

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 928**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

C07H 19/04 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2006 E 06848625 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 1968612**

54 Título: **Profármacos de dinucleótidos**

30 Prioridad:

13.12.2005 US 750036 P

15.05.2006 US 800294 P

12.12.2006 US 637520

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

13.06.2016

73 Titular/es:

SPRING BANK PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

113 Cedar Street, Suite S-7

Milford, MA 01757, US

72 Inventor/es:

IYER, RADHAKRISHNAN P. y

PADMANABHAN, SEETHARAMAIYER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 573 928 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Profármacos de dinucleótidos

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio del documento de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/750.036, presentada el 13 de diciembre de 2005 y la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/800.294, presentada el 15 de mayo de 2006.

Apoyo gubernamental

La invención ha estado financiada, en su totalidad o en parte, por la subvención del NIH número 5 UOI AI058270-02/03.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al diseño, la síntesis y la evaluación de análogos de profármacos de nucleósidos, nucleótidos y oligonucleótidos. Los compuestos y las composiciones de la presente invención son útiles para el tratamiento de infecciones con el virus de la hepatitis B (VHB) y de enfermedades hepáticas asociadas con el VHB. Específicamente, compuestos y composiciones relacionados con ésteres de S-alquilo de nuevos agentes anti-VHB a base de dinucleótidos y trinucleótidos fosforotioatos. Los compuestos y las combinaciones se pueden administrar de
15 forma aislada o en combinación con otros agentes anti-VHB.

Antecedentes de la invención

20 Las infecciones agudas y crónicas del hígado causadas por el virus de la hepatitis B (VHB) constituyen una importante situación crítica de la salud pública a nivel mundial que afecta a cerca de 2 mil millones de personas, incluyendo 1,7 millones en los EE.UU. (informe de la OMS). Se estima que hay 350 millones de portadores crónicos del VHB en todo el mundo. De acuerdo con los Centros para el Control de Enfermedades, cerca de 3 a 7 millones de personas mueren cada año por complicaciones asociadas con la infección, tales como cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Una cantidad significativa de receptores de trasplantes de hígado han seguido necesitando una terapia eficaz contra el VHB. El VHB está reconocido como un agente etiológico importante que causa un número significativo de cánceres humanos. La infección con VHB también conduce a una hepatitis fulminante, una
25 enfermedad mortal en la que se destruye el hígado. La infección hepatitis crónica conduce a una hepatitis crónica persistente, fatiga, cirrosis hepática, cáncer de hígado y muerte. La epidemiología de la infección con VHB es similar a la del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Muchos portadores del VIH están coinfectados con el VHB. Sin embargo, el VHB es 100 veces más infeccioso que el VIH.

30 A pesar de que actualmente se han aprobado tres fármacos anti-VHB para uso clínico, existe una importante necesidad de atención médica no satisfecha debido a la rápida aparición de resistencia, y a la toxicidad limitante de la dosis asociada con la terapia. Los fármacos aprobados para uso clínico incluyen interferón alfa, una proteína modificada genéticamente y análogos de nucleósidos tales como lamivudina y entacavir. Otro fármaco anti-VHB aprobado es adefovir dipivoxil, que se considera un análogo de mononucleótido fosfonato.

35 Se está desarrollando una serie de nucleósidos sintéticos como agentes anti-VHB. Por ejemplo, el (-)-enantiómero de BCH-189 (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), conocido como lamivudina o 3-TC, está reivindicado por Liotta et al. en el documento de patente de EE.UU. nº 5.530.116.

40 FTC o beta-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosina-1-il)-1,3-oxatiolano reivindicado por Liotta et al., documentos de patente de EE.UU. nº 5.5814.639 y 5.914.331. Véase también Furman et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2686-2692, 1992. L-FMAU o 2'-fluoro-5-metil-beta-L-arabinofuranoil uridina se da a conocer en los documentos de patente de EE.UU. nº 5.565.438, 5.567.688 y 5.587.362.

El adefovir o (9-[2-(fosfono-metoxi)]etil]adenina (también referido como PMEAs, se da a conocer en los documentos de patente de EE.UU. nº 5.641.763 y 5.142.051. El profármaco correspondiente, referido como adefovir dipivoxil, está aprobado clínicamente como un agente anti-VHB que actúa por vía oral.

45 Los documentos de patente de EE.UU. nº 5.444.063 y 5.684.010 describen el uso de enantiómeros de nucleósido beta-D-1,3-dioxolano para el tratamiento del VHB.

El documento de patente de EE.UU. nº 6.881.831 de Iyer et al., describe compuestos que comprenden dos o más monómeros de desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos conectados por enlaces internucleotídicos para uso en el tratamiento del VHB.

50 Nucleósidos L de diferentes estructuras se han reivindicado como agentes anti-VHB en los documentos de las solicitudes presentadas nº WO 08/40164, WO/95/07287 y WO 00/09531.

Otros agentes anti-VHB reivindicados incluyen: (1) beta-D-3'-azido-2,3-didesoxi 5-fluorocitidina (Mahmoudian, *Pharm Research* 8, 1198-203, 1991; (2) análogos de 2'-beta-D-F-2',3'-didesoxi nucleósidos, Tsai et al., *Biochem Pharmacol.*

48,1477-1481, 1994; (3) nucleósidos de 5-carboximido-pirimidina o de 5-fluoro-2,3-insaturado-pirimidina o de pirimidina modificados en 3'.

Además de adefovir, también se ha reivindicado que unos pocos análogos de nucleótidos son agentes anti-VHB. Estos incluyen 9[1-fosfonometoxiciclopropil]metilguanina], PMCG y su profármaco dipivaloxil, PMCDG y el análogo trifluorometilo, MCC-478. Para una revisión, véase: Iyer et al., *Current Opinion in Pharmacol* 5, 520-528, 2005.

Los análogos cíclicos de nucleósido fosfonato y los derivados de profármacos también son análogos de nucleótidos con actividad anti-VHB. Los análogos de profármacos de fosforamidato correspondientes se convierten en el derivado de fosfonato, presumiblemente mediante enzimas esterasas. Para una revisión, véase: Iyer et al., *Current Opinion in Pharmacol*, 5, 520-528, 2005.

El concepto de utilizar fármacos modificados químicamente como análogos de profármacos es un paradigma establecido en el desarrollo farmacéutico de una variedad de profármacos diferentes. Las estrategias de profármaco permiten la modificación transitoria de las propiedades fisicoquímicas del fármaco con el fin de: (a) mejorar la estabilidad química, (b) alterar la solubilidad acuosa, (c) mejorar la biodisponibilidad, (d) dirigir a los tejidos diana específicos, (e) facilitar combinaciones de fármacos sinérgicos, (f) superar los efectos metabólicos de primer paso, (g) servir como vehículo lipófilo para fármacos hidrófilos y (h) servir como depósito de compuestos químicos para la entrega sostenida de fármacos.

