuando R¹ es hidrógeno, uno de R³ y R⁴ es hidrógeno y R² es flúor, entonces el otro de R³ y R⁴ no es hidrógeno, halógeno, azido, trifluorometilo, alquilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino o alcoxi C₁₋₁₀; (b) cuando R¹ es hidrógeno, uno de R³ y R⁴ es hidrógeno y R² es halógeno, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆ o alquenilo C₂₋₆, entonces el otro de R³ y R⁴ no es hidrógeno, flúor o azido; y (c) cuando R¹ y R³ son hidrógeno y R² es hidroxilo, entonces R⁴ no es hidroxilo.

15

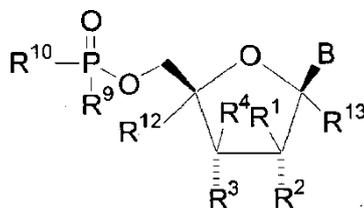
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es:

1-((β-D-ribofuranosil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(3*H*)-ona,
4-Amino-1-(β-D-ribofuranosil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina,
20 4-amino-1-(2-*C*-metil-β-D-ribofuranosil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, o
los correspondientes 5'-trifosfatos, 5'-[bis(isopropiloxicarboniloximetil)]monofosfatos, 5'-mono-(*S*-alcanoil C₁₋₄-2-tioetil)monofosfatos y 5'-bis-(*S*-alcanoil C₁₋₄-2-tioetil)monofosfatos del mismo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

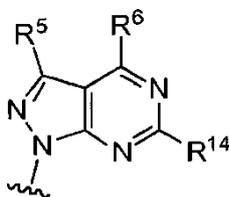
25

3. Un compuesto de la fórmula estructural IV de la configuración estereoquímica indicada:



(IV)

30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
en la que B se selecciona del grupo que consiste en



35 R¹ es hidrógeno, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo o de 1 a 3 átomos de flúor y uno de R² y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R² y R³ se selecciona del grupo que consiste en

hidroxilo,

halógeno;

40 alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor,
alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con alcoxi C₁₋₃ o de 1 a 3 átomos de flúor,
alqueno C₂₋₆,

alquiltio C₁₋₄,

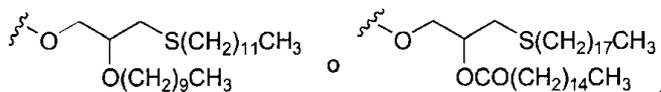
alquilcarbonilo C₁₋₈,

45 ariloxicarbonilo,

azido,

amino,

- alquilamino C₁₋₄ y di(alquil C₁₋₄)amino; o R² es hidrógeno, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido opcionalmente con amino, hidroxilo o de 1 a 3 átomos de flúor y uno de R¹ y R³ es hidroxilo o alcoxi C₁₋₄ y el otro de R¹ y R³ se selecciona del grupo que consiste en
- 5 hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con de 1 a 3 átomos de flúor, alcoxi C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcoxi C₁₋₃, carboxilo o de 1 a 3 átomos de flúor,
- 10 alqueno C₂₋₆, alquino C₁₋₄, alquilcarbonilo C₁₋₈, alilcarbonilo, azido,
- 15 amino, alquilamino C₁₋₄ y di(alquil C₁₋₄)amino; o R¹ y R² junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un sistema de anillo monocíclico saturado de 3 a 6 miembros que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado de O, S y N-alquilo C₀₋₄;
- 20 R⁴ y R⁶ son cada uno de forma independiente H, OH, SH, NH₂, alquilamino C₁₋₄, di(alquil C₁₋₄)amino, cicloalquilamino C₃₋₆, halógeno, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄ o CF₃; R⁵ es H, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, alquilamino C₁₋₄, CF₃ o halógeno; R¹⁴ es H, CF₃, alquilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, cicloalquilamino C₃₋₆ o di(alquil C₁₋₄)amino;
- 25 R¹² y R¹³ son cada uno de forma independiente hidrógeno, metilo, hidroximetilo o fluorometilo; y R⁹ y R¹⁰ son cada uno de forma independiente hidroxilo, OCH₂CH₂SC(=O)alquilo C₁₋₄, OCH₂O(C=O)alquilo C₁₋₄, NHCHMeCO₂Me, OCH(alquilo C₁₋₄)O(C=O)alquilo C₁₋₄,



- 30 en donde el arilo es fenilo, naftilo o piridilo sustituido opcionalmente con de uno a tres grupos seleccionados de forma independiente de alquilo C₁₋₄, halógeno, ciano, nitro, CF₃, alcoxi C₁₋₄ y alquino C₁₋₄, con la condición de que al menos uno de R⁹ y R¹⁰ no es hidroxilo.

- 35 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 que es:

4-amino-1-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina o los correspondientes 5'-trifosfatos;

- 40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 45 6. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

- 50 7. Una combinación de un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo contra el VHC para la administración simultánea, por separado o secuencial.

- 55 8. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho agente activo contra el VHC es ribavirina, levovirina, timosina alfa-1, un inhibidor de la serín proteasa NS3, un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa, interferón-α o interferón-α pegilado, en solitario o en combinación con ribavirina o levovirina.

9. Un compuesto como se define en las reivindicaciones 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la inhibición de la polimerasa NS5B del VHC, en la inhibición de la replicación del VHC o en el tratamiento de la infección por VHC.

- 60 10. Uso de una combinación de un compuesto de fórmula estructural I como se define en las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo contra el VHC para la fabricación de un medicamento para inhibir la polimerasa NS5B del VHC, inhibir la replicación del

VHC o tratar la infección por el VHC.

5 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente activo contra el VHC es ribavirina, levovirina, timosina alfa-1, un inhibidor de la serín proteasa NS3, un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa, interferón- α o interferón- α pegilado, en solitario o en combinación con ribavirina o levovirina.

10 12. Una combinación de un compuesto de fórmula estructural I como se define en las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo contra el VHC para inhibir la polimerasa NS5B del VHC, inhibir la replicación del VHC o tratar la infección por el VHC.

13. Una combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho agente activo contra el VHC es ribavirina, levovirina, timosina alfa-1, un inhibidor de la serín proteasa NS3, un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa, interferón- α , en solitario o en combinación con ribavirina o levovirina.