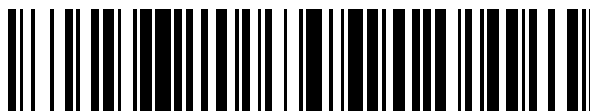


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 831**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/215 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011 E 11833515 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2627334**

54 Título: **Métodos y composiciones para inhibición de polimerasa**

30 Prioridad:

15.10.2010 US 393522 P
01.06.2011 US 201161492054 P

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

29.05.2015

73 Titular/es:

BIOCRIST PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
4505 Emperor Blvd.
Durham, North Carolina 27703, US

72 Inventor/es:

BANTIA, SHANTA;
KOTIAN, PRAVIN, L. y
BABU, YARLAGADDA, S.

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 536 831 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

Métodos y composiciones para inhibición de polimerasa.

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/393,522 presentada el 15 de octubre de 2010 y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/492,054, presentada el 1 de junio de 2011.

Esta invención está limitada al objeto definido en las reivindicaciones; la siguiente descripción está sujeta a esta limitación.

Antecedentes

Las enfermedades virales son responsables tanto por las pandemias globales como por las epidemias estacionales anuales tales como la influenza. Las apariciones pueden ser caracterizadas por virulencia potenciada y pueden ocurrir repentinamente, dando como resultado mortalidades serias. De manera importante, las enfermedades virales no están limitadas a los humanos. Por ejemplo, la influenza también afecta el ganado y las aves, lo cual puede tener un impacto significativo sobre el suministro de alimentos además del incremento del riesgo de transmisión a los humanos. Condiciones de ejemplo relacionadas con infecciones virales incluyen, por ejemplo, influenza, viruela, encefalitis, enfermedad del Nilo Occidental, fiebre amarilla, fiebre del dengue, hepatitis, inmunodeficiencia humana, polio y Coxsackie.

El genoma del virus de la influenza tiene una ARN polimerasa dependiente del ARN, la cual es un complejo heterotrimérico de tres subunidades (PA, PB1 y PB2). La ARN polimerasa cataliza la transcripción y replicación del ARN viral. Debido a que la transcripción y replicación del virus depende de la actividad de la ARN polimerasa, esta enzima ha alcanzado interés como objetivo para el desarrollo de nuevos compuestos antivirales, especialmente en el inicio de la reciente emergencia por virus resistentes a los fármacos.

La US 7,560,434 divulga aza nucleósidos para uso en el tratamiento de infecciones virales. Este documento divulga adicionalmente el ejemplo 1 (en donde A=OH y B=H) y el ejemplo 18 (en donde A=OH y B=NH₂), sin embargo la reivindicación 1 (así como la fórmula en el resumen o en las columnas 3-4) excluye los ejemplos 1 y 18 puesto que en la fórmula de este documento al menos uno de R₂, R₃, R₄ tienen que ser diferente a H cuando el anillo pirrolidina está enlazado a una pirrolopirimidina. Además, no se divulga en dicho documento ninguna actividad antiviral de los ejemplos 1 y 18 de manera clara y no ambigua.

La WO 03/10009 divulga Ib e Ic (compuestos en donde A=OH y B=H o NH₂), potenciadores de la eficacia de los fármacos antivirales.

Resumen de la invención

La invención provee métodos y composiciones para la inhibición de polimerasas de ácidos nucleicos virales, y métodos y composiciones que son útiles para tratar, suprimir y/o evitar infecciones virales en sujetos. Los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, o una composición que comprende un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición o método puede comprender adicionalmente uno o más agentes antivirales adicionales. Los métodos y composiciones son útiles para tratar, suprimir y/o evitar las infecciones virales en sujetos que pueden surgir a partir de la infección por uno o más tipos de virus. Así, los métodos y composiciones son útiles para tratamiento, supresión y/o prevención antiviral de amplio espectro.

La presente invención está basada, en parte, en ciertos descubrimientos los cuales están descritos de manera más completa en la sección de Ejemplos de la presente solicitud. Por ejemplo, la presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que los niveles de título viral en células se redujeron marcadamente por tratamiento con un compuesto de la fórmula I. Así, la presente invención también provee métodos para reducir el título viral en un fluido corporal o célula que comprende poner en contacto dicho fluido o célula con un compuesto de la fórmula I. La presente invención está basada adicionalmente, en parte, en el descubrimiento de que los niveles de título viral en células para varios virus se redujeron marcadamente por tratamiento con un compuesto de la fórmula I, indicando una actividad antiviral de amplio espectro para el compuesto de la fórmula I contra una variedad de cepas virales. Así, la presente invención también provee métodos para reducir el título viral para varios tipos, subtipos y/o cepas de virus en un fluido corporal o célula que comprende poner en contacto dicho fluido o célula con un compuesto de la fórmula I.

En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para inhibir una ARN o ADN polimerasa que comprende poner en contacto la polimerasa con una cantidad inhibitoria efectiva del compuesto de la fórmula I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo *in vivo*.

- 5 En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para tratar un sujeto que sufre de una infección viral de ARN que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el fluido corporal es sangre. En algunas realizaciones el fluido corporal es plasma. En algunas realizaciones, el fluido corporal es suero sanguíneo.

- 10 En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ave. En algunas realizaciones, el sujeto es un porcino o cerdo.

Estas y otras realizaciones de la invención se describen adicionalmente en las siguientes secciones de la solicitud, incluyendo descripción detallada de Ejemplo y Reivindicaciones.

- 15 Todavía otros objetos y ventajas de la invención serán evidentes para las personas experimentadas en la técnica a partir de la presente divulgación, la cual es simplemente ilustrativa y no restrictiva.

Resumen de las figuras

La figura 1 muestra la fosforilación del compuesto 1 en células de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7)

La figura 2 muestra la fosforilación de la ³H adenosina en células Huh-7.

- 20 La figura 3 muestra la fosforilación de ³H compuesto 1 en células Huh-7.

La figura 4 muestra la incorporación en ARN total y ADN genómico de ³H compuesto 1 y ³H adenosina en células Huh-7 después de 24 horas.

La figura 5 muestra los efectos de combinación del compuesto 1 y peramivir (un inhibidor de la neuraminidasa) sobre la influenza *in vitro*.

- 25 La figura 6 muestra el efecto del compuesto 1 (intramuscular) sobre la pérdida de peso en ratones infectados con el virus de influenza H3N2 A/Victoria/3/75.

La figura 7 muestra el efecto del compuesto 1 (oral) en la pérdida de peso en ratones infectados con el virus de la influenza H3N2 A/Victoria/3/75.

- 30 La figura 8 muestra el efecto del compuesto 1 (intraperitoneal, intramuscular y oral) sobre la supervivencia de ratones infectados con el virus del Ébola.

La figura 9 muestra el efecto del compuesto 1 (intraperitoneal, intramuscular y oral) sobre la pérdida de peso en ratones infectados con el virus del Ébola.

La figura 10 muestra el efecto del compuesto 1 (intramuscular y oral) sobre la supervivencia de ratones infectados con el virus del Ébola.

- 35 La figura 11 muestra el efecto del compuesto 1 (intramuscular y oral) sobre la pérdida de peso en ratones infectados con virus del Ébola.

La figura 12 muestra el efecto del compuesto 1 sobre la supervivencia de hámster infectados con el virus de la fiebre amarilla.

- 40 La figura 13 muestra el efecto del compuesto 1 sobre la pérdida de peso en hámster infectados con el virus de la fiebre amarilla.

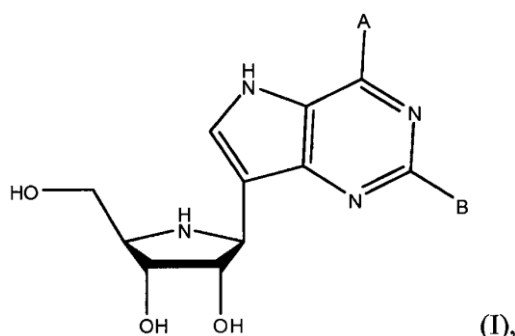
La figura 14 muestra la curva farmacocinética oral del compuesto 1 dosificado a 10 mg/kg medida en ratas.

Descripción detallada

La invención provee métodos y composiciones para la inhibición de polimerasas de ácidos nucleicos virales, tales como ARN y ADN polimerasas, y métodos y composiciones que son útiles para tratar infecciones virales en sujetos. Los métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, o una composición que comprende un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición o método puede comprender opcionalmente uno o más agentes antivirales. Los métodos y composiciones son útiles para tratar, suprimir y/o evitar infecciones virales en sujetos que pueden surgir de la infección con uno o más tipos de virus. Así, los métodos y composiciones son útiles para un tratamiento, supresión y/o prevención antiviral de amplio espectro.

En particular, la presente invención se relaciona con métodos para el tratamiento, supresión y/o prevención de enfermedades o condiciones relativas a infecciones virales que comprende la administración de un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los compuestos de la fórmula I son como sigue:



en donde A es OH o NH₂ y B es H o NH₂.

Así, en algunas realizaciones del compuesto de fórmula (I), A es NH₂.

En algunas realizaciones del compuesto de fórmula (I), B es NH₂.

En alguna realización del compuesto de fórmula (I), A es OH.

En aún algunas realizaciones del compuesto de fórmula (I), B es H.

En todavía algunas realizaciones del compuesto de fórmula (I), A es NH₂ y B es H.

En todavía algunas realizaciones del compuesto de fórmula (I), A es OH y B es NH₂.

En todavía algunas realizaciones del compuesto de fórmula (I), A es NH₂ y B es NH₂.

En todavía algunas realizaciones del compuesto de fórmula (I), A es OH y B es H.

La presente invención está basada, en parte, en ciertos descubrimientos los cuales son descritos con más detalle en la sección de Ejemplos de la presente solicitud. Por ejemplo, la presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que los niveles de título viral en células se redujeron marcadamente por tratamiento con un compuesto de la fórmula I. Así, en algunas realizaciones, la presente invención provee métodos para reducir el título viral en un fluido corporal o célula que comprende poner en contacto dicho fluido o célula con un compuesto de la fórmula I. La presente invención está basada adicionalmente, en parte, en el descubrimiento de que los niveles de título viral en células para varios virus fueron reducidos marcadamente por tratamiento con un compuesto de la fórmula I, indicando así una actividad antiviral de amplio espectro para el compuesto de la fórmula I contra una variedad de cepas virales. Así, la presente invención también provee métodos para reducir el título viral para varios tipos, subtipos y/o cepas de virus en un fluido corporal o célula que comprende poner en contacto dicho fluido o célula con un compuesto de la fórmula I.

Los compuestos de la presente invención se preparan en formas diferentes, tales como sales, hidratos, solvatos, o complejos, y la invención incluye composiciones y métodos que abarcan todas las formas

variables de los compuestos. En algunas realizaciones, los compuestos son preparados como hidratos de sales.

Abreviaturas y definiciones

La abreviatura “PNP” se refiere a la purina nucleósido fosforilasa.

- 5 El término “compuestos de la invención” tal como se utiliza aquí indica un compuesto de fórmula I, y puede incluir sales, formas tautoméricas, hidratos y/o solvatos de los mismos. Los compuestos de la fórmula I también pueden incluir solvatos o hidratos de sales de los mismos.

10 El término “solvato” tal como se utiliza aquí indica un compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde moléculas de un solvente adecuado son incorporadas en la red cristalina. Un solvente adecuado es fisiológicamente tolerable a la dosificación administrada. Ejemplos de solventes adecuados son etanol, agua y similares. Cuando el agua es el solvente, la molécula se denomina como un “hidrato”.

15 Una “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de uno o más de los compuestos descritos aquí, o sales o hidratos farmacéuticamente aceptables del mismo, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

20 El término “sal farmacéuticamente aceptable” pretende incluir sales derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos incluyendo, por ejemplo, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fosfórico, fórmico, acético, láctico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, trifenilacetato, salicílico, cítrico, metanosulfónico, benzenosulfónico, benzoico, malónico, trifluoroacético, tricloroacético, naftaleno-2 sulfónico y otros ácidos. Las formas de sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir también formas en donde la relación de moléculas que comprende la sal no es 1:1. Por ejemplo, la sal puede comprender más de una molécula inorgánica u orgánica por molécula de base, tal como dos moléculas de ácido clorhídrico por molécula de compuesto de fórmula (I). Como otro ejemplo, la sal puede comprender menos de una molécula de ácido inorgánico u orgánico por molécula de base, tal como dos moléculas de compuesto de la fórmula (I) por una molécula de ácido tartárico. Las sales también pueden existir como solvatos o hidratos.

30 El término “ácido” contempla todos los ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ácidos inorgánicos incluyen ácidos minerales tales como ácidos hidroháluricos, tales como ácido bromhídrico y ácido clorhídrico, ácidos sulfúricos, ácidos fosfóricos y ácidos nítricos. Los ácidos orgánicos incluyen todos los ácidos carboxílicos, dicarboxílicos, tricarboxílicos y ácidos grasos alifáticos, alicíclicos y aromáticos farmacéuticamente aceptables. Los ácidos preferidos son ácidos carboxílicos alifáticos C1-C20 de cadena recta o ramificada, saturados o insaturados, los cuales están sustituidos opcionalmente por halógeno o por grupos hidroxilo, o ácidos carboxílicos aromáticos C6-C12. Ejemplos de tales ácidos son ácido carbónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isopropiónico, ácido valérico, alfa hidroxí ácidos, tales como ácido glicólico y ácido láctico, ácido cloroacético, ácido benzoico, ácido metanosulfónico y ácido salicílico. Ejemplos de ácidos dicarboxílicos incluye ácido oxálico, ácido málico, ácido succínico, ácido tartárico y ácido maleico. Un ejemplo de un ácido tricarboxílico es ácido cítrico. Los ácidos grasos incluyen todos los ácidos carboxílicos alifáticos aromáticos saturados o insaturados farmacéuticamente aceptables que tiene de 4 a 24 átomos de carbono. Ejemplos incluyen ácido butírico, ácido isobutírico, ácido sec-butírico, ácido laúrico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido fenil estérico. Otros ácidos incluyen ácido glucónico, ácido glicoheptónico y ácido lactobionico.

45 Tal como se utiliza aquí el término “aproximadamente” se utiliza aquí para indicar aproximadamente, apenas, alrededor, o en la región de. Cuando el término “aproximadamente” se utiliza aquí en conjunción con un rango numérico, modifica ese rango extendiendo sus fronteras por arriba y por debajo de los valores numéricos fijados. En general, el término “aproximadamente” se utiliza aquí para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido con una varianza de 20% por arriba y por abajo (superior o inferior).

50 Una “cantidad efectiva”, “cantidad suficiente” o “cantidad terapéuticamente efectiva” tal como se utilizan aquí es una cantidad de un compuesto que es suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados. Como tal, la cantidad efectiva puede ser suficiente, por ejemplo, para reducir o mejorar la severidad y/o duración de la infección viral, uno o más síntomas de la misma, prevenir el avance de la infección viral, prevenir la recurrencia, desarrollo o aparición de uno o más síntomas asociados con la infección viral, prevenir o reducir la replicación o multiplicación de un virus, prevenir o reducir la producción y/o liberación de una partícula viral, potenciar o de otra manera mejorar los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia. Una cantidad efectiva también incluye la cantidad de compuesto de la fórmula I que evita o sustancialmente atenúa efectos colaterales indeseables.

Tal como se utiliza aquí y como es bien entendido en la técnica, "tratamiento" es una metodología para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o condiciones, disminución del alcance de la enfermedad, un estado de enfermedad estabilizada (esto es, que no empeora), prevención de la expansión de la enfermedad, retardo o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o alivio del estado de la enfermedad y remisión (bien sea parcial o total), sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra un compuesto. Ejemplos no limitantes de tales vehículos farmacéuticos incluyen líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos también pueden ser solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílica coloidal, urea y similares. Además, pueden utilizarse agentes auxiliares, estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes. Otros vehículos farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin; incorporado aquí como referencia en su totalidad.

Los términos "animal", "sujeto" y "paciente" tal como se utilizan aquí incluyen todos los miembros del reino animal incluyendo, pero no limitándose a, mamíferos, animales (por ejemplo, gatos, perros, caballos, cerdos, etc.) y humanos.

20 Descripción

La presente invención provee métodos y composiciones para la inhibición de polimerasas de ácidos nucleicos virales, tales como polimerasas de ADN y/o ARN virales, y métodos y composiciones que son útiles para tratar infecciones virales en sujetos. Los métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición que comprende un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición o método puede comprender opcionalmente uno o más agentes antivirales adicionales. Los métodos y composiciones son útiles para el tratamiento, supresión y/o prevención de infecciones virales en sujetos que pueden surgir de la infección por una o más familias, géneros, subtipos, serotipos o cepas de virus.

Los compuestos de la fórmula I son derivados de la 9-desazaadenina conocidos generalmente como inmutilinas, cuya síntesis esta descrita, por ejemplo, en WO 03/80620, y por Evans et al., in Tetrahedron 2000, 56, 3053 y J. Org. Chem. 2001, 66(17), 5723. La síntesis de estructuras similares está discutida, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,985,848; 6,066,722; 6,228,741 y las publicaciones PCT WO 2003/080620 y 2008/030119. Los derivados de inmutilina han sido estudiados como inhibidores de PNP (véase, Kicska et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 3219-3225, y Kicska et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 3226-3231). También se han estudiado algunas inmutilinas tales como inhibidores de 5'-metiltioadenosin fosforilasa (MTAP) o 5'-metiltioadenosin nucleosidasa (MTAN). Tales mecanismos han sido implicados en el tratamiento de cáncer e infecciones bacterianas (véase, WO 03/080620).

Los compuestos de la fórmula I pueden exhibir propiedades tautoméricas. Así, la presente invención también abarca formas tautoméricas de compuestos de la fórmula I, y mezclas de los mismos. Será evidente adicionalmente que algunos compuestos existen como sales, solvatos y/o hidratos farmacéuticamente aceptables, cada uno de los cuales también está dentro de las realizaciones de la invención.

En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula I existe como una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la forma de sal es aproximadamente una relación 1:1 de ácido y compuestos de la fórmula I. En algunas realizaciones, la forma de sal está en una relación mayor de aproximadamente 1:1 de ácido y compuesto de la fórmula I. En algunas realizaciones, la forma de sal está en una relación de aproximadamente 2:1 de ácido y compuesto de la fórmula I. En algunas realizaciones, la forma de sal existe como un hidrato.

En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula I existe como un hidrato o solvato.

Los compuestos de la divulgación por lo tanto son útiles en el tratamiento y/o prevención de infecciones virales en un anfitrión o sujeto. Los métodos de la invención pueden ser utilizados en el tratamiento y/o prevención de estados o condiciones de enfermedad causados por y/o relacionados con tales infecciones virales. Ejemplos de tales infecciones virales incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, rinovirus, hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza (incluyendo humana, aviar y porcina), lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machuppo, guararito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, bosque de Kyasanur, encefalitis

equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratoria sincicial, Punta Toro, Tacaribe y paquindae.

5 En algunas realizaciones, los compuestos de la invención se utilizan para tratar o prevenir una infección viral asociada con un virus. En algunas realizaciones, la infección viral comprende infección con uno o más tipos de virus. En algunas realizaciones, la infección viral comprende infección por uno o más virus seleccionados del grupo consistente de virus de orthmixoviridae, paramixoviridae, arenaviridae, buniviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae y coronaviridae. En algunas realizaciones, la infección viral comprende infección por uno o más virus seleccionados del grupo consistente de virus adenovirus, rinovirus, hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, 10 Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza (incluyendo humana, aviar y porcina), lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guararito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, bosque de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe y 15 paquindae.