Se han empleado algunas estrategias de profármaco para mejorar la biodisponibilidad, para mejorar la distribución en los tejidos del hígado y para mejorar la potencia antivírica. Por ejemplo, una modificación del grupo fosfato como el correspondiente fosforamidato de aminoácido da como resultado agentes antivíricos más potentes (Gudmundsson et al., *Nucleosides, Nucleotides*, 23, 1929-1937, 2004. Cahard et al., *Mini Reviews Med Chem.*, 4, 371-381, 2004). También se han desarrollado profármacos de gliceril fosfato y fosfolípido de nucleósidos (Hostetler et al., *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 44, 1064-1069, 2000) para mejorar la biodisponibilidad oral. Derivados de S-aciltioetilo (SATE) y de salicilo cíclico (Cyclosal) son otros ejemplos de derivatización de profármacos de nucleósidos y nucleótidos (Peyrottes, et al., *Mini Rev. Med. Chem.*, 4, 395-408, 2004) y Meier et al., *Mini Rev Med Chem* 4, 383-394, 2004. Otras estrategias de profármaco incluyen ésteres 1,3-propanílicos cíclicos sustituidos en 4-arilo (análogos HepDirect) diseñados para someterse a escisión oxidativa con enzimas del hígado para liberar intracelularmente el nucleótido activo (Erion et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 5154-5163, 2004).

En general, todos los nucleósidos necesitan estar fosforilados en forma de nucleósidos mono-, di- y trifosfatos antes de que puedan llegar a ser inhibidores de la polimerasa del VHB. Por lo tanto, los nucleósidos se pueden considerar profármacos que se deben activar *in vivo*. Como la mayoría de los nucleósidos se dirigen a la polimerasa vírica y actúan con un mecanismo de acción similar, existe un potencial para una rápida aparición de resistencia y la posibilidad de eventos adversos, tales como toxicidad mitocondrial debida a una inhibición de la gamma polimerasa humana. Otro problema con la terapia antivírica es el punto vírico tras el cese de la terapia.

El documento WO98/07734 describe un profármaco de oligonucleótido que comprende al menos seis nucleótidos unidos covalentemente, en donde al menos uno de los cuales se derivatiza de forma específica del sitio con un grupo químico lipófilo que está fijado de forma reversible y covalente al nucleótido en un fosfato 5', en un fosfato 3' o en un enlace fosfato internucleotídico.

El documento US5.770.713 describe oligonucleótidos de fosforotioato triéster que comprenden concatenaciones internucleotídicas que tiene un enlace p-s protegido por una agrupación biorreversible en el medio intracelular. Oligonucleótidos que tienen grupos que bloquean el fosfato de forma biorreversible, que se pueden usar como profármacos para el oligonucleótido, también se describen en el documento WO97/476637.

La estabilidad química de los profármacos TpT fue investigada por Pojarvi et al., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids* 20 (1&2), 77-91 (2001).

Los ésteres de aciloxiarilo y aciloxialquilo de oligonucleótidos fueron descritos por Iyer et al., *Bioorganic Chemistry*, 23, 1-21 (1995) y Iyer et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 6(16), 1917-1922 (1996). Barber et al., (*Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 5(6) 563-568 (1995)) describen la alquilación de fosforotioato y de fosforoditioato de ditimidina con diversos analitos de yodoalquilo.

Prooligonucleótidos quiméricos con 6 grupos de enmascaramiento lábiles frente a enzimas, fueron sintetizados por Tasquellas et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 7(3), 263-268 (1997).

Las estrategias de profármaco se están aplicando también en el caso de oligonucleótidos (18-30 meros), que se están desarrollando como una nueva clase potencial de agentes terapéuticos que utilizan tecnologías tales como aptámeros, antisentido, ribozimas, ARN de interferencia e inmunoestimulación [Para una revisión véanse: (a) Szymkowski, D. E. *Drug Disc. Today* 1996, J, 415; (b) Uhlmann E.; Peyman A. *Chem. Rev.* 1990, 90, 543 (c) Uhlenbech O. C. *Nature* 1987, 328, 596; (d) Zamore P. D. *Science*, 2002, 296, 1265; (e) Manoharan, M. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2004, S, 570; (f) Iyer, R. P.; Kuchimanchi, S.; Pandey, R. K. *Drugs of the Future* 2003, 28, 51 (g) Uhlmann, E.; Vollmer, J. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2003, 6, 204].

Al estar muy cargados, los compuestos de peso molecular elevado, oligonucleótidos, tienen atributos fisicoquímicos desfavorables para la penetración celular mediante difusión pasiva. En consecuencia, el diseño de análogos de profármaco de oligonucleótido se ha centrado principalmente en el enmascaramiento parcial de una parte de su cadena principal cargada negativamente mediante grupos biorreversibles, lipófilos. Varios de tales análogos han sido sintetizados y la biorreversibilidad se ha demostrado *in vitro*. Sin embargo, parece que, si bien el desenmascaramiento inicial de uno o dos nucleótidos tiene lugar rápidamente, el desenmascaramiento completo tarda varias horas o incluso días. Por ejemplo, Iyer et al., prepararon derivados de S-aciloxialquilo de un oligonucleótido PO-PS mezclado y encontraron que, *in vitro*, se podía convertir de nuevo al oligonucleótido parental *aunque* lentamente. Una estrategia de profármaco SATE similar se ha empleado para profármacos de oligonucleótidos. Pero, no ha habido una demostración de su potencial *in vivo* en términos de mejora de la farmacocinética de los oligonucleótidos o de actividad biológica mejorada. Además, no hay informes de estudios de la biodisponibilidad *in vivo* por vía oral de profármacos de oligonucleótidos o una demostración de la actividad biológica *in vivo*.

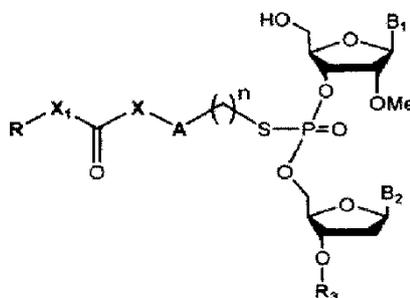
Los oligonucleótidos de cadena más corta (menos de 8 meros) con menor número de cargas y un peso molecular menor en comparación con los oligonucleótidos 20 meros, representan una clase prometedora de nuevas moléculas con propiedades terapéuticas y de diagnóstico potenciales. De hecho, informes recientes sugieren que monooligonucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos y oligonucleótidos de cadena corta poseen una actividad biológica significativa que se puede explotar para aplicaciones terapéuticas.

Sin embargo, la falta de sistemas de administración oral, transdérmico y otros sistemas compatibles con pacientes, no invasivos, junto con una permeabilidad celular ineficaz, representa un obstáculo importante en el avance terapéutico de estas moléculas.

Compendio de la invención

En un esfuerzo por desarrollar análogos biodisponibles oralmente de dinucleótidos y trinucleótidos, se realizó la síntesis y la evaluación de una variedad de derivados de pronucleótidos S-funcionalizados, sin carga, de un modelo de dinucleótido. El diseño de los derivados de pronucleótidos se basó en la capacidad de una enzima diana para desenmascarar una funcionalidad latente, para revelar el nucleótido parental *in vivo*. En este documento se dan a conocer los resultados de estudios del diseño, la síntesis, la estabilidad, la biorreversibilidad y la citotoxicidad de varios compuestos útiles, entre otras cosas, para el tratamiento de VHB.