20 En algunas realizaciones, la infección viral comprende infección por uno o más virus seleccionados del grupo consistente de virus de adenovirus, fiebre del dengue, influenza A e influenza B (incluyendo humana, aviar y porcina), Junín, sarampión, parainfluenza, Pichinde, Punta Toro, respiratorio sincicial, rinovirus, fiebre del Valle del Rift, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), Tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo Occidental y fiebre amarilla.

En algunas realizaciones, el virus es Ébola, Marburg, fiebre amarilla, influenza A o influenza B. En algunas realizaciones el virus es Ébola. En algunas realizaciones, el virus es Marburg. En algunas realizaciones, el virus es fiebre amarilla. En algunas realizaciones, el virus es influenza A o influenza B.

25 En algunas realizaciones, el virus es Nilo Occidental o fiebre del dengue. En algunas realizaciones el virus es Nilo Occidental. En algunas realizaciones, el virus es fiebre del dengue.

30 En algunas realizaciones, los compuestos de la invención se utilizan para inhibir la replicación o infectividad de un virus. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención se utilizan para inhibir el crecimiento de células infectadas con un virus. Ejemplos de dichos virus incluyen, pero no se limitan a, virus de las familias orthmixoviridae, paramixoviridae, arenaviridae, buniviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae y coronaviridae. Ejemplos específicos de virus incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, rinovirus, hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza (incluyendo humana, aviar y porcina), lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guararito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, bosque de 35 Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe y paquindae.

40 Así, en algunas realizaciones, el virus es seleccionado del grupo consistente de virus de las familias orthmixoviridae, paramixoviridae, arenaviridae, buniviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae y coronaviridae. En algunas realizaciones, la infección viral comprende un virus seleccionado del grupo consistente de virus de hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza (incluyendo humana, aviar y porcina), lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guararito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, 45 encefalitis Japonesa, bosque de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe y paquindae.

50 En algunas realizaciones, la infección viral comprende un virus seleccionado del grupo consistente de virus de adenovirus, fiebre del dengue, influenza A e influenza B (incluyendo humana, aviar y porcina), Junín, sarampión, parainfluenza, Pichinde, Punta Toro, respiratorio sincicial, rinovirus, fiebre del Valle del Rift, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), Tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo Occidental, y fiebre amarilla.

55 En algunas realizaciones, el virus es Ébola, Marburg, fiebre amarilla, influenza A o influenza B. En algunas realizaciones, el virus es Ébola. En algunas realizaciones, el virus es Marburg. En algunas realizaciones, el virus es fiebre amarilla. En algunas realizaciones, el virus es influenza A o influenza B.

En algunas realizaciones, el virus es Nilo Occidental o fiebre del dengue. En algunas realizaciones el virus es Nilo Occidental. En algunas realizaciones, el virus es fiebre del dengue.

En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para inhibir una ARN o ADN polimerasa viral en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 De acuerdo con el sistema de clasificación de Baltimore, los virus de ARN polimerasa pueden ser clasificados en grupos tales como, por ejemplo, virus de cadena doble, virus de cadena sencilla en sentido positivo, y virus de cadena sencilla en sentido negativo. Las familias de cadena sencilla en sentido positivo incluyen, por ejemplo, coronaviridae, picornaviridae, togaviridae, flaviviridae, y similares. Familias de cadena sencilla en sentido negativo incluyen, por ejemplo, paramixoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, orthomyxoviridae, filoviridae, y similares. Cada una de las familias de virus puede ser clasificada
10 adicionalmente en géneros, especies y serotipo (o subtipo). Otras designaciones para designaciones taxonómicas de los virus están definidas por las guías de clasificación de acuerdo con el International Committee on Taxonomy of Viruses.

15 En algunas realizaciones, la ARN polimerasa es de cadena doble. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa es de cadena sencilla. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa es de cadena sencilla en sentido positivo. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa es de cadena sencilla en sentido negativo.

20 En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención proveen un amplio espectro de inhibición de virus y/o ARN polimerasas de una o más familias, géneros, subtipos, cepas y/o serotipos de virus. En algunas realizaciones, los métodos proveen tratamiento, supresión o prevención en amplio espectro de infecciones a partir de una o más familias, géneros, subtipos, cepas o serotipos de virus. En algunas realizaciones, el amplio espectro abarca más de dos familias, géneros, subtipos, cepas y/o serotipos de virus.

25 En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para inhibir polimerasas virales de una o más familias, géneros, subtipos, serotipos o cepas de virus. En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para tratar, suprimir y/o prevenir una infección viral en donde la infección viral es un resultado de infección con una o más familias, géneros, subtipos, serotipos o cepas de virus.

En algunas realizaciones, las polimerasas virales o virus son de uno o más géneros de virus. En algunas realizaciones, las polimerasas virales o virus son de una o más especies de virus. En algunas realizaciones, las polimerasas virales o virus son seleccionados de uno o más subtipos, o serotipos. En algunas realizaciones, las polimerasas virales o virus son seleccionados de una o más cepas.

30 En algunas realizaciones, la ARN polimerasa viral es seleccionada del grupo consistente de polimerasas de la familias orthomyxoviridae, paramixoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae y coronaviridae. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa viral es seleccionada del grupo consistente de polimerasas de las familias orthomyxoviridae, paramixoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae y coronaviridae. En algunas
35 realizaciones, las ARN polimerasas virales comprenden una polimerasa seleccionada del grupo consistente de virus de hepatitis, virus de inmunodeficiencia, y polimerasa viral de polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza (incluyendo humana, aviar y porcina), lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guanarito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, bosque de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe y paquindae.

45 En algunas realizaciones, la ARN polimerasa viral es seleccionada del grupo consistente de polimerasas de adenovirus, polimerasa viral de fiebre de dengue, influenza A o influenza B (incluyendo humana, aviar y porcina), Junín, sarampión, parainfluenza, Punta Toro, respiratorio sincicial, rinovirus, fiebre del Valle del Rift, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), Tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo Occidental, y fiebre amarilla.

50 En algunas realizaciones, la ARN polimerasa viral es polimerasa viral de Ébola, Marburg, fiebre amarilla, influenza A o influenza B. En algunas realizaciones la ARN polimerasa viral es polimerasa viral de Ébola. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa viral es polimerasa viral de Marburg. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa viral es polimerasa viral de fiebre amarilla. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa viral es polimerasa viral de influenza A o polimerasa viral de influenza B. En algunas realizaciones, la polimerasa viral es polimerasa viral de Nilo Occidental o fiebre del dengue. En algunas realizaciones la polimerasa viral es polimerasa viral de Nilo Occidental. En algunas realizaciones, la
55 polimerasa viral es polimerasa viral de la fiebre del dengue.

En algunas realizaciones, los virus son seleccionados del grupo consistente de las familias orthomyxoviridae, paramixoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae y coronaviridae. En algunas realizaciones, los virus son seleccionados del grupo

- 5 consistente de hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza (incluyendo humana, aviar y porcina), lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guanarito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, bosque de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe y paquindae.
- 10 En algunas realizaciones, los virus son seleccionados del grupo consistente de adenovirus, virus de fiebre del dengue, influenza A e influenza B (incluyendo humana, aviar y porcina), Junín, sarampión, parainfluenza, Pichinde, Punta Toro, respiratoria sincicial, rinovirus, fiebre del Valle del Rift, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), Tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo Occidental y fiebre amarilla.
- 15 En algunas realizaciones, el virus es Ébola, Marburg, fiebre amarilla, influenza A o influenza B. En algunas realizaciones, el virus es Ébola. En algunas realizaciones, el virus es Marburg. En algunas realizaciones, el virus es fiebre amarilla. En algunas realizaciones, el virus es influenza A o influenza B.
- 20 En algunas realizaciones, el virus es Nilo Occidental o fiebre del Dengue. En algunas realizaciones el virus es Nilo Occidental. En algunas realizaciones, el virus es fiebre del dengue.
- El genoma del virus de influenza A tiene una ARN polimerasa dependiente de ARN, la cual cataliza la transcripción y replicación del ARN viral. Debido a que la transcripción y replicación del virus depende de la actividad de la ARN polimerasa, esta enzima a cobrado interés como objetivo para el desarrollo de nuevos compuestos antivirales en la aparición de la reciente emergencia de virus resistentes a fármacos. Los virus pueden desarrollar resistencia a un fármaco durante el tratamiento, disminuyendo así la eficacia del fármaco requiriendo que el sujeto sea tratado con otro fármaco antiviral. Un fármaco o tratamiento que exhibe eficacia simultánea contra un amplio espectro de cepas virales sería por lo tanto útil.
- 25 Además, la composición o método puede comprender uno o más agentes antivirales en combinación con un compuesto de la fórmula I. Ejemplos de tales agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a, Cytovene, Ganciclovir, fosfonoformiato de trisodio, ribavirin, interferón, d4T, ddI, AZT, y amantadina, rimantadina y otros agentes antiinfluenza; Acyclovir y agentes relacionados, Foscarnet y otros agentes antivirales del herpes. Ejemplos no limitantes de inhibidores de la neuraminidasa incluyen laninamivir, oseltamivir, zanamivir y peramivir.
- 30 Se describen compuestos que se relacionan con la inhibición de la polimerasa de la influenza, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,388,002; 7,560,434 y en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. 12/440,697 (publicada como Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20100129317); y 12/398,866 (publicada como Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20090227524). Actualmente, hay un inhibidor de polimerasa de influenza en ensayos clínicos, conocido como T-705 (favipiravir; 6-fluoro-3-hidroxi-2-pirazincarboxamida). El T-705 posee actividad antiviral potente y de amplio espectro contra múltiples cepas de infección por virus de influenza *in vitro* e *in vivo* (Kiso et al., PNAS 2010, 107, 882-887). El T-705 es caracterizado por un mecanismo de acción que es diferente de la mayoría de los fármacos antivirales de la influenza.
- 35 Otra clase de compuestos utilizados como antivirales son los inhibidores de M2 (véase, Pielak, R., Schnell, J., & Chou, J. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (18), 7379-7384. Miembros de ejemplos de esta clase incluyen amantadina y rimantadina.
- 40 Así, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden adicionalmente la administración de uno o más agentes antivirales adicionales.
- 45 En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es seleccionado del grupo consistente de Cytovene, Ganciclovir, fosfonoformiato de trisodio, ribavirin, interferón, d4T, ddI, AZT, y amantadina, rimantadina, T-705 y otros agentes antiinfluenza; Acyclovir y agentes relacionados, Foscarnet y otros agentes antivirales del herpes.
- 50 En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es un agente antiinfluenza. En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es un inhibidor de la neuraminidasa. En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es seleccionado del grupo consistente de laninamivir, oseltamivir, zanamivir y peramivir. En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es paramivir. En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es laninamivir. En algunas realizaciones, el agente antiviral adicional es oseltamivir. En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es zanamivir.
- 55 En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es un inhibidor de M2. En algunas realizaciones, un agente antiviral adicional es seleccionado del grupo consistente de amantadina y rimantadina.

- En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden la administración de dos agentes antivirales adicionales. En algunas realizaciones, los agentes antivirales adicionales son un inhibidor de la neuraminidasa y un inhibidor de M2. En algunas realizaciones, los agentes antivirales adicionales son seleccionados de los grupos consistentes de 1) laninamivir, oseltamivir, zanamivir y peramivir; y 2) amantadina y rimantadina. En algunas realizaciones, los agentes antivirales adicionales son peramivir y rimantadina.
- 5 La presente invención provee métodos para inhibir una ARN o ADN polimerasa viral que comprende poner en contacto la polimerasa con una cantidad inhibidora efectiva del compuesto de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 10 En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para tratar un sujeto que sufre de una infección viral que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.
- En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para suprimir una infección viral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 15 En algunas realizaciones, la presente invención provee un método para tratar un sujeto que sufre de una infección viral de ARN que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.
- En algunas realizaciones, la infección viral comprende infección por uno o más virus.
- 20 En algunas realizaciones, las infecciones virales son infecciones seleccionadas de los virus de las familias orthmixoviridae, paramixoviridae, arenaviridae, buniviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae y coronaviridae, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las infecciones virales son infecciones seleccionadas de virus de hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza (incluyendo humana, aviar y porcina), lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guanarito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, bosque de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe y pachindae, o cualquier combinación de los mismos.
- 25 En algunas realizaciones, la infección viral comprende infección por uno o más virus seleccionados del grupo consistente de virus de adenovirus, fiebre del dengue, influenza A e influenza B (incluyendo humana, aviar y porcina), Junín, sarampión, parainfluenza, Pichinde, Punta Toro, respiratorio sincicial, rinovirus, fiebre del Valle del Rift, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), Tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo Occidental y fiebre amarilla.
- 30 En algunas realizaciones, el virus es Ébola, Marburg, fiebre amarilla, influenza A o influenza B. En algunas realizaciones, el virus es Ébola. En algunas realizaciones, el virus es Marburg. En algunas realizaciones, el virus es fiebre amarilla. En algunas realizaciones, el virus es influenza A o influenza B.
- En algunas realizaciones, el virus es Nilo Occidental o fiebre del Dengue. En algunas realizaciones el virus es Nilo Occidental. En algunas realizaciones, el virus es fiebre del dengue.
- 40 En algunas realizaciones, las infecciones virales son seleccionadas de virus de influenza A, influenza B, PIV, RSV, Junín, Pichinde, fiebre del Valle del Rift, fiebre del dengue, sarampión, fiebre amarilla y SARS-CoV, cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las infecciones virales son infecciones seleccionadas de influenza A y B, subtipos de las mismas, cepas de las mismas o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las infecciones virales son infecciones seleccionadas de Ébola, Marburg, o fiebre amarilla. En algunas realizaciones, la infección viral es Ébola.
- 45 En algunas realizaciones, la infección viral es Marburg. En algunas realizaciones, la infección viral es fiebre amarilla. En algunas realizaciones, la infección viral es Nilo Occidental o fiebre del dengue. En algunas realizaciones la infección viral es Nilo Occidental. En algunas realizaciones, la infección viral es fiebre del dengue.
- 50 En algunas realizaciones, la divulgación provee el uso de composiciones farmacéuticas y/o medicamentos que comprenden el compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos, en un método para tratar una infección viral, y/o un estado de enfermedad y/o una condición causados o relacionados con tal infección viral.
- 55 En algunas realizaciones, el método de tratamiento comprende las etapas de: i) identificar un sujeto que requiere tal tratamiento, ii) proveer un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente

aceptables del mismo, o una composición que comprende un compuesto de fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo; y iii) administrar dicho compuesto o composición en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar la infección viral en el sujeto o para inhibir la actividad de la ADN o ARN polimerasa en un sujeto que requiere de tal tratamiento.

- 5 En algunas realizaciones, la eficacia del tratamiento es el resultado de la inhibición de una ADN o ARN polimerasa viral. En algunas realizaciones, la eficacia del tratamiento es el resultado de inhibir las polimerasas virales de una o más familias de virus.

10 En algunas realizaciones, las polimerasas virales o virus son de uno más géneros de virus. En algunas realizaciones, las polimerasas virales o virus son de una o más especies de virus. En algunas realizaciones, las polimerasas virales o virus son seleccionados de uno o más subtipos, serotipos o cepas.

En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo *in vivo*.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ave. En algunas realizaciones el sujeto es un porcino o cerdo.

- 15 En algunas realizaciones, el fluido corporal es sangre. En algunas realizaciones, el fluido corporal es plasma. En algunas realizaciones, el fluido corporal es suero sanguíneo.

En algunas realizaciones, el compuesto o composición son administrados por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular u oral.

En algunas realizaciones, el compuesto o composición son administrados por vía intravenosa.

En algunas realizaciones, el compuesto o composición son administrados por vía intraperitoneal.

- 20 En algunas realizaciones, el compuesto o composición son administrados por vía intramuscular.

En algunas realizaciones, el compuesto o composición son administrados por vía oral.

- 25 Los métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición que comprende un compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los experimentados en la técnica e incluyen, por ejemplo, adyuvantes, diluyentes, excipientes, agentes de relleno, lubricantes y vehículos. Frecuentemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es químicamente inerte hacia los compuestos activos y es no tóxico bajo las condiciones de uso. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, agua o solución salina, polímeros tales como polietilén glicol, carbohidratos y derivados de los mismos, aceites, ácidos grasos o alcoholes.
- 30 En algunas realizaciones, el vehículo es solución salina o agua. En algunas realizaciones, el vehículo es solución salina. En algunas realizaciones, el vehículo es agua.

- 35 En algunas realizaciones, el método de prevención o supresión de la infección o estado de enfermedad viral comprende las etapas de: i) identificar al sujeto que requiere de tal tratamiento; ii) proveer un compuesto de fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, o una composición que comprende un compuesto de la fórmula I, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo; y iii) administrar dicho compuesto o composición en una cantidad terapéuticamente efectiva para prevenir o suprimir la infección o estado de enfermedad viral en el sujeto o para inhibir la actividad de la ADN o ARN polimerasa en un sujeto que requiere de tal tratamiento.

- 40 Los compuestos de la presente invención son preparados de formas diferentes, tales como sales, hidratos, solvatos, tautómeros o complejos, y la invención incluye métodos que abarcan todas las formas variantes de los compuestos.

- 45 En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula I. Un compuesto de fórmula I también puede ser formulado como una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, sal ácida, y complejos del mismo. La preparación de tales sales puede facilitar el uso farmacológico alterando las características físicas de la gente sin evitar su efecto fisiológico. Ejemplos de alteraciones útiles en las propiedades físicas incluyen, pero no se limitan a, disminuir el punto de fusión para facilitar la administración transmucosa e incrementar la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones más altas del fármaco.

- 50 Los sujetos de la invención son sistemas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, células o tejidos aislados o cultivados, ensayos en sistemas no celulares *in vitro* y animales (por ejemplo, un anfibio, un

ave, un pez, un mamífero, un marsupial, un humano, un animal doméstico tal como, por ejemplo, un gato, perro, mono, ratón o rata; o un animal comercial tal como, por ejemplo, una vaca o un cerdo).

Los compuestos de la invención pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas para administrar a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. De acuerdo con otro aspecto, la presente invención provee una composición farmacéutica que comprende compuestos de la fórmula I en mezcla con un diluyente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no ser nocivo para el receptor del mismo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables empleados aquí pueden ser seleccionados a partir de diversos materiales orgánicos o inorgánicos que son utilizados como materiales para formulaciones farmacéuticas y que se incorporan como agentes analgésicos, reguladores, aglomerantes, desintegrantes, diluyentes, emulsificantes, excipientes, extensores, deslizantes, solubilizantes, estabilizadores, agentes de suspensión, agentes de tonicidad, vehículos y agentes para incremento de la viscosidad. También pueden agregarse aditivos farmacéuticos, tales como antioxidantes, aromáticos, colorantes, agentes de mejora del sabor, conservantes y endulzantes. Ejemplos de vehículos farmacéuticos aceptables incluyen carboximetil celulosa, celulosa cristalina, glicerina, goma arábiga, lactosa, estearato de magnesio, metil celulosa, polvos, solución salina, alginato de sodio, sacarosa, almidón, talco y agua, entre otros. En algunas realizaciones, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o listado en la U.S. Pharmacopeia u otra farmacopea reconocida de manera general para uso en animales, y más particularmente en humanos.