La presente invención proporciona un pronucleótido de fórmula (III):



(III)

o los racematos, enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos, tautómeros del mismo, en donde

- X está ausente o es O, NH, NR, S;
- X₁ está ausente o es O, NH;
- A está ausente o es arilo, aralquilo;
- N es 0, 1, 2, 3, 4, 5;
- R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo, heterocíclico, O-alquilo, O-heteroarilo, esteroideo;
- R₃ se selecciona a partir de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, C(O)-arilo, C(O)O-arilo, C(O)NH-alquilo y C(O)NH-arilo; Y, Z son independientemente, O y S;
- B₁ y B₂ son, independientemente, adenina, guanina, timina, citosina, uracilo o bases nucleicas modificadas.

Los profármacos de acuerdo con la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos, son útiles en la prevención y el tratamiento de infecciones por VHB y otras afecciones causadas por el VHB, tales como inflamación del hígado, cirrosis hepática, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis crónica y otras enfermedades del hígado. Los compuestos y las formulaciones de la invención también se pueden utilizar profilácticamente para prevenir la progresión de una enfermedad en individuos infectados con VHB.

Un método para el tratamiento de una infección por VHB en un hospedador, incluyendo el ser humano, también se describe que incluye la administración de una cantidad eficaz de un profármaco de la invención que incluye una sal del mismo farmacéuticamente activa, administrada sola o en combinación o secuencialmente con otro u otros agentes anti-VHB. Los profármacos de la invención preferidos comprenden dinucleótidos y trinucleótidos que incluyen, pero no están limitados a, 3'-dApsU₂-OMe, 3'-dApsA₇deaza y 3'-dApsTpsC y sus análogos, en donde "ps" se refiere a enlaces internucleotídicos de fosforotioato.

En este contexto, los solicitantes han informado recientemente de que ciertos análogos de dinucleósidos y trinucleósidos fosforotioatos (PS) y fosforamidatos muestran actividad anti-VHB potente *in vitro* e *in vivo*. Aunque los análogos de PS dímeros y trímeros son moléculas pequeñas cargadas negativamente, los estudios de compuestos marcados con ³⁵S en ratas, han revelado que estos compuestos no están biodisponibles oralmente. La falta de biodisponibilidad oral puede estar debida a una variedad de factores, que incluyen: (a) el entorno ácido en el estómago que causa una degradación sustancial del nucleótido, (b) la carga negativa en la cadena principal que inhibe la permeación del nucleótido a través de la barrera de la mucosa intestinal y (c) la presencia de diversas enzimas digestivas en el tracto GI que degradan el compuesto. Dado que los oligonucleótidos de cadena más larga y más corta no están biodisponibles por vía oral, parece que en el caso de una clase de compuestos con nucleótidos más pequeños, la carga, más que el tamaño del compuesto, puede ser el factor más importante para determinar la biodisponibilidad y que enmascarar la carga negativa de la cadena principal puede proporcionar potencialmente compuestos nucleótidos biodisponibles por vía oral.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, tal y como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que los caracteres de referencia se refieren a las mismas partes bajo diferentes perspectivas. Los dibujos no están necesariamente a escala, en su lugar, el énfasis se dirige a ilustrar los principios de la invención.

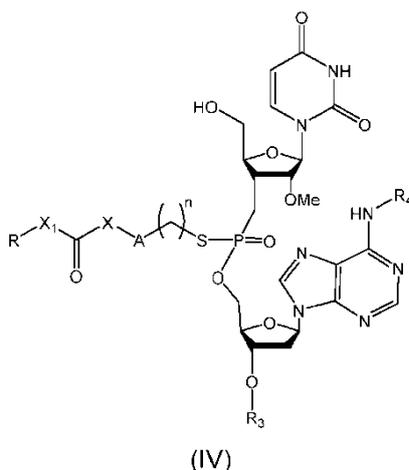
La Fig. 1 es una traza de ³¹P RMN de un pronucleótido típico.

La Fig. 2 es un gráfico de la dispersión que representa el resultado de experimentos *in vivo* que emplean la composición de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

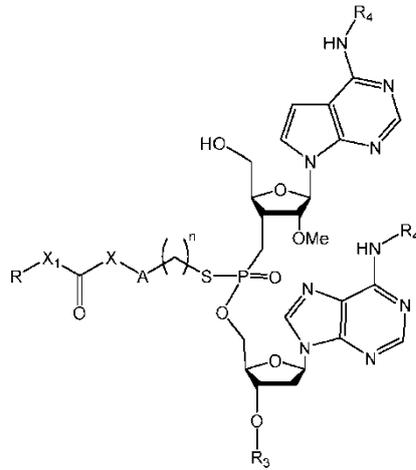
En una primera realización, los compuestos de la presente invención son compuestos representados por la fórmula III ilustrada anteriormente, o racematos, enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos, tautómeros de los mismos.

En una segunda realización, los compuestos de la presente invención son compuestos representados por la fórmula IV tal y como se ilustra a continuación, o racematos, enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos, tautómeros de los mismos.



en donde R₄ se selecciona a partir de hidrógeno, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, C(O)-arilo, C(O)O-arilo, C(O)NH-alquilo y C(O)NH-arilo; y R, R₃, X, X₁, A y n son como se han definido anteriormente.

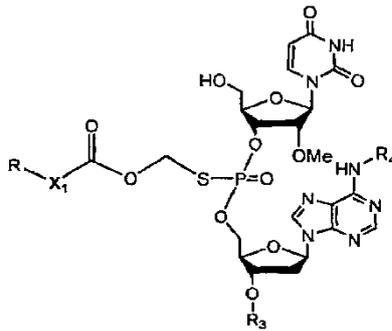
En una tercera realización, los compuestos de la presente invención son compuestos representados por la fórmula V tal y como se ilustra a continuación, o racematos, enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos, tautómeros de los mismos.



(v)

en la que R, R₃, R₄, X, X₁, A y n son como se han definido anteriormente.

Compuestos representativos de acuerdo con la invención, son los seleccionados a partir del grupo que consiste en: Compuestos (1) - (8) de la fórmula A1:



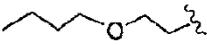
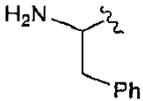
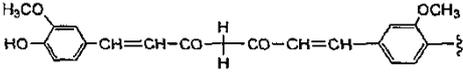
A1

5

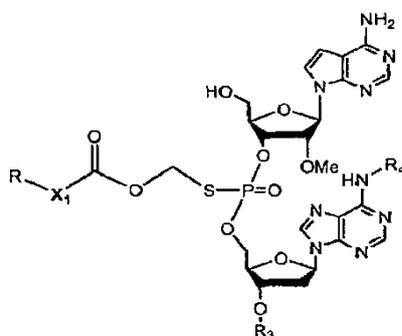
en donde R, X₁, R₃ y R₄ se definen para cada ejemplo en la Tabla 1.

TABLA 1

Nº de Compuesto	R	X ₁	R ₃	R ₄
1		ausente	H	H
2		O	H	H
3		ausente	H	H
4		O	H	H
5		O	C(O)PH	H

Nº de Compuesto	R	X ₁	R ₃	R ₄
6		O	H	C(O)Ph
7		ausente	H	H
8		O	H	H

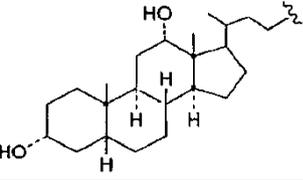
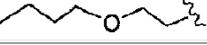
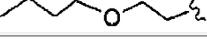
Compuestos representativos de acuerdo con la invención, son los seleccionados a partir del grupo que consiste en: Compuestos (9) - (16) de la fórmula B1:

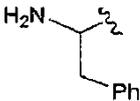
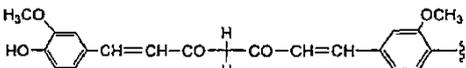


B1

5 en la que R, X₁, R₃ y R₄ se definen para cada ejemplo en la Tabla 2.

TABLA 2

Nº de Compuesto	R	X ₁	R ₃	R ₄
9		ausente	H	H
10		O	H	H
11		ausente	H	H
12		O	H	H
13		O	C(O)PH	H
14		O	H	C(O)PH
15		ausente	H	H

Nº de Compuesto	R	X ₁	R ₃	R ₄
				
16		O	H	H

5 Existe una necesidad urgente de desarrollar fármacos anti-VHB, que sean nuevas entidades químicas, con un mecanismo de acción novedoso que se pueda utilizar en combinación con otros fármacos. Los análogos de dinucleótidos y trinucleótidos de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos anti-VHB y representan un nuevo paradigma en el descubrimiento antivírico, diferente de la clase de nucleósidos clásicos de agentes anti-VHB. El documento de patente de EE.UU. 6.881.831, concedida a Iyer et al., describe varios dinucleótidos y trinucleótidos, que tienen actividad anti-VHB. Muchos de estos compuestos tienen también actividad contra cepas resistentes de VHB (Iyer et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 48, 2199-2205, 2004) y el dinucleótido 3-dApsU_{2'-OMe} (3-desoxi Adenina unida a Uracilo a través de un enlazador fosforotioato, en donde el Uracilo está modificado en la posición 2' del azúcar con un resto metoxi) ha mostrado una excelente actividad anti-VHB en el modelo de ratón transgénico de infección con VHB (Iyer et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 48, 2318-2320, 2004).

15 Varios estudios sugieren que el metabolismo significativo de 3-dApsU_{2'-OMe} y de otros dinucleótidos y trinucleótidos no tienen lugar *in vitro* en presencia de microsomas de hígado humano y de ratón. Esto apoyaría la hipótesis de que la actividad antivírica de 3-dApsU_{2'-OMe} y de otros dinucleótidos y trinucleótidos se debe a la estructura intacta del nucleótido y no debido a sus metabolitos. Esto contrasta con los nucleósidos antivíricos tradicionales, que requieren una activación metabólica y la conversión a derivados trifosfato para su acción.

20 El estudio farmacocinético de 3-dApsU_{2'-OMe} en marmota muestra que después de una administración intravenosa (IV), se observaron niveles significativos de 3-dApsU_{2'-OMe} en plasma con una semivida de aproximadamente 1 h. El dinucleótido 3-dApsU_{2'-OMe} se eliminaba por la orina como un material casi intacto, lo que sugiere una falta de metabolismo significativo en el hígado. Esta observación es compatible con la ausencia de un metabolismo significativo de 3-dApsU_{2'-OMe} *in vitro* utilizando microsomas de hígado humano y, por lo tanto, apoyaría la hipótesis de que la actividad antivírica de 3-dApsU_{2'-OMe} es debida a la estructura intacta de los nucleótidos, y no debida a sus metabolitos. Esto contrasta con los nucleósidos antivíricos tradicionales, que requieren una activación metabólica y la conversión a derivados trifosfato para su acción.

30 La administración iv de dinucleótidos y trinucleótidos marcados con ³⁵S en ratas sugiere que después de la absorción, los compuestos se distribuían de forma muy rápida desde el compartimiento central a los tejidos extravasculares. Los compuestos se concentraban principalmente en el hígado y el riñón, con cantidades menores observadas en otros tejidos. La eliminación de los compuestos parecía ser lenta. Este estudio demuestra que la distribución significativa de los compuestos en el hígado se produce después de la absorción. Puesto que el hígado es el órgano diana para el VHB, el estudio mostraba que los dinucleótidos y trinucleótidos entran fácilmente en las células del hígado. La potente actividad antivírica del dinucleótido 3-dApsU_{2'-OMe}, en el modelo de ratón transgénico, es compatible con todos los estudios anteriores.

35 El estudio *in vitro* de la permeación celular de dinucleótidos y trinucleótidos utilizando células Caco-2, parece sugerir que no se puede producir una absorción intestinal de estas moléculas cargadas. Puesto que las células Caco-2 son algo predictivas de la biodisponibilidad oral, el estudio parece sugerir que los dinucleótidos y trinucleótidos no pueden ser absorbidos por la mucosa intestinal mediante difusión pasiva, a menos que se emplee una estrategia novedosa de administración de la formulación/fármaco. La falta de biodisponibilidad oral puede ser debida a una variedad de factores, que incluyen: (a) el entorno ácido en el estómago que causa una degradación sustancial del nucleótido, (b) la carga negativa en la cadena principal que inhibe la permeación del nucleótido a través de la barrera de la mucosa intestinal y (c) la presencia de diversas enzimas digestivas en el tracto GI que degradan el compuesto. Dado que ambos oligonucleótidos de cadena más larga y más corta no están biodisponibles por vía oral, parece que en el caso de una clase de compuestos de nucleótidos más pequeños, la carga, más que el tamaño del compuesto, puede ser un factor más importante para determinar la biodisponibilidad y que enmascarar la carga negativa en la cadena principal puede proporcionar potencialmente compuestos dinucleótidos y trinucleótidos biodisponibles por vía oral.

50 En la técnica se entiende que los nucleósidos, en general, son poco biodisponibles por vía oral, como tales, y se ha adaptado una derivatización del profármaco como estrategia para mejorar la biodisponibilidad oral. El documento de Patente de EE.UU. 6.875.751 reivindicada por Imbach et al., revela profármacos 3'-aminoácidos de 2'-desoxi-beta-L-nucleósidos como profármacos mejorados biodisponibles por vía oral de L-nucleósidos. Del mismo modo, la estrategia de profármaco SATE también se ha aplicado de manera similar a los nucleósidos.