Surfactantes tales como, por ejemplo, detergentes, también son adecuados para uso en las formulaciones. Ejemplos específicos de surfactantes incluyen polivinil pirrolidona, polivinil alcoholes, copolímeros de acetato de vinilo y vinil pirrolidona, polietil glicoles, alcohol bencilico, manitol, glicerol, sorbitol o ésteres polioxietilenados de sorbitano; lecitina o carboximetil celulosa de sodio; o derivados de acrílico, tales como metacrilatos y otros, surfactantes aniónicos, tales como estearatos alcalinos, en particular estearato de sodio, potasio o amonio; estearato de calcio o estearato de trietanolamina; sulfatos de alquilo, en particular lauril sulfato de sodio y cetil sulfato de sodio; dodecil bencenos sulfonato de sodio o dioctil sulfosuccinato de sodio; o ácidos grasos, en particular los derivados de aceite de coco, surfactantes catiónicos, tales como sales de amonio cuaternario solubles en agua de fórmula $N^+R'R''R'''Y$, en la cual los radicales R son radicales hidrocarburo idénticos o diferentes opcionalmente hidroxilados y Y es un anión de un ácido fuerte, tal como aniones haluro, sulfato o sulfonato; el bromuro de cetiltrimetilamonio es uno de los surfactantes catiónicos que pueden ser usado, sales de amina de la fórmula $N^+R'R''R'''$, en la cual los radicales R son radicales hidrocarburo idénticos o diferentes opcionalmente hidroxilados; el clorhidrato de octadecilamina es uno de los surfactantes catiónicos que pueden ser usados, surfactantes no iónicos tales como ésteres polioxietilenados opcionalmente de sorbitano, en particular polisorbato 80, o éteres de alquilo polioxietilenados; estearato de polietilen glicol, derivados polioxietilenados de aceite de castor, ésteres de poliglicerol, alcoholes grasos polioxietilenados, ácidos grasos polioxietilenados o copolímeros de óxido de etileno y de óxido de propileno, surfactantes anfotéricos, tales como lauril compuestos de betaina sustituidos.

Cuando se administran a un sujeto, los compuestos de la fórmula I y los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser estériles. En algunas realizaciones, el agua es un vehículo cuando el compuesto de fórmula I es administrado por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el vehículo es una solución salina cuando el compuesto de la fórmula I es administrado por vía intravenosa. Pueden emplearse soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados pueden incluir también excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, sílica gel, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propilen glicol, polietilen glicol 300, agua, etanol, polisorbato 20 y similares. Las presentes composiciones, si se desea, pueden contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o de agentes reguladores del pH.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son preparadas por métodos bien conocidos en las artes farmacéuticas. Por ejemplo, los compuestos de la fórmula I se asocian con un vehículo y/o diluyente, como una suspensión o solución. Opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios (por ejemplo, reguladores, agentes saborizantes, agentes de superficie activa y similares) también son agregados. La selección del vehículo está determinada por la solubilidad y naturaleza química de los compuestos, ruta escogida de administración y practica farmacéutica estándar. En algunas realizaciones, la formulación comprende un compuesto de fórmula I y agua. En algunas realizaciones, la formulación comprende un compuesto de la fórmula I y solución salina.

Adicionalmente, los compuestos de la presente invención son administrados a un sujeto humano o animal por procedimientos conocidos que incluyen, sin limitación, administración oral, sublingual o bucal, administración parenteral, administración transdérmica, vía inhalación o intranasalmente, por vía vaginal, por vía rectal e intramuscular. Los compuestos de la invención son administrados por vía parenteral, por

inyección epifascial, intracapsular, intracraneal, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, subcutánea o sublingual, o mediante un catéter. En algunas realizaciones, el compuesto es administrado al sujeto a manera de administración intramuscular. En algunas realizaciones, el compuesto es administrado al sujeto mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el compuesto es administrado al sujeto mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, el compuesto es administrado oralmente.

Para administración oral, una formulación de los compuestos de la invención puede ser presentada en cápsulas, tabletas, polvos, gránulos o como una suspensión o solución. Las formulaciones en cápsula pueden ser de gelatina, gel blanda o sólida. Las formulaciones en tabletas y cápsula pueden contener adicionalmente uno o más adyuvantes, aglomerantes, diluyentes, desintegrantes. Excipientes, agentes de relleno o lubricantes, cada uno de los cuales es conocido en la técnica. Ejemplos de tales incluyen carbohidratos tales como lactosa o sacarosa, fosfato dibásico de calcio anhidro, almidón de maíz, manitol, xilitol, celulosa o derivados de la misma, celulosa microcristalina, gelatina, estearatos, dióxido de silicio, talco, glicolato de almidón de sodio, acacia, agentes saborizantes, conservantes, agentes reguladores, desintegrantes y colorantes. Las composiciones administradas oralmente pueden contener uno o más agentes opcionales tales como, por ejemplo, agentes endulzantes tales como fructosa, aspartame o sacarina; agentes saborizantes tales como menta, aceite de gaulteria, o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proveer una preparación farmacéuticamente paladeable.

Para administración parenteral (esto es, administración por inyección a través de una ruta diferente al canal alimentario), los compuestos de la invención pueden ser combinados con una solución acuosa estéril que es isotónica con la sangre del sujeto. Tal formulación es preparada disolviendo un ingrediente activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles, tales como cloruro de sodio, glicina y similares, y que tiene un pH regulado compatible con condiciones fisiológicas, de tal manera que se produzca una solución acuosa, y luego hacer dicha solución acuosa estéril. La formulación puede ser presentada en contenedores unitarios o de dosis múltiples, tales como ampollas o viales sellados. La formulación puede ser administrada por cualquier medio de inyección, incluyendo, sin limitación, epifascial, intracapsular, intracraneal, intracutáneo, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenoso, parenquimatoso, subcutáneo o sublingual o mediante un catéter en el cuerpo del sujeto.

La administración parenteral incluye soluciones con base acuosa y no acuosa. Ejemplos de las cuales incluye, por ejemplo, agua, solución salina, soluciones acuosas de azúcar o alcohólicas de azúcar, alcohólicas (tales como alcohol etílico, isopropanol, glicoles) éteres, aceites, glicéridos, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. En algunas realizaciones, se utiliza agua para administración parenteral. En algunas realizaciones, se utiliza solución salina para administración parenteral. Los aceites para inyección parenteral incluyen aceites de base animal, vegetal, sintética o de petróleo. Ejemplos de azúcares para solución incluyen sacarosa, lactosa, dextrosa, manosa y similares. Ejemplos de aceites incluyen aceite mineral, petrolato, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuete y similares. Ejemplos de ácidos y ésteres grasos incluyen ácido oleico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido isoesteárico, y ésteres de los mismos.

Para administración transdérmica, los compuestos de la invención son combinados con potenciadores de la penetración a través de la piel, tales como propileno glicol, polietileno glicol, isopropanol, etanol, ácido oleico, N-metilpirrolidona y similares, los cuales incrementan la permeabilidad de la piel a los compuestos de la invención y permiten que los compuestos penetren a través de la piel y hacia la corriente sanguínea. El compuesto/composiciones potenciadoras también pueden ser combinados adicionalmente con una sustancia polimérica, tal como etilcelulosa, hidroxipropil celulosa, etileno/vinilacetato, polivinil pirrolidona, y similares, para proveer la composición en forma de gel, los cuales se disuelven en un solvente, tales como cloruro de metileno, se evaporan hasta la viscosidad deseada y luego se aplican a material de soporte para proveer un parche.

En algunas realizaciones, la composición es en forma de dosis unitaria tal como una tableta, cápsula o vial de dosis individual. Dosis unitarias adecuadas, esto es, cantidades terapéuticamente efectivas, pueden ser determinadas durante los ensayos clínicos diseñados apropiadamente para cada una de las condiciones para las cuales se indica la administración de un compuesto escogido y desde luego, variaran dependiendo del punto final clínico deseado.

La presente invención también provee artículos de manufactura para tratar y evitar trastornos, tales como trastornos virales, en un sujeto. Los artículos de manufactura comprenden una composición farmacéutica de los compuestos de la fórmula I, opcionalmente con contenido adicional de al menos un compuesto antiviral, tal como se describe aquí. Los artículos de manufacturas son empacados con indicaciones para diversos trastornos que las composiciones farmacéuticas son capaces de tratar y/o evitar. Por ejemplo, los artículos de manufactura comprenden una dosis unitaria de un compuesto divulgado aquí que es

capaz de tratar o evitar ciertos trastornos, y una indicación de que la dosis unitaria es capaz de tratar o prevenir un cierto trastorno, por ejemplo una infección viral.

De acuerdo con un método de la presente invención, los compuestos de la fórmula I son administrados al sujeto (o son puestos en contacto con las células del sujeto) en una cantidad efectiva para limitar o evitar un descenso en el nivel de virus en el sujeto, particularmente en células del sujeto. Esta cantidad es determinada fácilmente por el técnico experimentado, con base en procedimientos conocidos, incluyendo análisis de curvas de titulación establecidos *in vivo* y métodos y ensayos divulgados aquí. En algunas realizaciones, una cantidad adecuada de los compuestos de la invención efectiva para limitar o evitar un incremento en el nivel de partículas virales en el sujeto varía desde aproximadamente 0.01 mg/kg/día hasta aproximadamente 1000 mg/kg/día, y/o es una cantidad suficiente para alcanzar niveles en plasma que varían desde aproximadamente 300 ng/mL hasta aproximadamente 1000 ng/mL o mayores. En algunas realizaciones, la cantidad de compuestos de la invención varía desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 1000 mg/kg/día. En algunas realizaciones, se anexan desde aproximadamente 0.01 mg/kg/día hasta aproximadamente 500 mg/kg/día. En algunas realizaciones, se administran desde aproximadamente 0.01 mg/kg/día hasta aproximadamente 300 mg/kg/día. En algunas realizaciones, se administran desde aproximadamente 0.01 mg/kg/día hasta aproximadamente 200 mg/kg/día. En algunas realizaciones, se administran desde aproximadamente 0.05 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día. En algunas realizaciones, se administran desde aproximadamente 0.05 mg/kg/día hasta aproximadamente 50 mg/kg/día. En algunas realizaciones, se administran desde aproximadamente 0.05 mg/kg/día hasta aproximadamente 30 mg/kg/día. En algunas realizaciones, se administran desde aproximadamente 0.05 mg/kg/día hasta aproximadamente 10 mg/kg/día.

La dosis precisa para ser empleada en las composiciones también dependerá de la ruta de administración, y de la gravedad de la infección o trastorno, y debería ser decidida de acuerdo con el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los rangos de dosificación efectiva adecuados para administración intramuscular son generalmente de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 1000 mg del compuesto de fórmula I por kilogramo de peso corporal. En realizaciones específicas, la dosis intramuscular es aproximadamente 500 hasta aproximadamente 1000 mg/kg, aproximadamente 300 hasta aproximadamente 500 mg/kg, aproximadamente 200 hasta aproximadamente 300 mg/kg, aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 50 hasta aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 mg/kg (o las dosis equivalentes expresadas por metro cuadrado de área superficial corporal). Alternativamente, un rango de dosis adecuado para administración intravenosa puede ser obtenido utilizando dosis de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 1000 mg, sin ajuste con respecto al peso corporal o área superficial corporal del paciente. Alternativamente, un rango de dosis adecuado para administración intraperitoneal puede ser obtenido utilizando dosis de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 1000 mg, sin ajuste con respecto al peso corporal o área superficial corporal del paciente. Las composiciones orales pueden contener desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 95% en peso de uno o más compuestos de la fórmula I solo o en combinación con otro agente terapéutico. En algunas realizaciones de la invención, los rangos de dosis adecuada para administración oral, intraperitoneal o intramuscular son generalmente de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 1000 mg, preferiblemente de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 mg de compuesto por kilogramo de peso corporal o sus dosis equivalentes expresadas por metros cuadrados de área superficial corporal. En algunas realizaciones la dosis oral, intraperitoneal o intramuscular es aproximadamente 5 hasta aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 50 hasta aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 80 hasta aproximadamente 150 mg/kg, aproximadamente 150 hasta aproximadamente 250 mg/kg, aproximadamente 250 hasta aproximadamente 350 mg/kg, aproximadamente 350 hasta aproximadamente 450 mg/kg, aproximadamente 450 hasta aproximadamente 550 mg/kg, aproximadamente 550 hasta aproximadamente 700 mg/kg, aproximadamente 700 hasta aproximadamente 1000 mg/kg (o las dosis equivalentes expresadas por metro cuadrado de área superficial corporal). En algunas realizaciones, un rango de dosis adecuado para administración oral, intraperitoneal o intramuscular va desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 2000 mg sin ajuste con respecto al peso corporal o área superficial de un paciente. Otras dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de las curvas dosis-respuestas derivadas de sistemas de prueba modelo *in vitro* o animales. Tales modelos y sistemas animales son bien conocidos en la técnica.

En ciertos aspectos, una "cantidad efectiva" de un compuesto en el contexto de una infección viral es una cantidad suficiente para reducir una o más de las siguientes etapas del ciclo de vida de un virus: la instalación de la partícula de virus en una célula, la introducción de la información genética viral en una célula, la expresión de proteínas virales, la producción de nuevas partículas virales y la liberación de partículas virales desde una célula en al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100%. En algunas realizaciones, una cantidad efectiva de un compuesto en el contexto de una infección viral reduce la replicación, multiplicación y esparcimiento de un

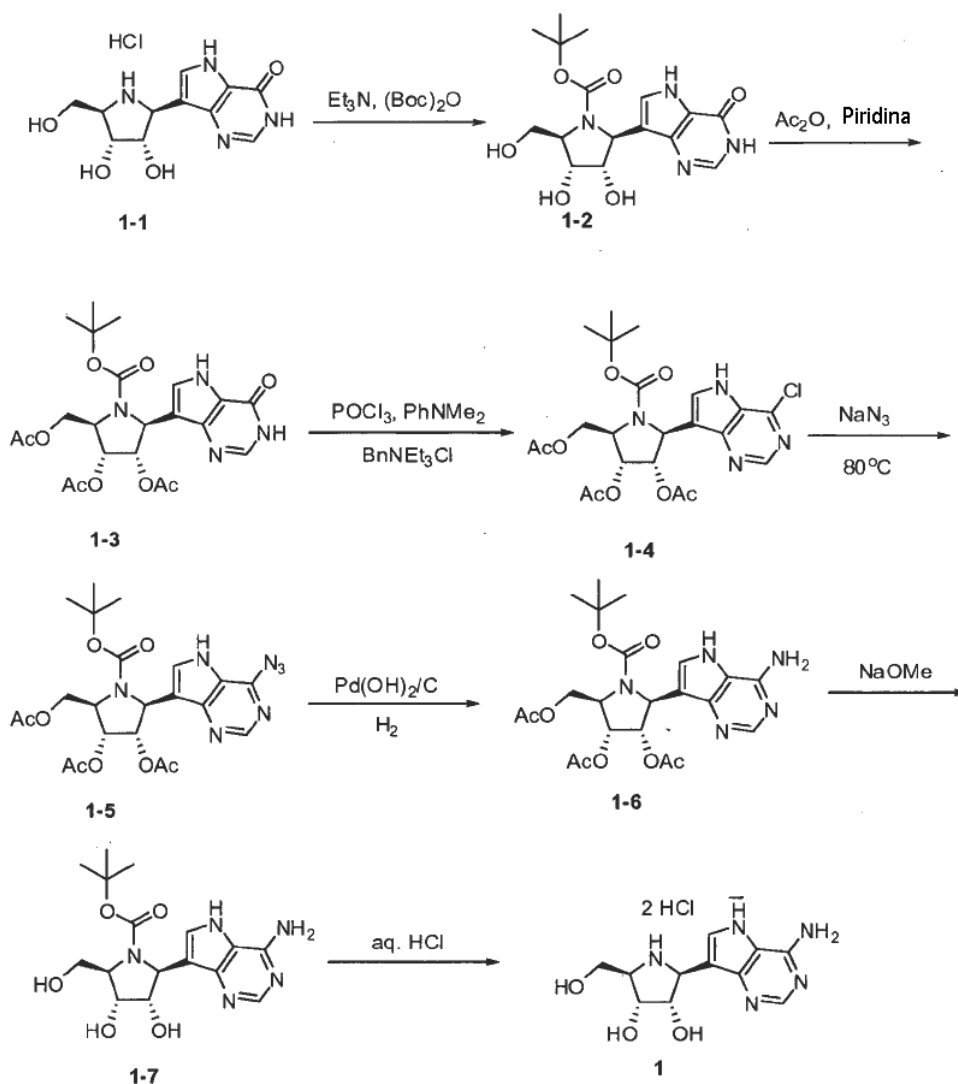
5 virus en al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100%. En algunas realizaciones, una cantidad efectiva de un compuesto en el contexto de una infección viral incrementa la tasa de supervivencia de sujetos infectados en al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100%.

10 Los experimentados en la técnica reconocerán, o serán capaces de establecer utilizando solo experimentación de rutina muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita aquí. Tales equivalentes están previstos para caer dentro del alcance de la presente invención.

La invención es descrita adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplos

15 Ejemplo 1: Síntesis de (2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidina-3,4-diol [compuesto 1 (fórmula I, donde A = NH₂ y B = H) como la sal de HCl].



Etapa-1:

A una solución de 7-((2S,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il)-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4(5H)-ona (1-1) [(preparada de acuerdo con el procedimiento reportado por Evans, Gary B.;

Furneaux, Richard H.; Hutchison, Tracy L.; Kezar, Hollis S.; Morris, Philip E., Jr.; Schramm, Vern L.; Tyler, Peter C in Journal of Organic Chemistry (2001), 66(17), 5723-5730) 115 g, 390 mmol] en agua y metanol (1:1, 2.4 L) se agregó trietilamina (113 mL, 1.12 mol) a temperatura ambiente seguida por (Boc)₂O (227 g, 1.04 mol). La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. El producto sólido fue recolectado por filtración, lavado con agua y secado al vacío para producir (2R,3R,4S,5S)-tert-butilo 3,4-dihidroxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-1-carboxilato (1-2) (100%) en forma de un sólido blanco. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.85 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.73 - 4.53 (m, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.70-3.53 (m, 2H), 1.36 and 1.04 (s, 3H, 6H para rotómeros).

10 Etapa-2:

A una solución de (2R,3R,4S,5S)-tert-butilo 3,4-dihidroxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-1-carboxilato (1-2) en piridina (184 mmol, 2.26 mol) se agregó DMAP (0.79 g, 6.46 mmol) y anhídrido acético (107 mL, 1131 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción fue diluida con cloroformo y lavada con agua, HCl acuoso, agua y bicarbonato de sodio acuoso saturado. La capa orgánica fue secada, filtrada y concentrada al vacío, para obtener (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-3) (150 g), el cual fue lo suficientemente puro para ser utilizado como tal en la siguiente etapa. MS (ES⁺) 493.1 (M+1), 515.1 (M+Na); (ES⁻) 491.4 (M-1).

20 Etapa-3:

A una solución de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-3) (150 g, 300 mmol) en acetonitrilo (660 mL) se agregó cloruro de benciltrietilamonio (137 g, 600 mmol), dimetilaniolina (57 mL, 450 mmol), seguido por POCl₃ (164 mL, 1800 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue calentada a 80°C durante 1 hora. La mezcla de reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y concentrada hasta sequedad bajo vacío. El residuo obtenido fue disuelto en cloroformo y lavado con bicarbonato de sodio acuoso saturado, salmuera, secado, filtrado y concentrado hasta sequedad. El residuo de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-4) fue utilizado como tal en la siguiente etapa sin purificación. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.54 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 5.85 (m, 1H), 5.45 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.49 (m, 2H), 4.07 (m, 1H), 2.07 - 1.99 (m, 9H), 1.19 (2 bs, 9H, rotómeros).