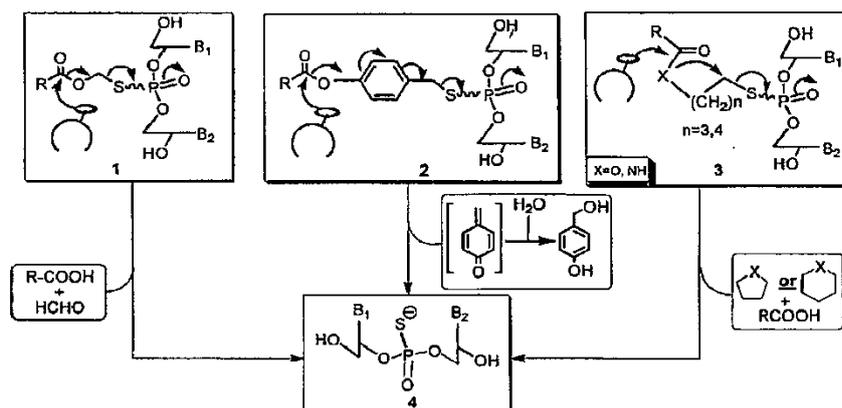
Sin embargo, el desafío en el caso de los nucleótidos y dinucleótidos es que contienen restos de purina y pirimidina muy lábiles frente a ácidos en sus estructuras. Por lo tanto, aunque el enmascarar la carga negativa de estas moléculas podría ayudar en su difusión celular por el aumento de la lipofilicidad, no se sabe si van a ser estables en la mucosa gástrica durante un tiempo suficiente para ser absorbidas por vía oral. Típicamente, por ejemplo, el dinucleótido 3-dApsU_{2'}-OMe se degradaba rápidamente en líquido gástrico simulado con una semivida inferior a 10 minutos. Tal proceso de degradación se sabe que se produce por la protonación inicial del nitrógeno de la base nucleica seguida de despurinación y escisión del anillo de azúcar.

Por lo tanto, dada la susceptibilidad de 3-dApsU_{2'}-OMe a la degradación mediada por ácido, no era predecible *a priori* si enmascarar la carga de la cadena principal podría protegerla contra su degradación, incrementaría su estabilidad en el entorno ácido del estómago y por lo tanto, favorecería la absorción oral. De nuevo, es bien sabido que la biodisponibilidad oral no está relacionada simplemente con la estabilidad en la mucosa gástrica. Por ejemplo, incluso con una estabilidad mejorada, no se sabía si estos profármacos de dinucleótidos y trinucleótidos con peso molecular relativo elevado (PM >700 Dalton) se podrían transportar a través de las barreras mucosas. De hecho, no se sabe bien si existen transportadores específicos que puedan facilitar el transporte de estos nuevos compuestos a través de la mucosa, mediante mecanismos de transporte activo. De acuerdo con la regla de Lipinski (Lipinski, C. A., Adv. Drug Del. Rev. 23, 3, 1997), las moléculas de fármacos deben tener un peso molecular inferior a 500 Dalton, no tener más de 5 donantes de enlaces de hidrógeno (OH y grupos NH), no más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno (en particular, N y O), un peso molecular inferior a 500, un LogP menor de 5 para la absorción oral mediante difusión pasiva. De hecho, los profármacos de dinucleótidos y trinucleótidos son compuestos con un peso molecular más alto y no cumplen muchos de los criterios de Lipinski para la absorción oral.

Los profármacos de dinucleótidos y trinucleótidos de la presente invención tienen nuevas modificaciones o sustituciones en el anillo y las bases nucleicas. Ya que las esterases u otras enzimas tienen requisitos estructurales y topológicos específicos para la actividad, no se podía prever si los profármacos de dinucleótidos y trinucleótidos serían sustratos para las enzimas. Además, dado que muchos compuestos descritos en esta memoria son mezclas de isómeros, y ya se conoce que las enzimas son estereo-discriminatorias, no se sabía qué isómeros individuales podían ser sustratos o si la tasa de conversión a la molécula parental sería muy diferente, lo que los haría menos atractivos como fármacos candidatos.

Por lo tanto, aunque el concepto de profármacos es conocido y existen muchas estrategias para preparar profármacos de muchos compuestos, incluyendo nucleósidos y mononucleótidos, no se podía anticipar *a priori*, ni es obvio, para alguien experto en la técnica, si los profármacos similares de dinucleótidos y trinucleótidos podían tener biodisponibilidad oral y, por lo tanto, se podían desarrollar como fármacos oralmente biodisponibles. La presente invención proporciona tales composiciones.

Esquema I



En un ejemplo, se reivindican derivados de profármacos funcionalizados en S, sin cargar. El diseño de derivados de profármacos se basa en la capacidad de una enzima diana para desenmascarar una funcionalidad latente para revelar el nucleótido parental *in vivo*. Como ejemplos representativos, la estructura general de los derivados de dinucleótidos obtenidos en 1-3 y el mecanismo esperado para su conversión mediada por esterasa, al dímero parental 4, se describe en el Esquema 1, e incluyen: (a) análogos de tiofosfato de S-(aciloxialquilo) 1. Los análogos de aciloxialquilo, ejemplificados por los antibióticos pivampicilina y bacampicilina, así como, el agente anti-VHB recientemente aprobado, adefovir dipivoxil, son análogos de profármacos de ésteres que se utilizan clínicamente, están biodisponibles por vía oral. Después de su absorción, se cree que la conversión del profármaco a la molécula parental tiene lugar *a través de* una hidrólisis mediada por esterasa en el plasma y/o el hígado, con liberación concomitante de formaldehído y ácido carboxílico. (b) Los análogos de tiofosfato de S-(aciloxiarilo) 2. Los análogos de aciloxiarilo de daunorrubicina, doxorubicina, mostaza de fosforodiamida, acivicina y el conjugado PEG-

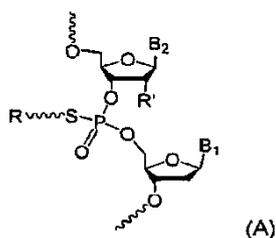
daunorrubicina son bien conocidos^{2b} y se han evaluado ampliamente *in vitro* e *in vivo* [Bundgaard, H. In Bio-reversible carriers in drug design. Theory and Application. Roche, E.B. compilador; Pergamon Press: New York, 1987; págs. 13-94; para una revisión excelente véanse: Oliyai, R.; Stella, V. J. Annu. Rev Pharmacol. Toxicol. 1993, 32, 521; Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J.-C.; Gesson, J.-P. Curr. Med. Chem. 2002, 2, 155]. Aunque se libera un producto intermedio reactivo de metilén quinona de forma transitoria después de la hidrólisis de estos profármacos, una rápida captura de una molécula de agua por el compuesto intermedio de semiquinona da como resultado su conversión a la especie inocua alcohol bencilico, minimizando de este modo cualquier lesión celular. Usando esta lógica, se diseñaron ciertos análogos de nucleótidos o pronucleótidos de la invención que incluían los análogos de éster (que tenían un grupo alcoxi de cadena larga que impartía mayor lipofilia a la molécula), así como, el análogo de amida y (c) derivados de S-alquilo con un grupo funcional terminal 3, de tal manera que durante el proceso de hidrólisis mediada con enzima, un grupo nucleófilo latente está descubierto, el cual está situado en posición yuxtapuesta para atacar al carbono alfa electrófilo del resto tiofosfato, dando como resultado la liberación del dinucleótido parental.

Los profármacos o pronucleótidos de la presente invención también se refieren a ciertos derivados y conjugados de nucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos y oligonucleótidos. El resto conjugado puede ser de diferentes tipos químicos y estructurales y se puede enlazar a la cadena principal hidroxilo, amino, fosfato o fosforotioato de los nucleótidos u otras funcionalidades en el nucleósido y los oligonucleótidos a través de enlaces éster, amida, isocianato, urea, tiourea, carbamato u otro tipo de enlace covalente. Dada la naturaleza impredecible de la acción enzimática descrita anteriormente, ciertos conjugados pueden regenerar o no química o enzimáticamente el nucleótido parental *in vitro* o *in vivo*, y sin embargo, la actividad biológica puede residir en el conjugado o en el nucleótido parental o en ambos. Específicamente, varios dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos y sus análogos se han identificado previamente como agentes anti-VHB (documentos de patente de EE.UU. 6.881.83 y US2003/0109471). Por lo tanto, los derivados y conjugados descritos en esta invención también son aplicables a los compuestos citados en estas solicitudes.

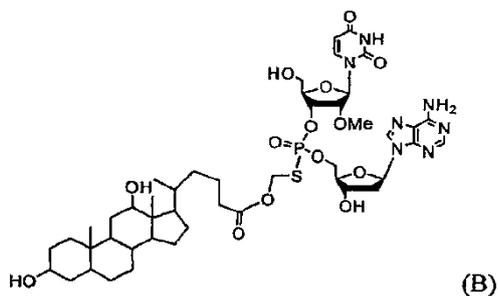
Todos los profármacos de 3-dApsU_{2'}-OMe son mezclas de isómeros Rp, Sp que se han obtenido a partir de compuestos isoméricos Rp, Sp obtenidos a partir de 3-dApsU_{2'}-OMe - Argumentos similares sirven perfectamente para trinucleótidos y tetranucleótidos.

En una realización de la invención, el resto que se conjuga representa un "grupo de enmascaramiento", "R" que se puede unir a la cadena principal de la fórmula (A), en donde R = ésteres de aciloxi alquilo, arilo y heteroarilo, carbonatos, carbamatos, amidas y así sucesivamente, con la estructura general mostrada en el Esquema 1. El anillo heterocíclico contiene preferiblemente 5 o 6 miembros que contienen átomos de O, N, o S en el anillo, libres o fusionados a otro anillo.

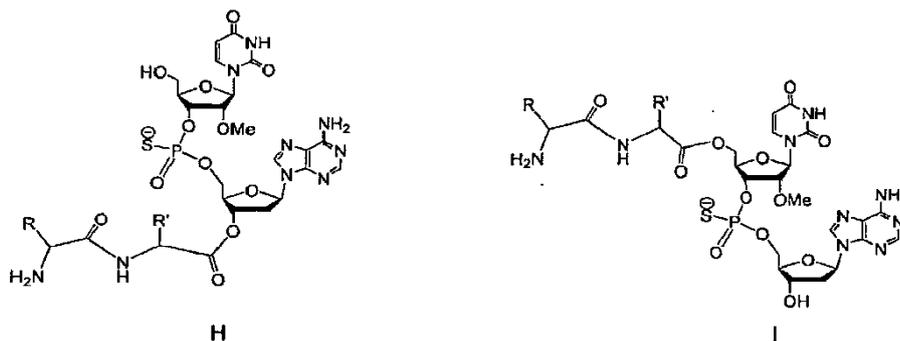
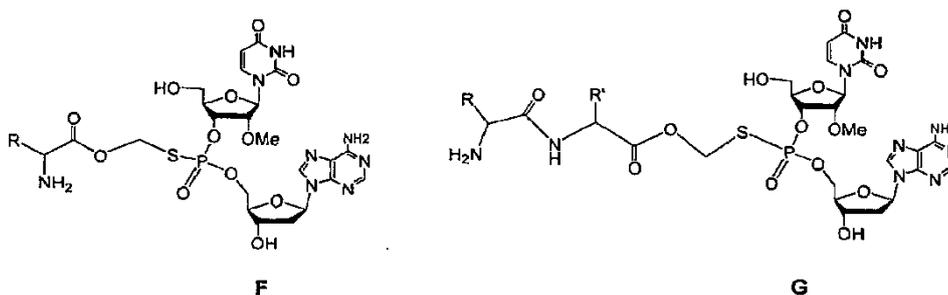
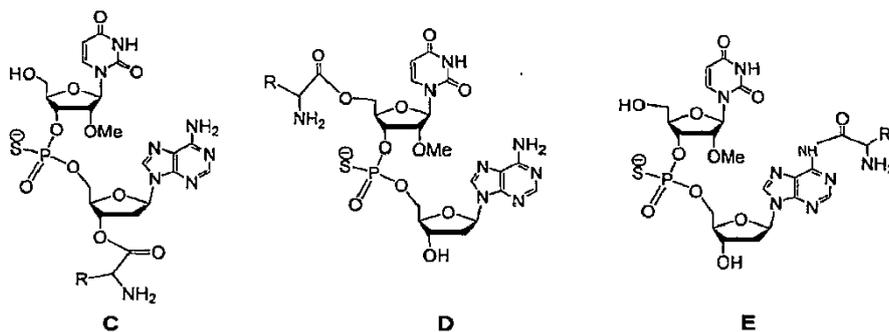
El enmascaramiento de la cadena principal cargada puede mejorar la estabilidad del nucleótido en el entorno ácido y básico del tracto gastrointestinal (que tiene una variedad de enzimas digestivas) facilitando de este modo la absorción oral. Por ejemplo, la presencia de un diéster fosfórico o un enlace fosforotioato con carga negativa se cree que es esencial para la degradación mediada con nucleasa de un polinucleótido. Sin embargo, mediante el enmascaramiento de la carga negativa a través de la preparación de un derivado S-aquilado, la acción degradativa química y mediada por enzimas del polinucleótido, se puede inhibir mejorando de este modo la estabilidad del polinucleótido.



En otra realización de la invención, el resto que se conjuga puede ser un grupo lipófilo que facilita el transporte del fármaco a través de barreras biológicas tales como la bicapa lipídica de las células de mamífero o la pared celular bacteriana. Ejemplos de tales grupos lipófilos incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), colesterol, ácido cólico, fosfolípidos, etc. El grupo lipófilo está ligado a cualquiera hidroxilo del azúcar, la base nucleica o el enlace fosfato y fosforotioato internucleotídico en uno o varios sitios, tal y como se muestra en el compuesto (B) que ilustra la estructura de un análogo de ácido cólico de un dinucleósido fosforotioato, 3'dApsU_{2'}OMe o en la fórmula.



Las estructuras típicas de dinucleótidos conjugados con aminoácidos y péptidos en los hidroxilos del azúcar, la base nucleica y en el enlace fosforotioato internucleotídico, están representadas por los compuestos (C-I).



En otra realización de la invención, el resto que se conjuga puede ser un grupo que facilita el transporte activo de los nucleótidos a través de varias barreras celulares. Tales restos pueden ser de origen natural o sintético, incluyendo aminoácidos, péptidos y polipéptidos.

10 En aún otra realización de la invención, el resto que se conjuga puede facilitar el poder dirigir el fármaco a un tejido u órgano particular. Un resto de este tipo incluye anticuerpos monoclonales u otros productos naturales que tienen la propiedad de localizar ciertos tejidos diana.