Etapa-4:

A una solución de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-4) (300 mmol) en DMF (540 mL) se agregó azida de sodio (97.5 g, 1500 mmol) y se calentó a 80°C durante la noche. La mezcla de reacción fue concentrada al vacío y el residuo obtenido fue disuelto en cloroformo. La capa de cloroformo fue lavada con agua, secada, filtrada y concentrada al vacío. La purificación por cristalización desde (acetona:hexano = 1:2) generó (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-5). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 13.56-13.00 (bs, 1H), 9.86 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 5.78 (m, 1H), 5.40 (m, 1H), 5.26 - 5.14 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.16 - 4.03 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 6H), 1.14 (bs, 9H); MS (ES⁺) 540.0 (M+1); (ES⁻) 515.9 (M-1).

Etapa-5:

A una solución de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-5) (300 mmol) en metanol (1 L) se agregó Pd(OH)₂ (30 g). La mezcla de reacción fue hidrogenada a (160 psi) durante la noche y filtrada para remover el catalizador a través de celite. El filtrado fue concentrado al vacío para generar (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-6) (113 g). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.47 - 11.92 (m, 1H), 8.84 - 8.03 (m, 3H), 7.90 - 7.68 (m, 1H), 5.70 - 5.51 (m, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.42 (m, 2H), 4.17 - 4.00 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.14 (s, 9H); MS (ES⁺) 492.1 (M+1), (ES⁻) 490.0 (M-1).

Etapa-6:

A una solución de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-6) (111 g, 226 mmol) en metanol (500 mL) se agregó NaOMe (25% p/p en metanol, 4.88g, 22.6 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas y concentrada en vacío para dar (2S,3S,4R,5R)-tert-butilo 2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)pirrolidin-1-carboxilato (1-7). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.40 - 10.73 (bs, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.39 (2s, 1H), 6.90 (s, 2H), 4.83 (m, 2H), 4.45 (m, 2H),

3.96 (s, 2H), 3.58 (m, 3H), 1.31 and 0.99(s, 3H, 6H, rotómeros); MS (ES⁺) 366.0 (M+1), 388.0 (M+Na); (ES⁻) 363.8 (M-1).

Etapa-7:

- 5 A una solución de (2S,3S,4R,5R)-tert-butilo 2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)pirrolidin-1-carboxilato (1-7) se agitó HCl acuoso (160 mL de HCl concentrado y 400 mL de agua) a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se concentró al vacío hasta sequedad. El residuo obtenido fue disuelto en agua, tratado con carbón activado y sometido a reflujo durante 30 minutos. La solución caliente fue filtrada a través de celite y concentrada al vacío para obtener un producto semisólido, el cual fue recristalizado desde agua y etanol para generar (2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol (1) (50 g, rendimiento total para las 7 etapas: 42.6%) en forma de un cristal blanco. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 8.41 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 4.99 (d, J = 9 Hz, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.45 (dd, J = 3, 1.5 Hz, 1H), 3.97 (m, 2H), 3.90 (m, 1H); MS (ES⁺) 266.2 (M+1), (ES⁻) 264.0 (M-1); Análisis: Calculado para C₁₁H₁₅N₅O₃ • 2 HCl: C, 39.07; H, 5.07; N, 20.71; Cl, 20.97; Encontrado: C, 39.09; H, 5.10; N, 20.49; Cl, 20.84.

Ejemplo 2: Síntesis a gran escala de (2S,3S,4R,5R)-2-(4-Amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol [compuesto 1 (fórmula I, en donde A = NH₂ y B = H) en forma de la sal de HCl].

Etapa-1:

- 20 A una suspensión de 7-((2S,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il)-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4(5H)-ona (1-1) [(preparado de acuerdo con el procedimiento reportado por Evans, Gary B.; Furneaux, Richard H.; Hutchison, Tracy L.; Kezar, Hollis S.; Morris, Philip E., Jr.; Schramm, Vern L.; Tyler, Peter C in Journal of Organic Chemistry (2001), 66(17), 5723-5730), 500.0 g, 1.474 mol, 1 eq]] en una mezcla agua:metanol (1:1, 10.4 L) se agregó trietilamina (621 mL, 4.422 mol, 3.0 eq) a temperatura ambiente seguida por (Boc)₂O (987 g, 4.53 mol, 3.1 eq). La mezcla de reacción se convirtió en una solución coloreada clara después de la adición de (Boc)₂O con un ligero incremento de la temperatura interna desde 28°C hasta 33°C. La solución comenzó a mostrar alguna turbidez después de 1 hora de agitación. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. El producto sólido fue recolectado por filtración y lavado con agua (5.0 L), secado a alto vacío a 50°C para generar (2R,3R,4S,5S)-tert-butilo 3,4-dihidroxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-1-carboxilato (1-2) (482 g, 89%).

- ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.92 (s, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.32 (d, J = 22.7 Hz, 1H), 5.73 - 5.20 (m, 1H), 5.05 - 4.91 (m, 1H), 4.87 - 4.76 (m, 1H), 4.74 - 4.49 (m, 1H), 4.33 - 4.17 (m, 1H), 4.09 - 3.86 (m, 2H), 3.64 - 3.48 (m, 2H), 1.39 - 1.00 (m, 9H); MS (ES⁺) 755.1 (2M+Na), (ES⁻) 731.7 (2M-1); Analysis; Calculated for C₁₆H₂₂N₄O₆: C, 52.45; H, 6.05; N, 15.29; Encontrado: C, 52.24; H, 6.02; N, 15.05.

Etapa-2:

- 40 A una suspensión de (2R,3R,4S,5S)-tert-butilo 3,4-dihidroxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-1-carboxilato (1-2) (482 g, 1.32 mole, 1.0 equiv.) en piridina (740 mL, 9.21 mole, 7 equiv.) se agregó DMAP (3.22 g, 26.32 mmol, 0.02 equiv.) y anhídrido acético (435 mL, 4.61 mmol, 3.5 eq) a temperatura ambiente. La temperatura interna comenzó a elevarse con la adición del anhídrido acético por lo cual se llevo a cabo un enfriamiento con un baño de hielo-agua. Tras la adición total del anhídrido la temperatura se elevó a 67°C y luego disminuyó hasta temperatura ambiente. El baño de hielo agua fue retirado después de que la reacción alcanzó 25°C. La suspensión no dio una solución clara sino que se observó una suspensión más ligera. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 14 horas para producir una solución no clara. Una alícuota manipulada mostró que no había más material de partida y dos manchas principales por TLC (9:1 cloroformo: metanol), MS muestra dos picos principales a (493.0, M+1) para producto y producto tetraacetilado (M+1= 535). La mezcla de reacción fue diluida con 3.0 L de cloroformo, agitado durante 10 minutos y luego se agregaron 2.0 L de agua desionizada. Se formó un producto blanco ceroso en la interfase entre las fases acuosa y orgánica. Este producto permaneció en la fase acuosa después de que se hizo la partición. La fase orgánica fue separada y lavada de nuevo con 2.0 L de agua. Los lavados en agua combinados fueron retroextraídos con 1.0 de cloroformo. Las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con HCL 2.0 N acuoso (2 x 1.0 L), agua (2 x 1.0 L), bicarbonato de sodio saturado (2 x 1.0 L) y salmuera (2 x 1.0 L). La capa orgánica fue secada sobre MgSO₄, filtrada y concentrada hasta sequedad bajo vacío y un baño de agua a 50-55°C. el vacío fue conmutado a una bomba de aceite de alto vacío hasta que no se observo más destilado para generar un producto en forma de jarabe denso. El producto fue dejado en la bomba de aceite a alto vacío durante 14 horas para minimizar la piridina residual. Una combinación de espuma sólida que se convirtió en un bonito sólido blanco y se obtuvo un residuo denso de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-

butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-3) (715, 110 % de rendimiento). Este porcentaje refleja la cantidad de compuesto tetraacetilado. El producto fue lo suficientemente puro como para ser utilizado como tal para la siguiente etapa. Se preparó una muestra analítica por purificación de la mezcla utilizando cromatografía de columna instantánea [sílica gel eluyendo con acetato de etilo/metanol 0-100% (9:1) en hexano] para generar (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-3) en forma de un sólido blanco; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ 12.13 (s, 1H, D₂O Intercambiable), 11.98 (s, 1H, D₂O Intercambiable), 7.82 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.37 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.55 (dd, J = 11.3, 6.6 Hz, 1H), 4.34 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.03 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 2.01 (d, J = 12.6 Hz, 9H), 1.23 (dd, J = 39.9, 32.8 Hz, 9H); MS (ES+) 493.0 (M+1); (ES-) 526.7 (M+Cl); Análisis: Calculado para C₂₂H₂₈N₄O₉: C, 53.65; H, 5.73; N, 11.38; Encontrado: C, 53.18; H, 5.89; N, 11.10

Etapa-3:

A una solución de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-dihidro-3H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-3) (622 g, 1.26 mol, 1.0 eq) en acetonitrilo (2.75 L) se agregó cloruro de benciltrietilamonio (575 g, 2.5 mol, 2.0 eq), dimetilalanilina (240 mL, 1.9 mol, 1.5 eq), seguidos por POCl₃ (706 mL, 7.58 mol, 6.0 eq) a temperatura ambiente. Se obtuvo una solución clara coloreada de amarillo pálido. La mezcla de reacción fue calentada lentamente hasta 80°C y mantenida a esta temperatura durante 10 minutos. La TLC en cloroformo:metanol 9:1 muestra que la reacción se completó en >98%. La solución negra homogénea fue enfriada hasta 50.0°C y concentrada bajo vacío (baño de agua a 70-73 °C) para remover el POCl₃; el residuo fue puesto bajo alto vacío en bomba de aceite hasta que no se observó más destilado. El residuo fue disuelto en 3.0 L de cloroformo y lavado rápidamente de manera cuidadosa con bicarbonato de sodio acuoso saturado hasta que se obtuvo un pH neutro. La capa orgánica fue separada y lavada con agua (2 L), salmuera (2 L), secada sobre MgSO₄, filtrada y concentrada al vacío hasta sequedad (baño de agua a 50-53°C). El producto negro de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-4) fue utilizado como tal en la siguiente etapa sin purificación.

Etapa-4:

A una solución de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(tert-butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-4) (622 g, 1.26 mol, 1 eq) en DMF (1.5 L) se agregó azida de sodio (411 g, 6.32 mol, 5 equiv.) y se calentó con agitación a 60°C durante 10 horas tiempo en el cual la reacción terminó (TLC en cloroformo metanol 9:1 y hexano:acetato de etilo 1:1). La reacción fue enfriada a 25°C, vertida en hielo (2 L) y extraída con cloroformo (2 x 1 L). Las capas de cloroformo fueron combinadas lavadas con agua (2 x 2 L), salmuera (2 L), secadas, filtradas y concentradas al vacío (baño de agua a 70-80 °C) para producir una masa negra. La purificación de la masa fue lograda por cromatografía de columna (987 g de masa negra, columna de 8x30 pulgadas, sílica gel completa ½, perfil de elusión hexano:acetato de etilo; 9:1 (40.0L); 7:3 (20.0L); 6:4 (20.0L); 1:1 (20L); 4:6 (20.0L) y 2:8 (20.0L); las fracciones apropiadas fueron reunidas y concentradas al vacío (baño de agua a 50.0 °C) para generar (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-5) (407.05 g, 62.3 % de rendimiento para dos etapas) como un producto similar a la miel de color rojizo denso. Una muestra analítica fue preparada por purificación de la mezcla por cromatografía de columna instantánea [0-100% de acetato de etilo en hexano] para generar (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-5) en forma de un sólido naranja. ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ 13.08 (d, J = 155.6 Hz, 1H, D₂O Intercambiable), 9.86 (s, 1H), 7.61 (d, J = 76.8 Hz, 1H), 5.78 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 5.41 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.55 (dd, J = 11.4, 6.4 Hz, 1H), 4.41 (dd, J = 11.4, 3.9 Hz, 1H), 4.07 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (d, J = 9.9 Hz, 6H), 1.23 (dd, J = 39.8, 32.7 Hz, 9H); MS (ES+) 518.0 (M+1), 540 (M+23); (ES-) 516.4 (M-1); Análisis: Calculado para C₂₂H₂₇N₇O₈: C, 51.06; H, 5.26; N, 18.95 Encontrado: C, 50.97; H, 5.30; N, 18.62.

Etapa-5:

El (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-5) fue reducido en tres lotes diferentes como sigue

Lote 1: A un hidrogenador Parr de 2.0 L, con inserto de teflón se agregó (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolol[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-5) (108.01 g, 300 mmol en metanol, 800 mL), Pd(OH)₂ (21.6 g, 20% p/p).

Lote 2: A un hidrogenador Parr de 2.0 L, con inserto de teflón se agregó (1-5) (140.70 g, 271.9 mmol en metanol, 1.0 L), Pd(OH)₂ (28.14 g, 20% p/p).

Lote 3: A un hidrogenador Parr de 2.0 L, con inserto de teflón se agregó (1-5) (140.7 g, 271.9 mmol en metanol, 1.0 L), Pd(OH)₂ (28.14 g, 20% p/p).

Las mezclas de reacción fueron hidrogenadas a 150 psi durante 15-18 horas. La mezcla de reacción fue filtrada para remover el catalizador a través de celite. El filtrado fue concentrado al vacío (baño de agua a 60-70°C) hasta peso constante para generar un producto coloreado oscuro (2R, 3R, 4S, 5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo [3, 2-d] pirimidin-7-il) 1-(tert-butoxicarbonil) pirrolidin-3, 4-diilo diacetato (1-6) (328.8 g, 89%). El producto fue lo suficientemente puro como para ser utilizado como tal en la siguiente etapa. Se preparó una muestra analítica por purificación de la mezcla utilizando cromatografía de columna instantánea (0-10% de metanol en cloroformo). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.06 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 5.44 (t, J = 4.2 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.56 (dd, J = 11.3, 6.9 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 11.3, 4.2 Hz, 1H), 4.16 - 3.98 (m, 1H), 2.09 - 1.94 (m, 9H), 1.48 - 1.14 (m, 9H); MS (ES+) 492.1 (M+1); (ES-) 526.4 (M+Cl); Análisis: Calculado para C₂₂H₂₉N₅O₈ · 1.25 H₂O: C, 51.41; H, 6.18; N, 13.62; Encontrado: C, 51.24; H, 5.92; N, 13.33.

Etapa-6:

Lote 1. A (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-6) (81.5 g, 165.8 mmol), se agregó metanol anhidro (370 mL) seguido por la adición de NaOMe (metóxido de sodio, solución al 25% en peso en metanol, 4.49 g, 20.76 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente hasta que la TLC (clorofomo:metanol 9:1) muestra que todo el material de partida ha reaccionado.

Lote 2. A (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-6) (117.8 g, 239.6 mmol), se agregó metanol anhidro (530 mL) seguido por la adición de NaOMe (metóxido de sodio, solución al 25% en peso en metanol, 6.58g, 30.45 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente hasta que la TLC (cloroformo:metanol 9:1) muestra que todo el material de partida ha reaccionado;

Lote 3. A (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-3,4-diilo diacetato (1-6) (129.5 g, 263.5 mmol) se agregó metanol anhidro (584 mL) seguido por la adición de NaOMe (metóxido de sodio, solución al 25% en peso en metanol, 6.99g, 32.35 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente hasta que la TLC (cloroformo:metanol 9:1) muestra que todo el material de partida ha reaccionado (7-8 horas).

Las soluciones anteriores fueron concentradas (baño de agua a 65-75 °C) para generar (2S,3S,4R,5R)-tert-butilo 2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) pirrolidin -1-carboxilato (1-7) el cual fue lo suficientemente puro para ser utilizado como tal en la etapa siguiente. Se preparó una muestra analítica por purificación de la mezcla utilizando cromatografía en columna instantánea (0-10% de metanol en cloroformo). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.77 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.82 (s, 3H), 5.04 - 4.91 (m, 1H), 4.87 - 4.74 (m, 1H), 4.56 - 4.35 (m, 2H), 4.04 - 3.90 (m, 2H), 3.72 - 3.63 (m, 1H), 3.59 - 3.41 (m, 1H), 1.15 (2s, 9H); MS (ES+) 366.1 (M+1); (ES-) 400.3 (M+Cl); Análisis: Calculado para C₁₆H₂₃N₅O₅ · 0.25H₂O: C, 51.33; H, 6.46; N, 18.71; Encontrado: C, 51.04; H, 6.43; N, 18.48.

Etapa-7:

El (2S,3S,4R,5R)-tert-butilo 2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil) pirrolidin-1-carboxilato (1-7) fue tratado como sigue en tres lotes.

Lote 1. (1-7) fue disuelto en HCl acuoso (118 mL de HCl concentrado y 293 mL de agua);

Lote 2. (1-7) fue disuelto en HCl acuoso (169 mL de HCl concentrado y 421 mL de agua).

Lote 3. (1-7) fue disuelto en HCl acuoso (186 mL de HCl concentrado y 468 mL de agua).

Las mezclas de reacción fueron agitadas a temperatura ambiente durante 30 minutos (fuerte liberación de CO₂ gaseoso) y luego cada lote fue concentrado al vacío hasta sequedad (80-90°C). Los lotes 2 y 3 fueron reunidos para dar 226 g de un producto amarillo claro húmedo. El lote 1 dio 91.4 g de un producto grisoso oscuro. La cristalización fue hecha como sigue: Para el producto húmedo de los lotes 2 y 3: se agregaron 226 mL de agua al producto y luego se calentó a 50°C punto en el cual se agregó lentamente etanol caliente hasta que se inició la cristalización. La mezcla fue mantenida a 50°C durante 10 minutos y luego se dejó alcanzar los 25°C con agitación fuerte antes de la filtración para dar un polvo coloreado amarillo claro de (2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidin-3,4-diolo (1) (88 g). El lote uno fue purificado de la misma manera para dar 33.0 g de producto coloreado grisoso claro. El rendimiento total es 121.0 g después de secar a 55°C a alto vacío. El líquido madre de la recristalización de los lotes 1 y 2 fue reprocesado para dar 15.0 g del producto en polvo amarillo claro (1). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 14.60 (s, 1H), 13.25 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.84 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.11 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 4.78 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.44 (dd, J = 8.8, 5.0 Hz, 1H), 4.14 - 4.02 (m, 1H), 3.73 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 3.52 (s, 1H); ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 8.33 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 4.90 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.37 (dd, J = 4.8, 3.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.81 (dd, J

= 8.1, 4.5 Hz, 1H); MS (ES+) 266.3 (M+1); Rotación óptica -52.69; (H₂O,C=1.15); MP: 238 °C; Análisis: Calculado para C₁₁H₁₅N₅O₃•2HCl•0.25H₂O: C, 38.55; H, 5.15; Cl, 20.44; N, 20.69; Encontrado: C, 38.67; H, 5.05; Cl, 20.45; N, 20.42.

5 Ejemplo 3: Fosforilación del compuesto 1 (fórmula I, en donde A = NH₂ y B = H) y Estudios de Incorporación de ADN/ARN

Células de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7) fueron incubadas con ³H-compuesto 1 durante 24 horas, seguido por extracción con metanol y análisis por HPLC utilizando columna SAX y un detector radioactivo. La figura 1 muestra la fosforilación del compuesto 1 en células Huh-7, indicando una eficiente fosforilación en células.

10 Las figuras 2-4 muestran que el compuesto 1 es fosforilado pero no incorporado en el ARN o ADN de mamíferos (DP designa difosfato y TP designa trifosfato). La figura 2 muestra fosforilación de adenosina en células Huh-7. La figura 3 muestra fosforilación del compuesto 1 en células Huh-7. La figura 4 muestra la incorporación de ARN total y ADN genómico del compuesto 1 y adenosina en células Huh-7.

15 Ejemplo 4: Efecto del inhibidor de ARN polimerasa viral (formula I, en donde A = NH₂ y B = H: compuesto 1) por replicación del virus de sarampión en células de riñón de mono verde africano.

20 Materiales y métodos: Las células Vero 76 (células de riñón de mono verde Africano) fueron obtenidas del American Type culture collection (ATCC, Manassas, VA). Las células fueron pasada de rutina a medio esencial mínimo (MEM con NaHCO₃ al 0.15%; Hyclone Laboratories, Logan, UT, EEUU) suplementado con suero bovino fetal al 5% (FBS, Hyclone). Al evaluar los compuestos, el suero fue reducido hasta una concentración final de 2.5% y se agregó gentamicina al medio de prueba hasta una concentración final de 50 µg/mL. El virus de sarampión (MV), cepa Chicago, fue obtenido del Centers for Disease Control (Atlanta, GA).

Procedimientos de pruebas antivirales:

Ensayo de inhibición del efecto citopático (ensayo visual)

25 Las células fueron sembradas en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Corning Glass Works, Corning, NY), 0.2 mL/pozo, a una concentración apropiada, y se incubaron durante la noche a 37°C con el fin de establecer una monocapa de células. Cuando la monocapa estuvo establecida, se decantó el medio de cultivo y las diversas diluciones del compuesto de prueba fueron agregadas a cada pozo (3 pozos/dilución, 0.1 mL/pozo). Se agregó medio diluyente del compuesto a las células y los pozos de control de virus (0.1 mL/pozo). El virus, diluido en medio de prueba, fue agregado a los pozos de prueba del compuesto (3 pozos/dilución del compuesto) y a pozos de control del virus (6 pozos) a 0.1 mL/pozo. Se agregó el virus (MOI viral = 0.001) aproximadamente 5 minutos después del compuesto. El medio de prueba sin virus fue agregado a todos los pozos de control de toxicidad (2 pozos/dilución de cada compuesto de prueba) y a los pozos de control de células (6 pozos) a 0.1 mL/pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C a un incubador con atmósfera de CO₂ al 5%, aire al 95% hasta que los pozos de control de virus tuvieron lecturas efecto citopático (CPE) adecuadas (80-100% de destrucción celular). Esto se logró a los 4-11 días después de la exposición a las células, dependiendo del virus. Las células fueron examinadas entonces microscópicamente para CPE, siendo este calificado desde 0 (células normales) a 4 (CPE del 100%, máximo). Las células en los pozos de control de toxicidad fueron observadas microscópicamente en cuanto a cambios morfológicos atribuidos a la citotoxicidad. Esta citotoxicidad (destrucción de células y/o cambio en la morfología) también fue clasificada en 100% de toxicidad, 80% de citotoxicidad, 60% citotoxicidad, 40% citotoxicidad, 20% citotoxicidad, y 0 (células normales). La dosis efectiva al 50% (EC50) y la dosis citotóxica al 50% (IC50) fueron calculados por análisis por regresión de los datos del CPE del virus y los datos de control de toxicidad, respectivamente.

45 El índice selectivo (SI) para cada compuesto probado fue calculado usando la fórmula: SI = CC50 ÷ EC50.

Ensayo de consumo de rojo neutro (NR) de inhibición de CPE

El rojo NR fue escogido como el método de cuantificación por coloración para evaluar los fármacos antivirales con base en los hallazgos de Smee et al (J. Virol. Methods 2002, 106: 71-79). Este ensayo se hizo sobre las mismas placas de prueba de inhibición de CPE descritas más arriba para verificar la actividad inhibidora y la citotoxicidad observada por observación visual. El ensayo de NR fue llevado a cabo utilizando un método modificado de Cavanaugh et al. (Invest. New Drugs 1990, 8:347-354) tal como lo describe Barnard et al. (Antiviral Chem. Chemother. 2001, 12:220-231). En resumen, se retiró el medio de cada pozo de una placa clasificada en cuanto a CPE a partir de un ensayo de inhibición de CPE, se agregó 0.034% de NR a cada pozo de la placa y la placa se incubó durante 2 horas a 37°C en la oscuridad. La solución de NR fue removida entonces a partir de los pozos. Después del enjuague (algunas veces las células se desplazaron de la placa produciendo un descenso erróneo del rojo neutro) y de aspirar hasta sequedad, el colorante remanente fue extraído durante 30 minutos a temperatura

ambiente en la oscuridad a partir de las células utilizando etanol absoluto regulado con regulador de citrato de Sörenson. Las absorbancias a 540 nm/405 nm son leídas en un lector de microplacas (Opsy MR™, Dynex Technologies, Chantilly, VA, EEUU). Los valores de absorbancia fueron expresados como porcentaje de controles no tratados y se calcularon los valores de EC50, CC50 y SI como se describió más arriba.

Ensayo reducción de rendimiento de virus

Los ensayos de reducción de rendimiento de virus fueron ejecutados utilizando el ensayo de dosis infecciosa al 50% de cultivo celular (CCID50) esencialmente tal como se describió previamente (Antimicrob. Agents Chemother. 1992, 3:1837-1842). En resumen, los sobrenadantes de cada pozo fueron diluidos en serie en pozos en triplicado de placas de 96 pozos que contenían células Vero-76. Las placas fueron incubadas durante 6 días y luego verificadas en cuanto a CPE inducido por el virus. La cuantificación de los títulos de rendimiento del virus fue por el método del punto final de Reed y Muench (Am. J. Hyg. 1938, 27:493-498). El valor de EC90 fue calculado utilizando regresión lineal para estimar la concentración necesaria para inhibir el rendimiento de virus en un descenso del 90% o de log10 en el título del virus.

Resultados y discusión

El virus de sarampión fue inhibido potentemente por el compuesto 1 (Tabla 1). Los valores de EC50 contra el virus de sarampión fueron 0.6 y 1.4 µg/mL mediante el ensayo virtual y el ensayo de NR, respectivamente. El compuesto no tuvo ninguna citotoxicidad ni en los ensayos visuales o de NR (IC50 >100). Por lo tanto, los índices selectivos en ambos ensayos sugieren que el compuesto 1 fue altamente activo contra el virus de sarampión (MV). La potente actividad inhibidora contra MV fue confirmada mediante un ensayo de reducción en el rendimiento del virus con un EC90=0.36 µg/mL, que representa una caída de log10 en el virus producido en células infectadas.

Conclusiones

El compuesto 1 demostró una actividad inhibidora potente y selectiva. Mediante el ensayo de reducción de rendimiento de virus, el compuesto 1 también fue un potente inhibidor de MV (EC90 = 0.37 µg/mL). Así, el compuesto 1 se encontró como un potente inhibidor de muchos virus ARN y sugiere que el compuesto 1 garantiza evaluación adicional *in vitro* e *in vivo* como un inhibidor de amplio espectro de virus ARN seleccionados.

Ejemplo 5: Efecto del inhibidor de ARN polimerasa viral (fórmula I, en donde A = NH₂ y B = H: compuesto 1) sobre la replicación de diversos virus ARN.

Materiales y métodos

Células y virus

Se obtuvieron células de riñón de mono verde Africano (MA-104) a partir de Whitaker MA Bioproducts, Walkersville, MD, EEUU. Todas las células Vero (células de riñón de mono verde africano, carcinoma humano de células de laringe (A-549) y células de riñón canino Madin-Darby fueron todos obtenidos a partir del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células A-549 fueron cultivadas en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con NaHCO₃ al 0.15% (Hyclone Laboratories, Logan, UT, EEUU) y con suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone). Las células remanentes fueron pasadas de rutina a medio esencial mínimo (MEM con NaHCO₃ al 0.15%; Hyclone Laboratories, Logan, UT, EEUU) suplementado con suero bovino fetal al 5% (FBS, Hyclone).

Al evaluar los compuestos, el suero fue reducido hasta una concentración final de 2.5%, y se agregó gentamicina al medio de prueba hasta una concentración final de 50 µg/mL. El medio de prueba para ensayos de influenza consistió de MEM sin suero, NaHCO₃ al 0.18%, 20 µg de tripsina/mL, 2.0 µg de EDTA/mL, y 50 µg de gentamicina/mL.

Para la evaluación de toxicidad en células activamente crecientes, se evaluó la citotoxicidad de determinar el número total de células según se refleja mediante un ensayo de consumo de NR después de una exposición de 3 días a varias concentraciones de compuesto. Para cuantificar el crecimiento celular a 72 horas en la presencia o ausencia de fármaco, las placas fueron sembradas con 1 X 10³ células MDCK, y después de 4 horas (se permitió que todas las células se unieran a los pozos de la placa) se expusieron a concentraciones seleccionadas de fármaco en MEM o MEM. Después de 72 horas las placas fueron tratadas como se describió más arriba para el ensayo NR. Los valores de absorbancia fueron expresados como porcentaje de controles no tratados y los valores de CC50 fueron calculados por análisis por regresión.

El virus del dengue 2 (DV-2), cepa Nueva Guinea C, virus respiratorio sincicial (RSV) A2, rinovirus 2 (RV-2), cepa HGP, Tacaribe (TCV), cepa TRVL 11573, virus de encefalitis equina venezolana (VEE), y virus de fiebre amarilla (YFV), cepa 17D comprados todos de American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Todos los virus de influenza, virus de sarampión (MV), cepa Chicago, virus SARS corona (SARS-CoV), cepa Urbani, y virus de Nilo Occidental (WNV), prototípico New York 1999 aislado designado como cepa 996625, fueron obtenidos del Centers for Disease Control (Atlanta, GA). El virus Punta Toro (PTV), cepa Adames, fue obtenido del Dr. Dominique Pifat de la U. S. Army Medical Research Institute for Infectious Diseases, Ft. Detrick (Frederick, MD). El virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV) cepa de vacuna, MP- 12, y el virus Junín (JUNV) cepa de vacuna, Candid 1, fueron provistos amablemente por el Dr. Robert Tesh (World Reference Center for Emerging and Viruses and Arboviruses, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX). El virus Pichinde (PICV), cepa An 4763, fue provisto por el Dr. David Gangemi (Clemson University, Clemson, South Carolina). El virus de Parainfluenza tipo 3 (PIV-3), cepa 14702/5/95, fue obtenido de Jacquelin Boivin (Hopital St. Justin, Montreal, Canadá). El Adenovirus (AV-1) tipo 1, cepa Chicago/95, fue aislado de los lavados traqueales de un paciente pediátrico y fue provisto por M.F. Smaron (Department of Medicine, University of Chicago, Chicago IL).

Procedimiento de pruebas antivirales

Ensayo de inhibición del efecto citopático (ensayo visual)

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Corning Glass Works, Corning, NY), a 0.2 mL/pozo, a la concentración celular apropiada, e incubadas durante la noche a 37°C con el fin de establecer una monocapa celular. Cuando se estableció la monocapa celular, el medio de cultivo fue decantado y las diversas diluciones del compuesto de prueba fueron agregadas a cada pozo (3 pozos/dilución, 0.1 mL/pozo). Se agregó medio diluyente del compuesto a los pozos de células y control de virus (0.1 mL/pozo). El virus, diluido en medio de prueba, fue agregado a los pozos de prueba del compuesto (3 pozos/dilución del compuesto) y a los pozos de control de virus (6 pozos) a 0.1 mL/pozo. El virus (MOI viral = 0.001) fue agregado aproximadamente 5 minutos después del compuesto. El medio de prueba sin virus fue agregado a todos los pozos de control de toxicidad (2 pozos/dilución de cada compuesto de prueba) y a pozos de control celular (6 pozos) a 0.1 mL/pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C en una incubadora humidificada con atmósfera a 5% de CO₂, 95% de aire hasta que los pozos de control de virus tuvieron lecturas de efecto citopático adecuado (CPE) (80-100% de destrucción celular). Esto fue logrado de 4 a 11 días después de la exposición del virus a las células, dependiendo del virus. Las células fueron examinadas entonces microscópicamente en cuanto a CPE, siendo este calificado de 0 (células normales) a 4 (CPE de 100%, máximo). Las células en los pozos de control de toxicidad fueron observadas microscópicamente en cuanto a cambios morfológicos atribuidos a la citotoxicidad. Esta citotoxicidad (destrucción celular y/o cambio en morfología) también fue clasificada a 100% de toxicidad, 80% de citotoxicidad, 60% de citotoxicidad, 40% de citotoxicidad, 20% de citotoxicidad, y 0 (células normales). La dosis efectiva al 50% (EC50) y la dosis citotóxica al 50% (IC50) fueron calculadas mediante análisis por regresión de los datos CPE del virus y los datos de control de toxicidad, respectivamente. El índice selectivo (SI) para cada compuesto probado fue calculado utilizando la fórmula: $SI = CC50 \div EC50$.

40 Ensayo de consumo de rojo neutro (NR) de inhibición de CPE y citotoxicidad del compuesto

El rojo NR fue escogido como el método de cuantificación por coloración para evaluar los fármacos antivirales con base en los hallazgos de Smee et al (supra). Este ensayo fue hecho sobre las mismas placas de prueba de inhibición de CPE descritas anteriormente para verificar la actividad inhibidora y la citotoxicidad observadas por observación visual. El ensayo de NR fue llevado a cabo utilizando un método modificado de Cavanaugh et al. (supra) tal como lo describe Barnard et al. (supra). En resumen, el medio fue retirado de cada pozo de una placa clasificada para CPE a partir de un ensayo de inhibición de CPE, se agregó NR al 0.034% a cada pozo de la placa y la placa fue incubada durante 2 horas a 37°C en la oscuridad. La solución de NR fue retirada entonces de los pozos. Después de enjuagar (algunas veces las células se retiraron de la placa produciendo disminuciones erróneas de rojo neutro) y de aspirar hasta sequedad, el colorante restante fue extraído durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad desde las células utilizando etanol absoluto regulado con regulador de citrato de Sörenson. Las absorbancias a 540 nm/405 nm fueron leídas con un lector de microplacas (Opsys MR™, Dynex Technologies, Chantilly, VA, EEUU). Los valores de absorbancia fueron expresados como porcentaje de controles no tratados y los valores de EC50, CC50 y SI fueron calculados como se describió más arriba.

55

ES 2 536 831 T3

Tabla 1. Efectos de un inhibidor de polimerasa (compuesto 1) sobre la replicación de diversos virus

Virus	Ensayo CPE visual ($\mu\text{g/mL}$)			Ensayo de consumo de rojo neutro ($\mu\text{g/mL}$)		
	EC50	IC50	SI	EC50	IC50	SI
Adenovirus tipo 165089/Chicago (células A-549)	39	>100	>2.6	43	>100	>2.3
Dengue 2 Nueva Guinea C (células Vero)	15	360	25	13	340	26
Influenza A H1N1 CA/04/2009 (H1N1 pandémico)	1.8	210	120	1.8	210	120
Influenza A H3N2 Brisbane/10/2007	1.8	260	140	5.6	440	79
Influenza A H5N1 VN/1203/2004 Híbrido (sobreesqueleto H1N1)	0.63	>1000	>1600	0.99	130	130
Influenza B Florida	1.8	530	290	1.8	50	38
Junín Candid 1 (células Vero)	29	>520	>17	16	240	14
Sarampión	0.6	>100	>180	1.4	>100	>71
Parainfluenza 3 14702 (células MA-104)	14	100	7.1	10	52	52
Pichinde (células Vero)	61	>500	>8.2	28	190	6.7
Punta Toro A2 (células Vero 76)	310	>500	>1.6	>250	250	0
A2 respiratorio sincicial (células MA-104)	>100	>100	0	>100	>100	0
Rinovirus 2 HGP (células HeLa Ohio-1)	57	>100	>1.8	56	>100	>1.8
Fiebre del Valle de Rift MP-12 (células Vero 76)	75	680	9.1	64	420	6.6
SARS-CoV Urbani (células Vero 76)	14	>100	>7.1	16	>100	>6.3
Tacaribe TRVL 11573 (células Vero)	29	320	4.2	2	200	2
Encefalitis equina venezolana TC83 (células Vero 76)	280	610	2.2	170	230	1.2
Nilo Occidental (células Vero)	>100	>100	0	36	>100	2.8
Fiebre amarilla 17D (células Vero 76)	8.3	360	43	8.3	320	38

- 5 Otros virus que fueron considerados como inhibidos significativamente por el compuesto 1 (SI >10) fueron DV-2 (EC50 = 15, 13 µg/mL), JUNV (EC50 = 29, 16 µg/mL), YFV (EC50 = 8.3, 8.3 µg/mL) (Tabla 1). Los siguientes virus fueron inhibidos ligeramente por el compuesto 1 (10 < SI < 3): PIV-3 (EC50 = 7.1, 10 µg/mL), SARS-CoV (EC50 = 14, 16 µg/mL), PICV (EC50 = 61, 28 µg/mL), y RVFV (EC50 = 75, 64 µg/mL). El compuesto 1 fue probado contra un subconjunto de cepas virales de influenza (Tabla 2), y exhibió un amplio espectro de actividad antiinfluenza contra múltiples cepas.

Tabla 2. Espectro amplio de actividad antiinfluenza del compuesto 1

Virus	EC50 (µg/mL)
A/CA/04/2009 (H1N1 Pandémico)	1.8
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	5.6
A/VN/1203/2004 (H5N1)	0.99
B/Florida	1.8
A/CA/27/2007 (H1N1)	0.66
A/NJ/15/2007 (H1N1 – H274Y)	1.39
A/Vic/3/75 (H3N2)	4.0

10 Conclusiones

El compuesto 1 demostró una potente actividad contra todos los virus de influenza probados. El compuesto 1 se encontró como un potente inhibidor de la replicación del virus de la influenza y sugiere que el compuesto 1 es efectivo como un inhibidor de amplio espectro de virus ARN seleccionados, incluyendo todos los virus de la influenza.

15 Ejemplo 6: Actividad antiviral *in vitro* del compuesto 1

La actividad antiviral del compuesto 1 fue establecida *in vitro* en varios virus en cuanto a su actividad antiviral. Los valores de EC50 variaron desde aproximadamente 10 µg/mL hasta aproximadamente >300 µg/mL contra Marburg (filoviridae), Junín Candid 1 (arenaviridae), Pichinde (arenaviridae), Chikungunya 181/25 (togaviridae) y Vaccinia NYC398 (poxviridae).

20 Ejemplo 7: Actividad antiviral sinérgica del compuesto 1 e inhibidor de neuraminidasa en células MDCK

Células de riñón canino de Madin Darby (MDCK) fueron infectadas con virus de influenza H3N2 (A/Victoria/3/75) y tratadas con diversas combinaciones de compuesto 1 y peramivir durante 72 horas. El efecto citopático fue determinado utilizando el ensayo de consumo de colorante rojo neutro. Los datos se muestran en la Tabla 3.