15 Dos ejemplos de productos naturales, curcumina y aspirina, conjugados con trinucleótidos se muestran en los Esquemas 2 y 3, respectivamente. Tal y como se muestra, el resto que se conjuga se puede acoplar a través de grupos hidroxilo o amino de la base nucleica.

Una unidad de nucleósido está representada por la convención aceptada internacionalmente de dibujo de líneas. En el siguiente ejemplo un ribonucleósido sustituido en 2' está representado con la estructura convencional y en el formato de dibujo de líneas correspondiente.



Las unidades de azúcar fijadas a B₁ y B₂ que dan lugar a un N- o C-nucleósido α o β incluyen, pero no se limitan a, furanosa, deoxirribofuranosa, ribosa y arabinosa.

5 El término "arilo", tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un sistema de anillo carbocíclico monocíclico o policíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos que incluyen, pero no se limitan a fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares.

10 El término "heteroarilo", tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un radical o anillo aromático monocíclico o policíclico (por ejemplo, bicíclico o tricíclico o más) que tiene de cinco a diez átomos en el anillo, de los cuales uno o varios átomos del anillo se selecciona a partir de, por ejemplo, S, O y N; cero, uno o dos átomos del anillo son heteroátomos adicionales seleccionados independientemente a partir de, por ejemplo, S, O y N; y los átomos restantes del anillo son carbono, en donde cualquier N o S contenido dentro del anillo puede estar opcionalmente oxidado. El heteroarilo incluye, pero no se limita a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo y similares.

15 De acuerdo con la invención, cualquiera de los arilos, arilos sustituidos, heteroarilos y heteroarilos sustituidos descritos en este documento, pueden ser cualquier grupo aromático. Los grupos aromáticos pueden estar sustituidos o no sustituidos.

20 El término "alquilo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a radicales de hidrocarburos saturados, de cadena lineal o ramificada que contienen entre uno y seis, o uno y doce átomos de carbono, respectivamente. Ejemplos de radicales alquilo C₁-C₆ incluyen, pero no se limitan a radicales metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, neopentilo y *n*-hexilo; y ejemplos de radicales alquilo C₁-C₁₂ incluyen, pero no se limitan a radicales etilo, propilo, isopropilo, *n*-hexilo, octilo, decilo, dodecilo.

Los términos "aralquilo" o "arilalquilo" incluyen radicales alquilo sustituidos con arilo tales como bencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo y difeniletilo.

25 El término "heterocíclico", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo no aromático de 5, 6 o 7 miembros o a un sistema condensado de grupos bicíclicos o tricíclicos, en donde (i) cada anillo contiene entre uno y tres heteroátomos seleccionados independientemente entre oxígeno, azufre y nitrógeno, (ii) cada anillo de 5 miembros tiene 0 a 1 dobles enlaces y cada anillo de 6 miembros tiene 0 a 2 dobles enlaces, (iii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, (iv) el heteroátomo de nitrógeno puede estar
30 opcionalmente cuaternizado, (v) cualquiera de los anillos anteriores puede estar condensado con un anillo de benceno, y (v) los átomos restantes del anillo son átomos de carbono que pueden estar opcionalmente sustituidos con oxo. Los grupos heterocicloalquilo representativos incluyen, pero no se limitan a [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo y tetrahydrofurilo. Tales grupos heterocíclicos
35 pueden estar sustituidos adicionalmente.

El término "cicloalquilo", tal y como se usa en esta memoria, indica un grupo monovalente obtenido a partir de un compuesto de anillo carbocíclico, monocíclico o policíclico saturado mediante la eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, biciclo [2.2.1] heptilo, y biciclo [2.2.2] octilo.

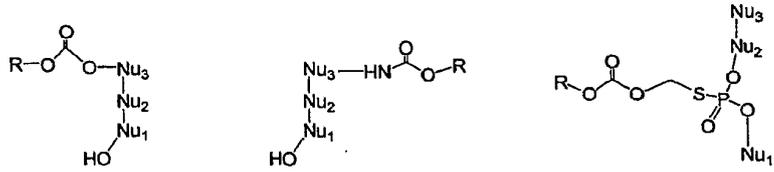
40 Las expresiones "arilo sustituido", "alquilo sustituido", "cicloalquilo", tal y como se emplean en esta memoria, se refieren a grupos arilo, alquilo y cicloalquilo tal y como se han definido anteriormente, sustituidos por el reemplazo independiente de uno, dos o tres, o más de los átomos de hidrógeno en el mismo, con sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, hidroxilo protegido, -NO₂, -CN, -NH₂, amino protegido, -NH-alquilo C₁-C₁₂, -NH-alqueno C₂-C₁₂, -NH-alqueno C₂-C₁₂, -NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NH-arilo, -NH-heteroarilo, -NH-heterocicloalquilo, -dialquilamino, -diarilamino, -diheteroarilamino, -O-alquilo C₁-C₁₂, -O-alqueno C₂-C₁₂, -O-alqueno C₂-C₁₂, -O-cicloalquilo C₃-C₁₂, -O-arilo, -O-heteroarilo, -O-heterocicloalquilo, -C(O)-alquilo C₁-C₁₂, -C(O)-alqueno C₂-C₁₂, -C(O)-alqueno C₂-C₁₂, -C(O)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -C(O)-arilo, -C(O)-heteroarilo, -C(O)-heterocicloalquilo, -CONH₂, -CONH-alquilo C₁-C₁₂, -CONH-alqueno C₂-C₁₂, -CONH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -CONH-arilo, -CONH-heteroarilo, -CONH-heterocicloalquilo, -OCO₂-alquilo C₁-C₁₂, -OCO₂-alqueno C₂-C₁₂, -OCO₂-alqueno C₂-C₁₂, -OCO₂-cicloalquilo C₃-C₁₂, -OCO₂-arilo, -OCO₂-heteroarilo, -OCO₂-heterocicloalquilo, -OCONH₂, -OCONH-alquilo C₁-C₁₂, -OCONH-alqueno C₂-C₁₂, -OCONH-alqueno C₂-C₁₂, -OCONH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -OCONH-arilo, -OCONH-heteroarilo, -OCONH-heterocicloalquilo, -NHC(O)-alquilo C₁-C₁₂, -NHC(O)-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(O)-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(O)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(O)-arilo, -NHC(O)-heteroarilo, -NHC(O)-heterocicloalquilo, -NHCO₂-alquilo C₁-C₁₂, -NHCO₂-alqueno C₂-C₁₂, -NHCO₂-alqueno C₂-C₁₂, -NHCO₂-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHCO₂-arilo, -NHCO₂-heteroarilo, -NHCO₂-heterocicloalquilo, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NH-alquilo C₁-C₁₂, -NHC(O)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(O)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(O)NH-cicloalquilo C₃-