25

30

Tabla 3: Porcentaje de inhibición del efecto citopático en células infectadas con influenza

Compuesto 1	Peramivir		
	0.0 µM	0.0 µM	0.0 µM
0.0 µM	0	3.6 ± 9	10.8 ± 11
1.8 µM	1.6 ± 6.1	22.7 ± 6.1	21.5 ± 4.6
7.8 µM	25.8 ± 4.8	50.4 ± 7.9	70.3 ± 4.9

5 Los datos experimentales fueron evaluados por análisis tridimensional utilizando el programa de software Mac Synergy II™ (Prichard and Shipman, 1990). El software calcula las interacciones aditivas teóricas a partir de las curvas dosis-respuesta de los fármacos individuales. La superficie aditiva calculada, la cual representa las interacciones aditivas predichas, es sustraída entonces de la superficie experimental para revelar regiones de interacciones mayores (sinergia) o menores (antagonismo) que las esperadas. La combinación de peramivir y el compuesto 1 en estudios de cultivos celulares demostró un efecto antiviral sinérgico con un volumen de sinergia igual a 92 unidades uM² % (figura 5).

10 Ejemplo 8: Eficacia de la inyección intramuscular de compuesto 1 (IM) en un modelo de influenza murínica.

15 Ratones Balb/C entre 6-8 semanas fueron adaptados al virus H3N2 (A/Victoria/3/75). Se suministraron dosis de 0, 30, 100 y 300 mg/kg/d qd por inyección intramuscular (IM) durante 5 días empezando 1 hora antes de la inyección. N = 50 animales. Todos los animales fueron seguidos durante 16 días. Los puntos finales incluyeron letalidad, número de días promedio hasta la muerte y pérdida de peso. Los efectos son mostrados en la figura 6.

Los resultados del compuesto 1 (IM) sobre el virus del modelo de influenza en ratón se muestran también en la Tabla 4. El compuesto 1 administrado por vía IM mejora la supervivencia y pérdida de peso en ratones infectados con el virus de la influenza.

20 Tabla 4: Compuesto 1 (IM) en virus de modelo de influenza en ratón – H3N2 A/Vic/3/75

Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg/d)	Número de muertes	Días promedio hasta muerte (Promedio ± SEM)	Cambio de peso promedio (gramos ± SEM) Día 8
Vehículo, no infectado	0	0	>16	0.58 ± 0.23
Vehículo, infectado	0	7/15	10.3 ± 0.3	-4.98 ± 0.14
Compuesto 1	30	10/10*	>16	-3.27 ± 0.37**
Compuesto 1	100	10/10*	>16	0.78 ± 0.17**
Compuesto 1	300	10/10*	>16	0.60 ± 0.17**

*P<0.001 en comparación con el grupo infectado con vehículo (prueba de rango logarítmico)

**P<0.001 en comparación con grupo infectado con vehículo (prueba t)

Ejemplo 9: Eficacia de la administración oral del compuesto 1 en modelo de influenza murínico.

5 R ratones Balb/C entre 6-8 semanas de edad fueron adaptados al virus H3N2 (A/Victoria/3/75). Se suministraron oralmente dosis de 0, 30, 100 y 300 mg/kg/d qd y 100 mg/kg/d oralmente. N = 60 animales. Todos los animales fueron seguidos durante 16 días. Los puntos finales incluyeron letalidad, días promedio hasta la muerte y pérdida de peso. Los efectos del compuesto 1 administrado oralmente sobre la pérdida de peso en ratones infectados con el virus de influenza H3N2 A/Vic/3/75 se muestran en la figura 7.

10 Los resultados de la administración oral del compuesto 1 en el virus de modelo de influenza de ratón se muestran también en la Tabla 5. El compuesto 1 suministrado por vía oral mejora la supervivencia y la pérdida de peso en ratones infectados con el virus de la influenza.

Tabla 5: Compuesto 1 (oral) en virus de modelo de influenza de ratón – H3N2 A/Vic/3/75

Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg/d)	Supervivencia/total	Días promedio hasta muerte (Promedio ± SEM)	Cambio de peso promedio (gramos ± SEM) Día 9
Vehículo, no infectado	0	0	>16	1.36 ± 0.96
Vehículo, infectado	0	7/15	10.5 ± 0.3	-3.74 ± 0.23
Compuesto 1	30	10/10*	>16	-1.58 ± 0.32**
Compuesto 1	100	10/10*	>16	1.03 ± 0.22**
Compuesto 1	100 (bid)	10/10*	>16	0.01 ± 0.27**
Compuesto 1	300	10/10*	>16	0.66 ± 0.23**

*P<0.001 en comparación con el grupo infectado con vehículo (prueba de rango logarítmico)

**P<0.001 en comparación con grupo infectado con vehículo (prueba t)

Ejemplo 10: Estudios farmacocinéticos en ratones

15 R ratones hembra Balb/C (N = 30) fueron dosificados oralmente con el compuesto 1 a 100 mg/kg. Los ratones fueron sangrados a través del seno retroorbital a t = 0.17, 0.5, 1.0, 3, 6 y 24 (5 ratones en cada punto del tiempo), la sangre se centrifugó y el plasma fue almacenado a -80°C. Los niveles de fármaco en plasma fueron medidos a través de análisis por LC/MS/MS.

Los niveles en plasma del ratón para el compuesto 1 después de la administración oral se muestran en la Tabla 6.

20

25

Tabla 6: Niveles en plasma de compuesto 1 en ratones después de la administración oral

Punto en el tiempo (hr)	Niveles de fármaco en plasma (ng/mL) (promedio \pm SEM)
0.17	607.1 \pm 61.0
0.5	910.0 \pm 121.9
1	341.6 \pm 121.9
3	89.7 \pm 8.5
5	94.2 \pm 6.4
24	50.5 \pm 8.9

Ejemplo 11: Estudio de profilaxis en ratón de virus de Ébola.

5 El compuesto 1 fue administrado por vía i.p., i.m., y oralmente (300 mg/kg/día, BID) a ratones C57Bl/6 de 8-12 semanas de edad (N = 10 por grupo, 4 grupos – un grupo tratado con solución salina y 3 tratados con el fármaco). Ocho días de tratamiento comenzando 4 horas antes de la infección. La infección con el virus de Ébola adaptado para ratón (Zaire) fue administrada intraperitonealmente. La mortalidad y el peso fueron monitorizados durante 14 días postinfección.

10 El porcentaje de supervivencia de los ratones está indicado en la figura 8. Los ratones tratados con solución salina infectados con el virus del Ébola murieron todos en el día 8. Todos los ratones tratados por vía intraperitoneal o intramuscular con el compuesto 1 sobrevivieron al punto final del estudio (día 14). El ochenta por ciento de los ratones tratados oralmente con el compuesto 1 sobrevivieron en el punto final del estudio (día 14).

15 El cambio en peso del ratón está indicado en la figura 9. Los ratones tratados con solución salina infectados con el virus del Ébola exhibieron pérdida de peso global hasta el día 8 (todos los ratones de control murieron en el día 8). Los ratones tratados por vía intraperitoneal o intramuscular con el compuesto 1 retenían más del 95% del peso de partida en el día 12. Los ratones tratados oralmente con el compuesto 1 retenían más del 80% del peso de partida en el día 12. Todos los ratones tratados con fármaco continuaron ganado peso después del día 12.

20 Ejemplo 12: Estudio de profilaxis en ratón con virus de Ébola.

25 El compuesto 1 fue administrado por vía i.m. y oralmente a ratones C57Bl/6 de 8-12 semanas de edad. Los sujetos de estudio fueron divididos en 6 grupos (N = 10 por grupo). El grupo 1 fue un control con solución salina, el grupo 2 fue dosificado con 150 mg/kg del compuesto 1 (PO, BID); el grupo 3 fue dosificado con 250 mg/kg de compuesto 1 (PO, BID); el grupo 4 fue dosificado con 150 mg/kg de compuesto 1 (IM, BID). El grupo 5 fueron ratones no infectados tratados con solución salina (PO, BID), y el grupo 6 fueron ratones no infectados tratados con 250 mg/kg de compuesto 1 (PO, BID). El tratamiento fue durante nueve días, comenzando 4 horas antes de la infección. La administración del virus de Ébola adaptado para ratones (Zaire) fue administrada por vía intraperitoneal a 1,000 pfu. La mortalidad y el peso fueron monitorizados durante 14 días postinfección.

30 El porcentaje de supervivencia de los ratones está indicado en la figura 10. Los ratones tratados con solución salina infectados con el virus del Ébola murieron todos en el día 8. Todos los ratones tratados por vía intramuscular con el compuesto 1 sobrevivieron al punto final del estudio, indicando que la dosificación por vía IM del compuesto 1 fue completamente protectora. El ochenta por ciento o más de los ratones tratados oralmente con el compuesto 1 sobrevivieron al punto final del estudio.

35 El cambio de peso de los ratones está indicado en la figura 11. Los ratones tratados con solución salina infectados con el virus del Ébola exhibieron una pérdida de peso global hasta el día 7 (todos los ratones de control murieron en el día 8). Los ratones tratados por vía intramuscular con el compuesto 1 exhibieron una ganancia de peso similar al grupo de control no infectado en el día 11. Los ratones tratados oralmente

con el compuesto 1 exhibieron pérdida de peso reversible, y retenían más del 100% del peso de partida en el día 11.

Ejemplo 13: Virus de fiebre amarilla (YFV) Estudio de ventana de tiempo en hámster dorado.

5 El virus de fiebre amarilla (cepa Jiménez) fue inyectado por vía IP a hámster dorados sirios hembra (99 g) a 20 CCID₅₀ por hámster (~ 6.25 x LD₅₀). Los grupos fueron divididos como sigue: 1) el compuesto 1 fue administrado comenzando -4h (N = 15); 2) el compuesto 1 administrado comenzando un dpi (días postinfección) (N = 10); 3) el compuesto 1 administrado comenzando 2 dpi (N = 10); 4) el compuesto 1 administrado 3 dpi (N = 10); 5) el compuesto 1 administrado 4 dpi (N = 10); 6) ribavirin administrado comenzando -4h (N = 10); 7) vehículo de solución salina comenzando -4h (N = 16); 8) hámsteres no infectados recibieron la administración del compuesto 1 comenzando -4h (N = 3); 9) hámsteres no infectados recibieron la administración de vehículo de solución salina comenzando -4h (N = 3); y 10) controles normales no tratados, no infectados (N = 3). La dosis de tratamiento fue de 100 mg/kg IP, BID durante 7 días. Los puntos finales del estudio fueron mortalidad a los 21 días, peso medido en los días 0, 3, 5, y 6; títulos de virus en suero e hígado (día 4, compuesto 1 -4h, y vehículo a -4h), y ALT y AST en el día 6.

20 El estudio mostró una supervivencia potenciada para el compuesto 1 con tratamiento retardado en comparación con el placebo (figura 12). La supervivencia de los hámsteres infectados con YFV y tratados con el compuesto 1 dos veces al día durante 7 días comenzando con diversos tiempos después de la administración del virus está indicada (**P<0.001, **P<0.1, en comparación con el placebo). La tasa de supervivencia fue de 100% para el compuesto 1 comenzando preinfección, y el tratamiento retardado hasta 3 días postinfección. La tasa de supervivencia fue de 80% para el compuesto 1 comenzando 4 días postinfección, indicando un mejoramiento significativo con respecto al placebo en grupos con tratamiento retardado. En contraste, el ribavirin proveyó 90% de supervivencia comenzando preinfección y el vehículo proveyó 12.5% de supervivencia comenzando preinfección. La mayoría de las muertes ocurrieron durante los 10 días después de la infección. Los animales sobrevivientes sufrieron readministración con YFV a los 21 días postinfección.

30 El cambio de peso de los hámsteres está indicado en la figura 13. Los hámsteres infectados con YFV y tratados con el compuesto 1 preinfección hasta 4 días postinfección mostraron ganancia de peso con respecto al placebo y ribavirin administrado preinfección. Se muestra el porcentaje de cambio de peso de los hámsteres infectados con YFV y tratados con el compuesto 1 dos veces al día durante 7 días comenzando diversas veces antes y después de la administración del virus.

Ejemplo 14: Biodisponibilidad oral del compuesto 1 en ratas.

El compuesto 1 fue dosificado a 10 mg/kg, PO en ratas. La curva farmacocinética que mide la concentración del compuesto 1 en el plasma de la rata hasta 6 horas se muestra en la figura 14.

35 Ejemplo 15: Estudio de virus Marburg para el compuesto 1.

40 El compuesto 1 fue dosificado por vía intramuscular en ratones BALB/c de 10-12 semanas de edad que recibieron administración (por vía intraperitoneal) con 1000 pfu de MARV-Ravn adaptado para ratón. El estudio fue dividido en 10 grupos (N=10 por grupo). Los regímenes de dosificación, rutas y dosis se muestran en la Tabla 7. El compuesto 1 fue disuelto en solución salina al 0.9% antes de la administración, y se monitorizaron la salud y el peso durante 14 días postinfección.

Tabla 7: Diseño de estudio para profilaxis y tratamiento con compuesto 1 para infección por Marburg

Grupo	N	Tratamiento	Compuesto 1 Dosis (mg/kg)	Compuesto 1 Dosis (mg/kg/d)	Ruta	Régimen*
1	10	0.9% solución salina	-	-	IM	BID; Días 0-8 PI
2	10	Compuesto 1	150	300	IM	BID; Días 0-8 PI
3	10	Compuesto 1	50	100	IM	BID; Días 0-8 PI
4	10	Compuesto 1	15	30	IM	BID; Días 0-8 PI
5	10	Compuesto 1	5	10	IM	BID; Días 0-8 PI
6	10	Compuesto 1	150	300	IM	BID; + 4h, Días 1-8 PI
7	10	Compuesto 1	150	300	IM	BID; Días 1-8 PI
8	10	Compuesto 1	150	300	IM	BID; Días 2-8 PI
9	10	Compuesto 1	150	300	IM	BID; Días 3-8 PI
10	10	Compuesto 1	150	300	IM	BID; Días 4-8 PI

*Día 0 de tratamiento iniciado 4 horas antes de la infección, excepto para el grupo 6. El tratamiento del grupo 6 iniciado 4 horas postinfección en el día 0.
PI = postinfección

El porcentaje de supervivencia para los 10 grupos en este estudio hasta el día 12 está incluido en la Tabla 8. La tasa de supervivencia para ratones tratados con vehículo solamente (solución salina al 0.9%) fue 60% en el día 7 y 30% en los días 8-12. El compuesto 1 demostró incrementar la supervivencia a al menos 90% en el día 7, y al menos a 80% en los días 8-12 en todas las dosis.

5

Tabla 8: Porcentaje de tasa de supervivencia para profilaxis y tratamiento con compuesto 1 para infección por Marburg

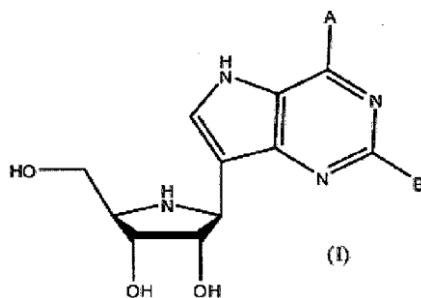
Grupo	Tratamiento	Porcentaje de supervivencia													
		Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	
1	Solución salina al 0.9%	100	100	100	100	100	100	100	100	60	30	30	30	30	
2	Compuesto 1 (150 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

ES 2 536 831 T3

3	Compuesto 1 (50 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	Compuesto 1 (15 mg/kg)	100	100	100	100	100	90	90	90	90	90	90	90	90
5	Compuesto 1 (5 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	Compuesto 1 (150 mg/kg) + 4 h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	90
7	Compuesto 1 (150 mg/kg) + 24 h	100	100	100	90	90	90	90	80	80	80	80	80	80
8	Compuesto 1 (150 mg/kg) + 48 h	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	90	90	90
9	Compuesto 1 (150 mg/kg) + 72 h	100	100	100	100	90	90	90	90	80	80	80	80	80
10	Compuesto 1 (150 mg/kg) + 96 h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	90

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I



5 en donde A es NH₂; y B es H, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para uso en el tratamiento, supresión o prevención de una infección viral.

2. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha infección viral comprende infección con uno o más virus.

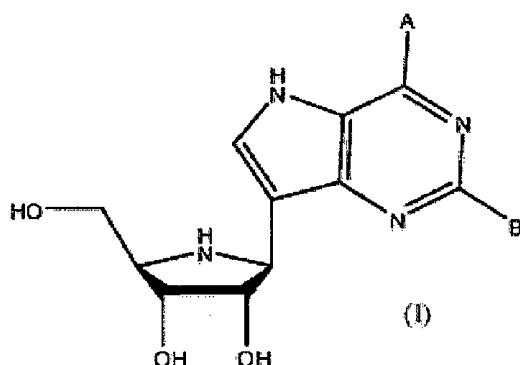
3. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la infección viral comprende un virus seleccionado del grupo consistente de las familias orthmyxoviridae, paramyxoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae, y coronavirusidae; o

15 en donde la infección viral es seleccionada del grupo consistente de virus de adenovirus, rinovirus, hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza A, influenza B, lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guararito, hantavirus, fiebre del valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, Bosque de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincial, Punta Toro, Tacaribe y paquindae; o

20 en donde la infección viral es seleccionada del grupo consistente de virus de adenovirus, fiebre del dengue, influenza A, influenza B, Junín, sarampión, parainfluenza, Pichinde, punta toro, respiratorio sincial, rinovirus, fiebre del valle del Rift, SARS-CoV, tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo Occidental, y fiebre amarilla; o

en donde la infección viral es seleccionada del grupo consistente de virus de Ébola, fiebre amarilla, Marburg, influenza A e influenza B.

25 4. Un compuesto de fórmula I:



30 en donde A es NH₂; y B es H; o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para uso en la inhibición de una ARN polimerasa viral seleccionada del grupo consistente de polimerasas virales de orthmyxoviridae, paramyxoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae, y coronavirusidae.

5. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde se inhibe una segunda ARN polimerasa viral.

6. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la segunda ARN polimerasa viral es seleccionada del grupo consistente de las polimerasas virales de orthmyxoviridae, paramyxoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, flaviviridae, filoviridae, togaviridae, picornaviridae, y coronaviridae.
- 5 7. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde la segunda ARN polimerasa viral es seleccionada del grupo consistente de polimerasas virales de adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza, respiratorio sincicial, rinovirus, Junín, Pichinde, fiebre del Valle del Rift, fiebre del dengue, sarampión, fiebre amarilla, tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo occidental y SARS-CoV.
- 10 8. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde la ARN polimerasa viral es seleccionada del grupo consistente de polimerasas virales de adenovirus, rinovirus, hepatitis, virus de inmunodeficiencia, polio, sarampión, Ébola, Coxsackie, Rhino, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, fiebre del dengue, influenza A, influenza B, lassa, coriomeningitis linfocítica, Junín, machupo, guanarito, hantavirus, fiebre del valle del Rift, La Crosse, encefalitis de California, Crimea-Congo, Marburg, encefalitis Japonesa, Bosque de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), parainfluenza, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe y paquindae; o
- 15 en donde la ARN polimerasa viral es una polimerasa seleccionada del grupo consistente de polimerasas virales de adenovirus, fiebre del dengue, influenza A, influenza B, Junín, sarampión, parainfluenza, Pichinde, punta toro, respiratorio sincicial, rinovirus, fiebre del valle del Rift, SARS-CoV, tacaribe, encefalitis equina venezolana, Nilo Occidental, y fiebre amarilla; o
- 20 en donde la ARN polimerasa viral es una polimerasa seleccionada del grupo consistente de polimerasas virales de Ébola, fiebre amarilla, Marburg, influenza A e influenza B.
9. El compuesto para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente la administración de un agente antiviral adicional.
- 25 10. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el agente antiviral adicional es seleccionado del grupo consistente de laninamivir, oseltamivir, zanamivir y peramivir.
11. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde el agente antiviral adicional es peramivir.
12. El compuesto para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el compuesto es para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular u oral.

30

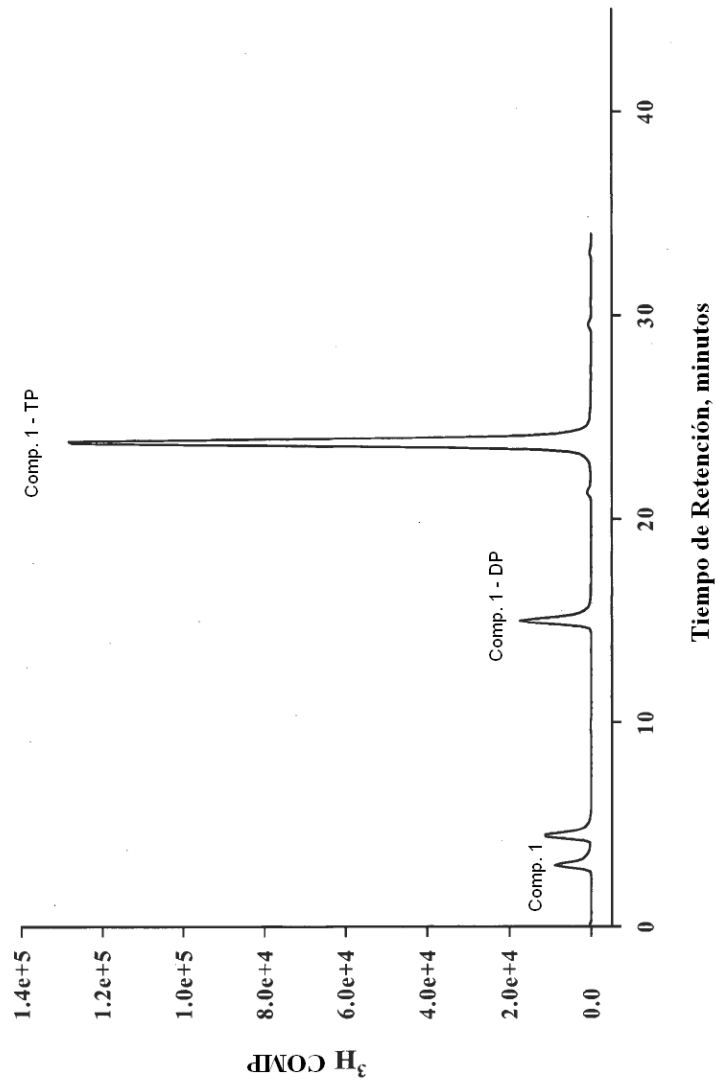


Figura 1

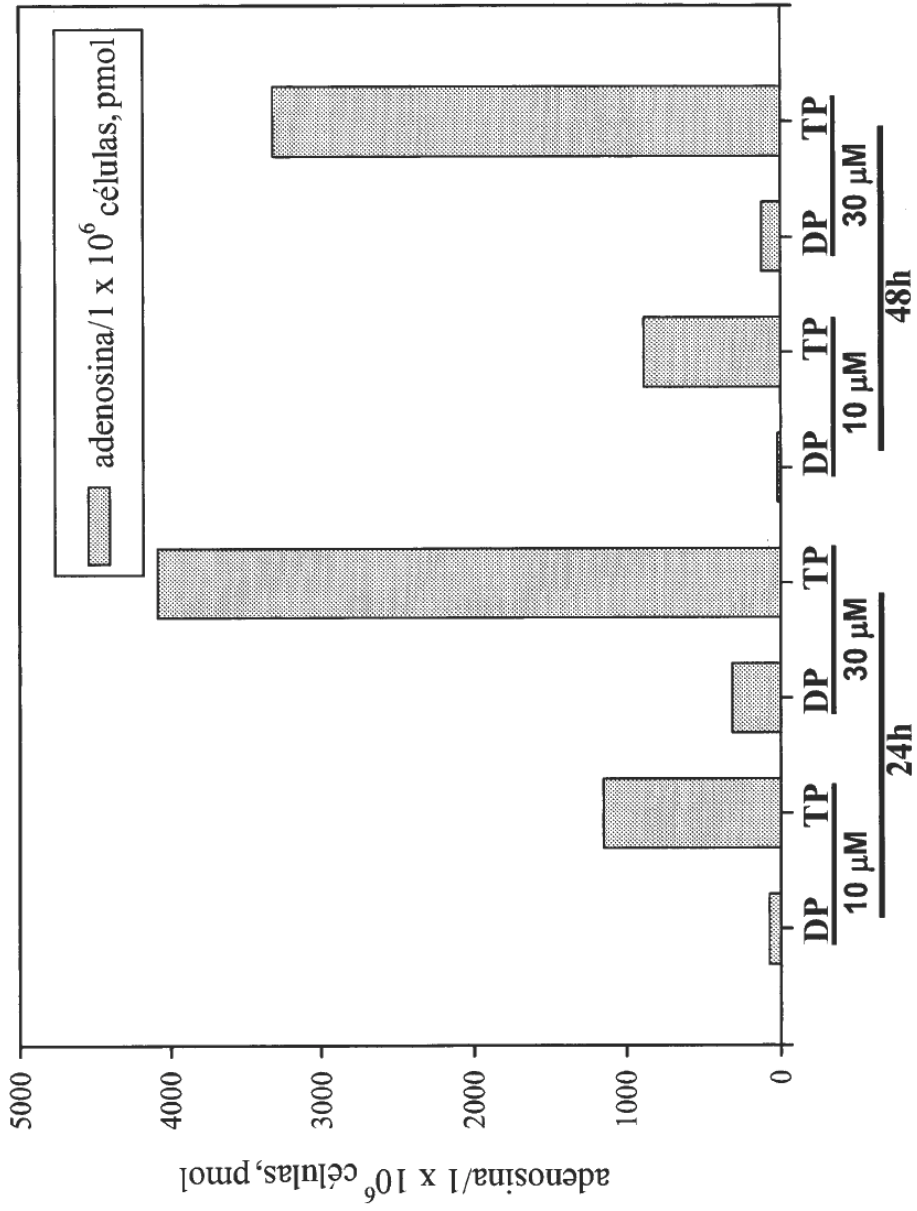


Figura 2

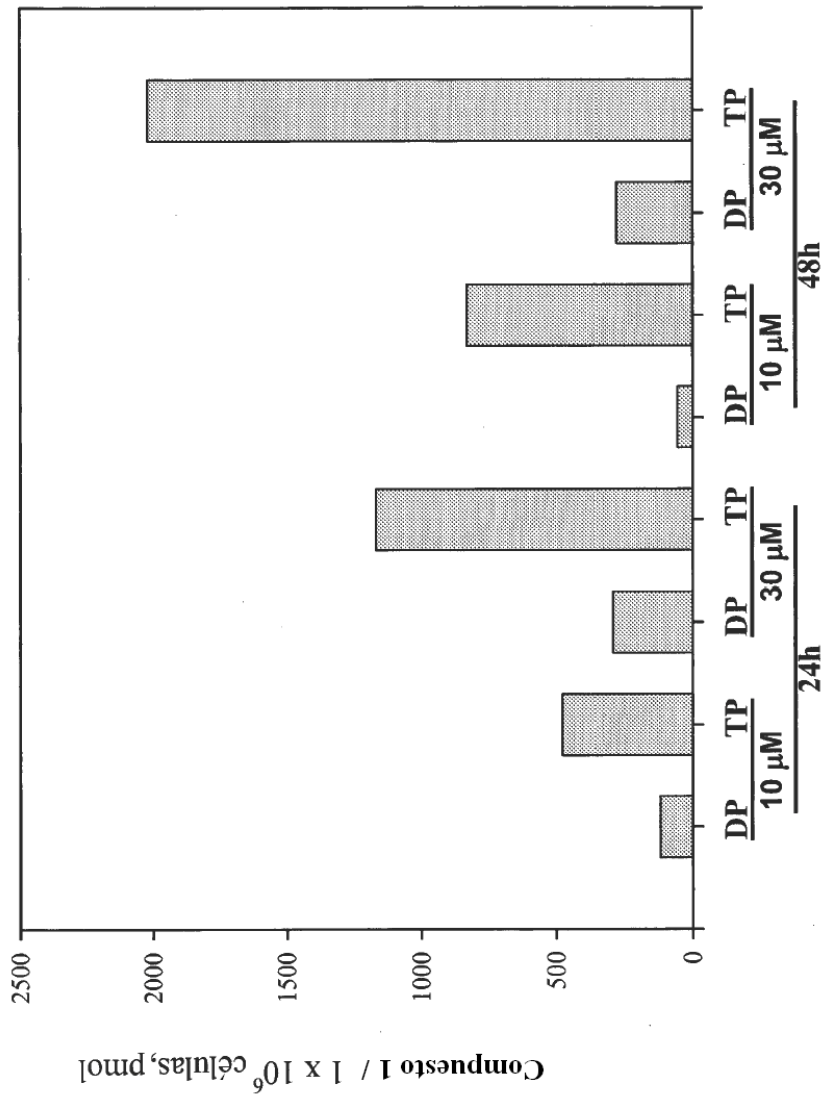


Figura 3

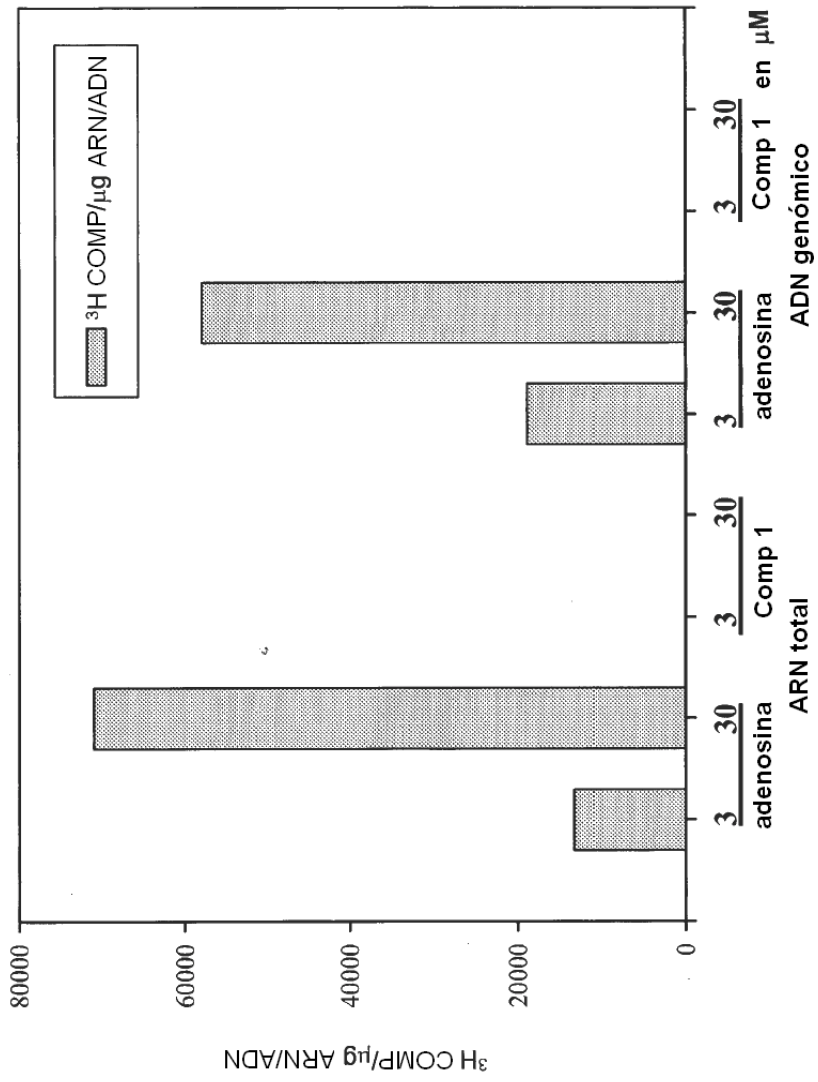


Figura 4

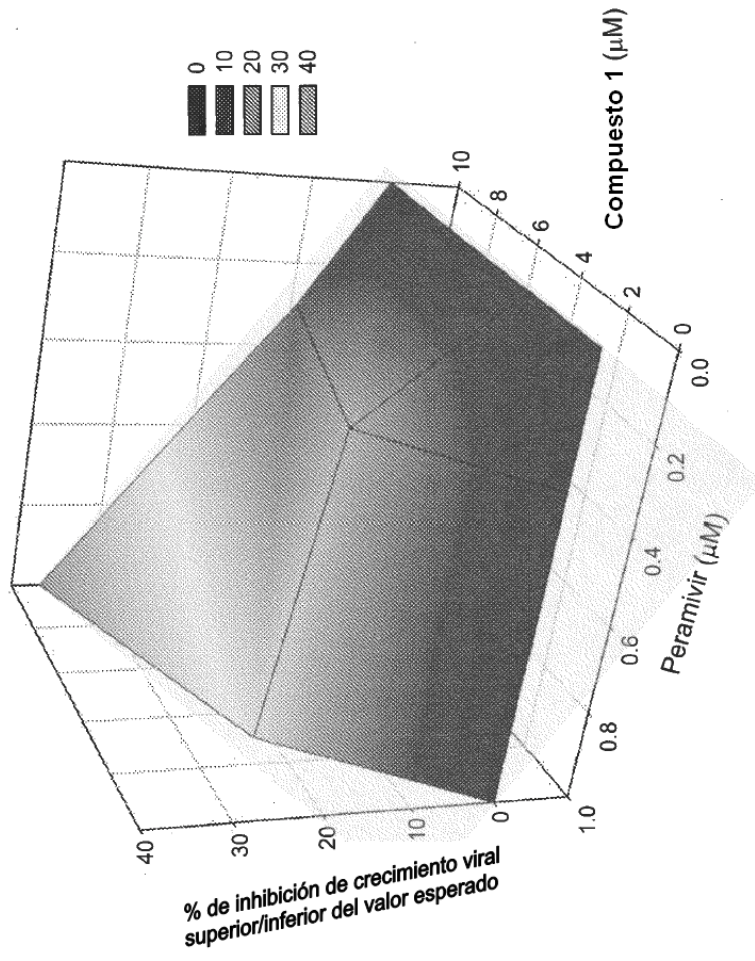


Figura 5

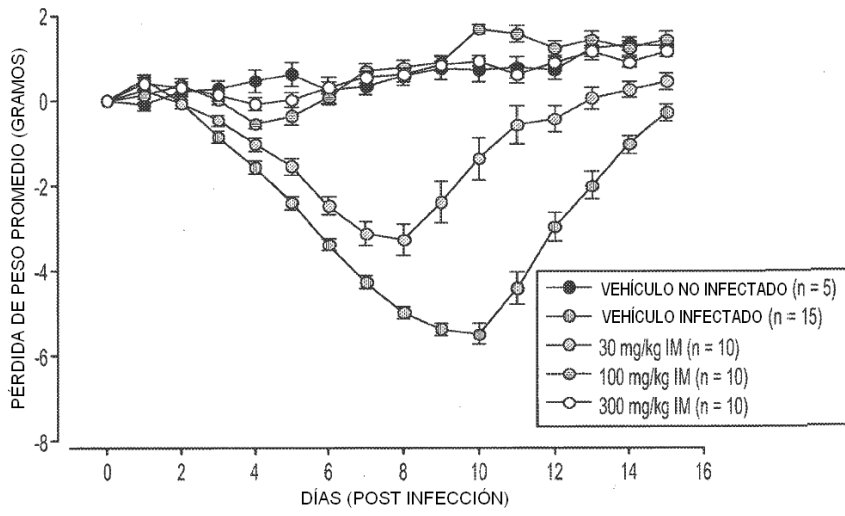


FIG. 6

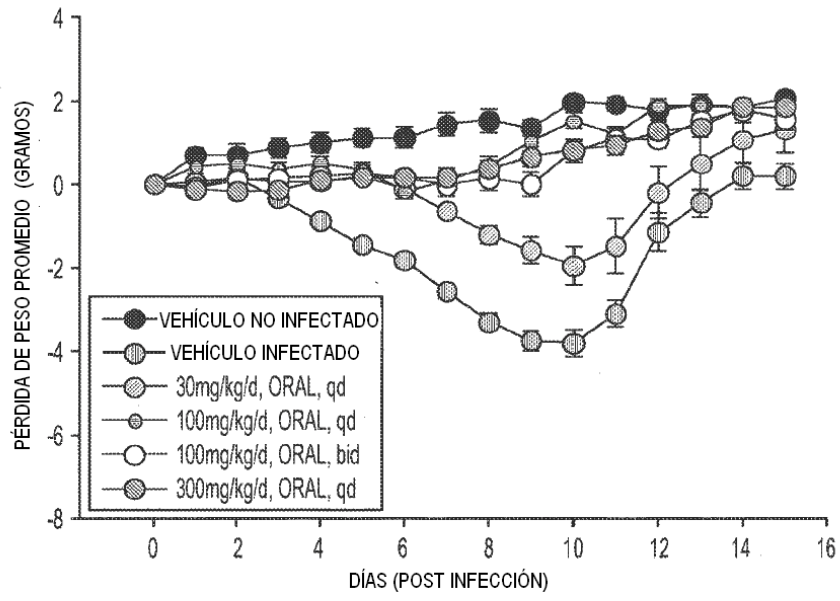


FIG. 7

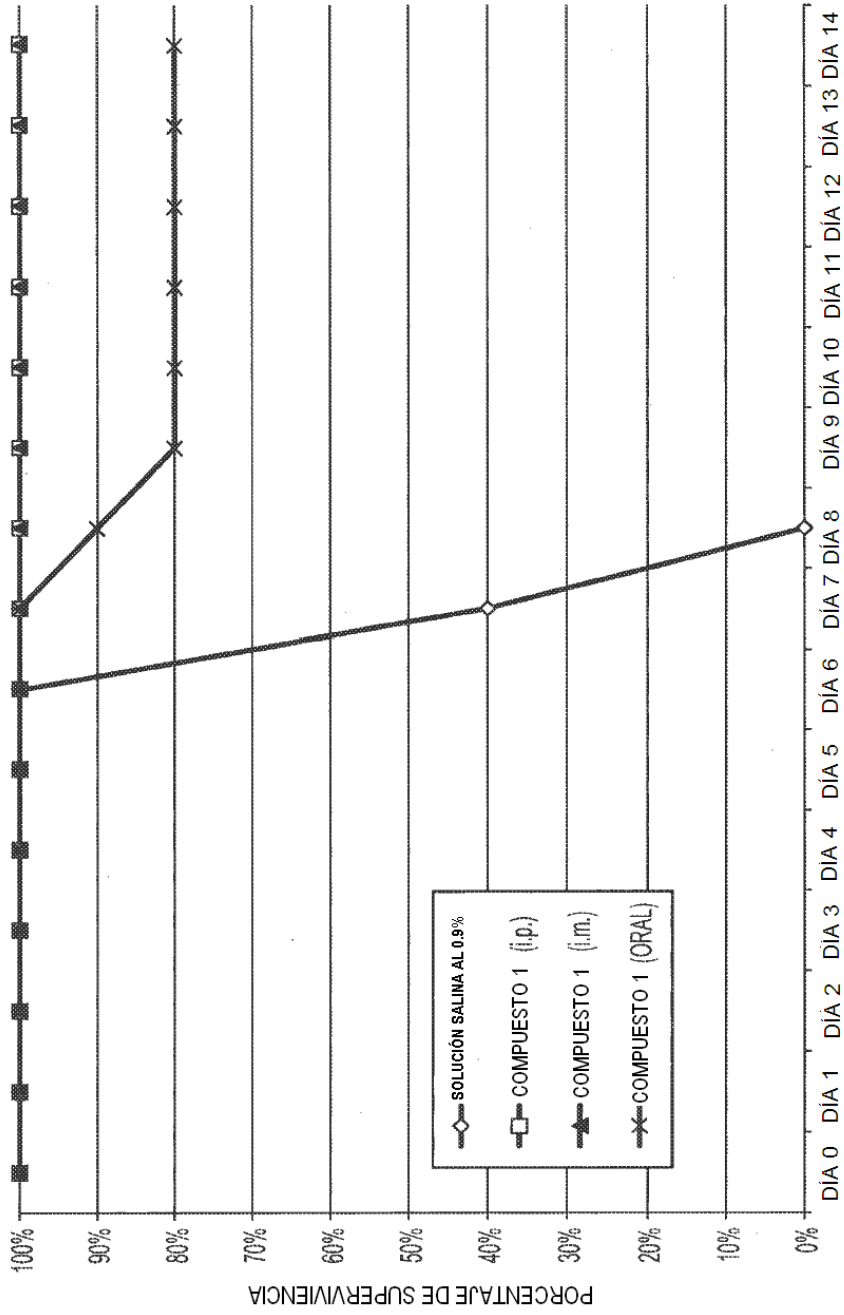


FIG. 8

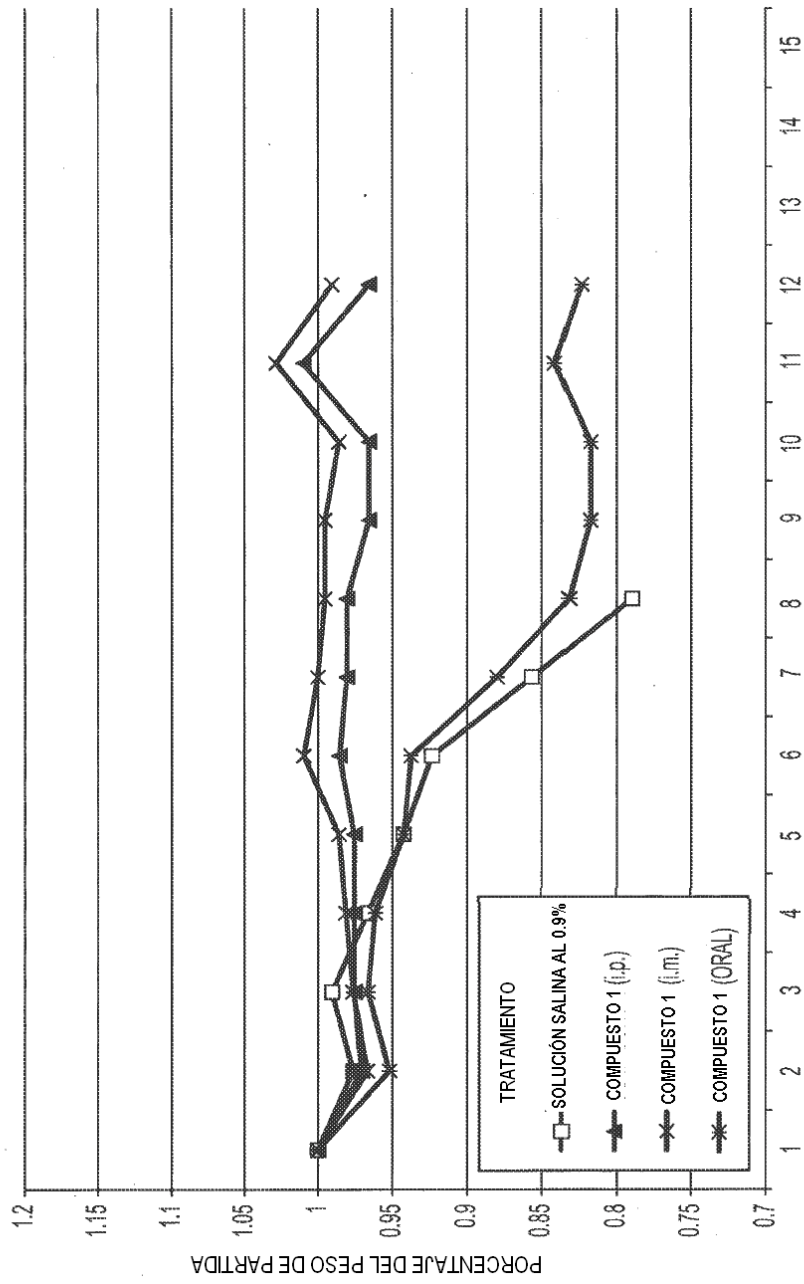


FIG. 9

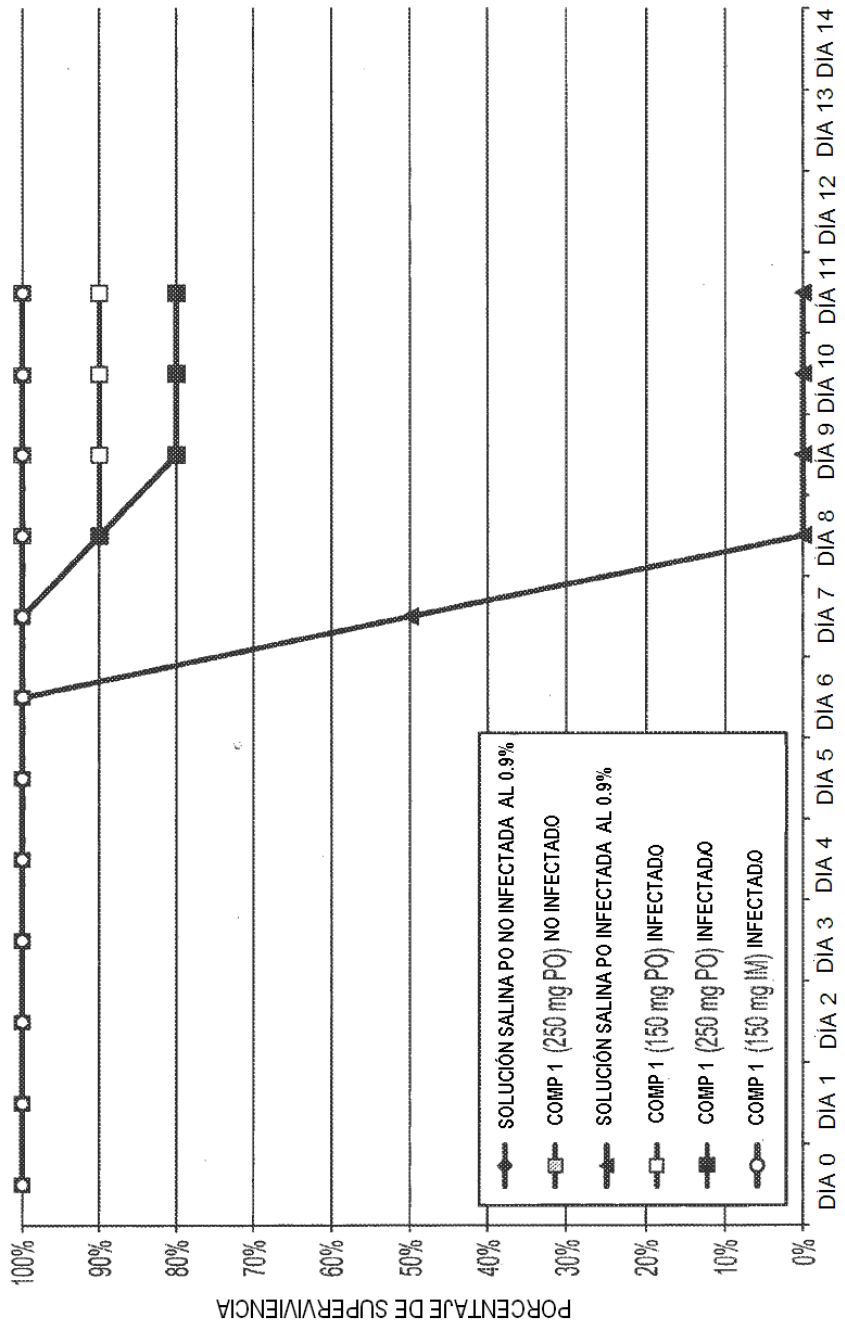


FIG. 10

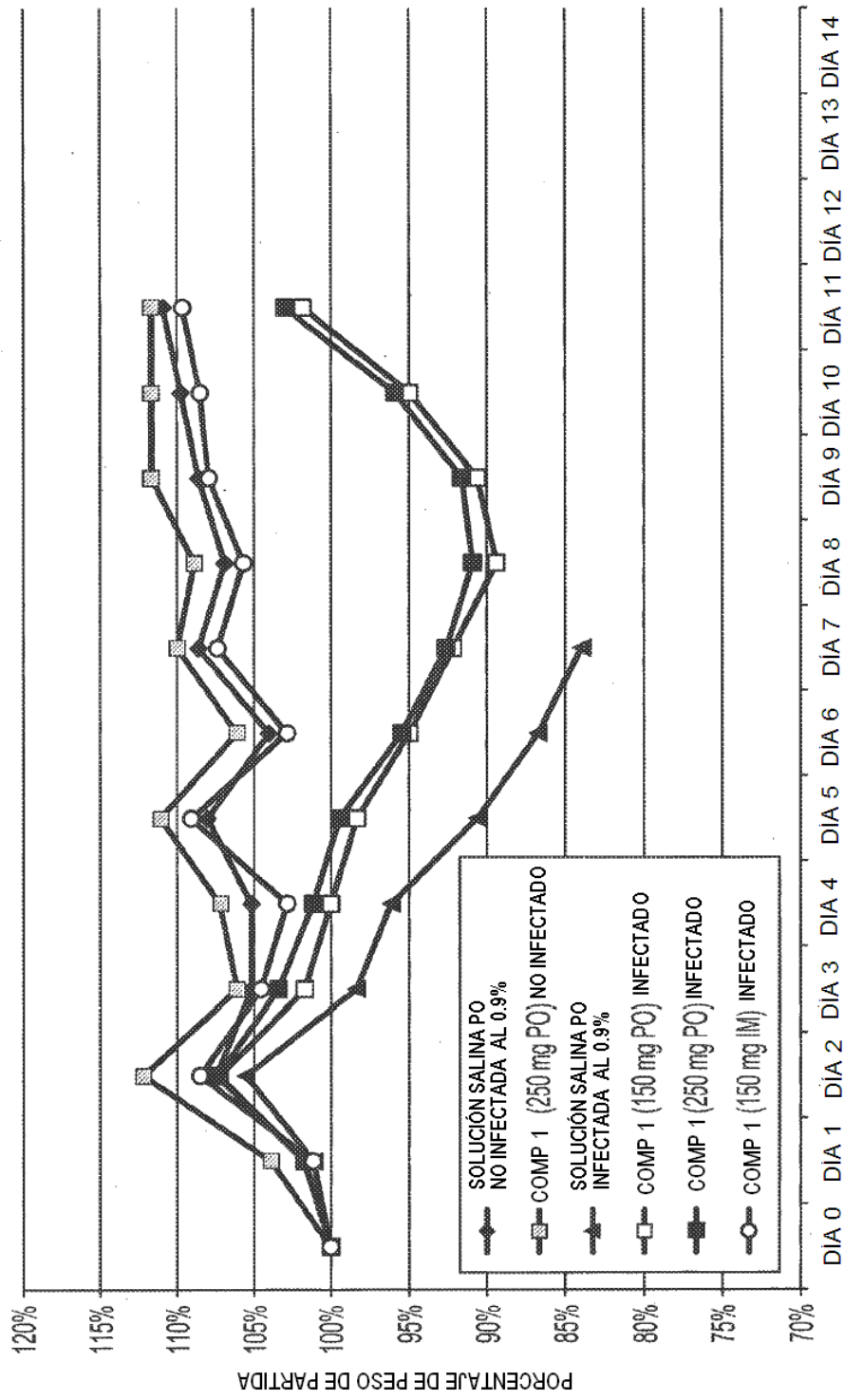


FIG. 11

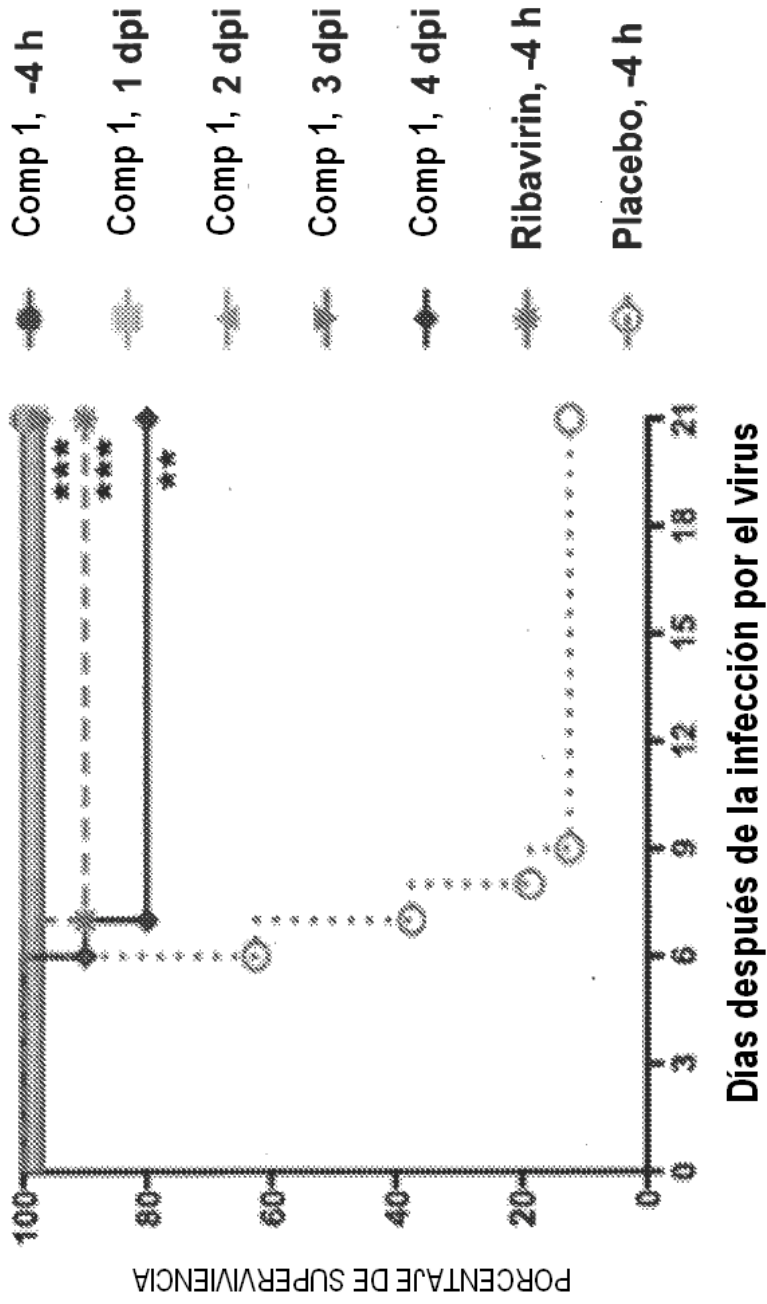


Figura 12

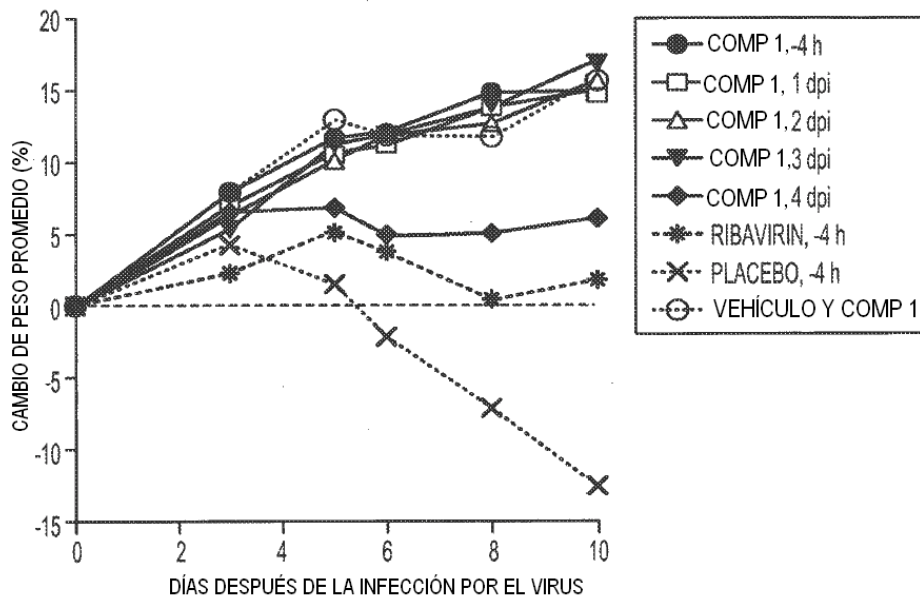


FIG. 13

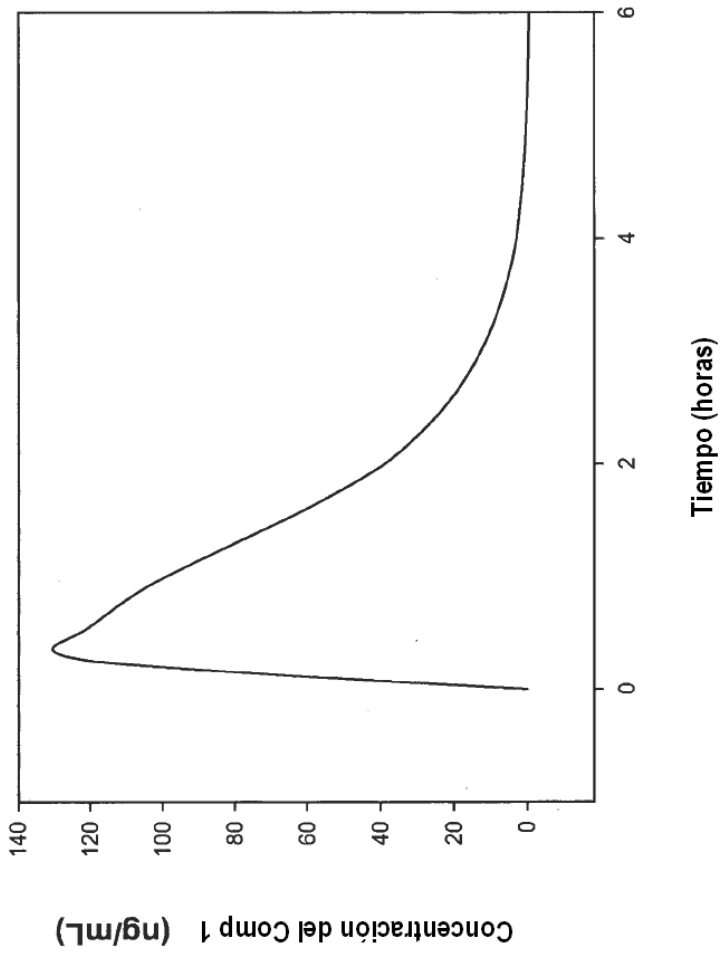


Figura 14