C₁₂, -NHC(O)NH-arilo, -NHC(O)NH-heteroarilo, -NHC(O)NH-heterocicloalquilo, NHC(S)NH₂, -NHC(S)NH-alquilo C₁-C₁₂, -NHC(S)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(S)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(S)NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(S)NH-arilo, -NHC(S)NH-heteroarilo, -NHC(S)NH-heterocicloalquilo, -NHC(NH)NH₂, -NHC(NH)NH-alquilo C₁-C₁₂, -NHC(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(NH)NH-arilo, -NHC(NH)NH-heteroarilo, -NHC(NH)NH-heterocicloalquilo, -NHC(NH)-alquilo C₁-C₁₂, -NHC(NH)-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(NH)-arilo, -NHC(NH)-heteroarilo, -NHC(NH)-heterocicloalquilo, -C(NH)NH-alquilo C₁-C₁₂, -C(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -C(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -C(NH)NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -C(NH)NH-arilo, -C(NH)NH-heteroarilo, -C(NH)NH-heterocicloalquilo, -S(O)-alquilo C₁-C₁₂, -S(O)-alqueno C₂-C₁₂, -S(O)-alqueno C₂-C₁₂, -S(O)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -S(O)-arilo, -S(O)-heteroarilo, -S(O)-heterocicloalquilo, -SO₂NH₂, -SO₂NH-alquilo C₁-C₁₂, -SO₂NH-alqueno C₂-C₁₂, -SO₂NH-alqueno C₂-C₁₂, -SO₂NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -SO₂NH-arilo, -SO₂NH-heteroarilo, -SO₂NH-heterocicloalquilo, -NHSO₂-alquilo C₁-C₁₂, -NHSO₂-alqueno C₂-C₁₂, -NHSO₂-alqueno C₂-C₁₂, -NHSO₂-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHSO₂-arilo, -NHSO₂-heteroarilo, -NHSO₂-heterocicloalquilo, -CH₂NH₂, -CH₂SO₂CH₃, -arilo, -arilalquilo, -heteroarilo, -heteroarilalquilo, -heterocicloalquilo, -cicloalquilo C₃-C₁₂, polialcohalquilo, polialcoxi, -metoximetoxi, -metoxietoxi, -SH, -S-alquilo C₁-C₁₂, -S-alqueno C₂-C₁₂, -S-alqueno C₂-C₁₂, -S-cicloalquilo C₃-C₁₂, -S-arilo, -S-heteroarilo, -S-heterocicloalquilo o metiltiometilo. Se entiende que los arilos, heteroarilos, alquilos y similares se pueden sustituir adicionalmente.

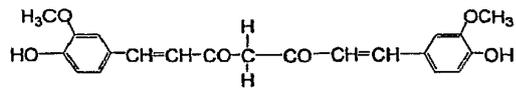
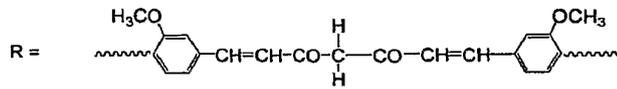
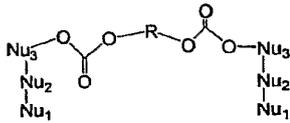
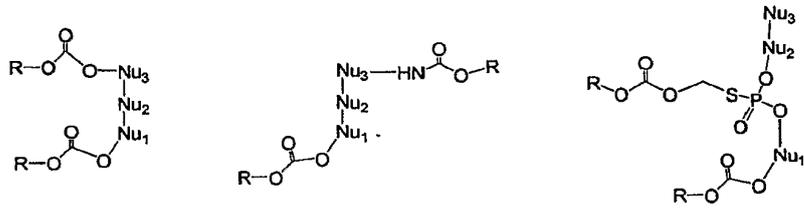
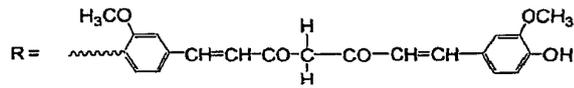
El término "esteroide", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de los numerosos compuestos orgánicos de origen natural o sintéticos, solubles en grasas que tienen como base 17 átomos de carbono dispuestos en cuatro anillos y que incluyen los esteroides y los ácidos biliares, las hormonas adrenales y sexuales, ciertos fármacos naturales tales como los compuestos digitálicos y los precursores de algunas vitaminas. Ejemplos de estructura esteroidea incluyen, pero no se limitan a, colesterol, colestanol, 3 α -ciclo-5- α -colestan-6- β -ol, ácido cólico, formiato de colesterol, formiato de colestano.

La expresión "nucleósido modificado", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, un resto de azúcar modificado o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido de purina o pirimidina no natural, tal y como se describe en esta memoria. Ejemplos de los nucleósidos modificados incluyen, pero no se limitan a, ribonucleósido sustituido en 2', un arabinonucleósido o un 2'-desoxi-2'-fluorarabinósido, desazaadenina, desazaguanina.

Esquema 2

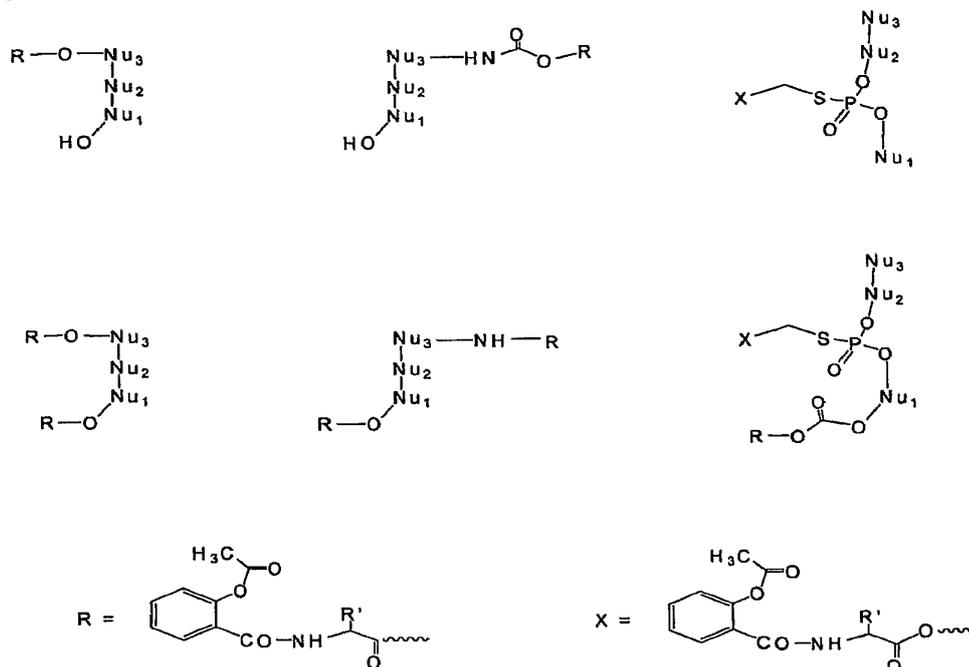


Nu₁, Nu₂, Nu₃ son unidades de nucleótidos



Curcumina

Esquema 3



EJEMPLOS

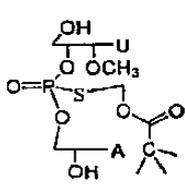
EJEMPLO 1: REACTIVOS Y MÉTODOS

5 En esta memoria se describen ejemplos típicos para la síntesis y la evaluación de profármacos seleccionados (pronucleótidos) y conjugados. Los datos representativos se muestran para el dinucleótido 3-dApsU₂-OMe, pero con modificaciones apropiadas, también se pueden utilizar para otros compuestos reivindicados en esta invención.

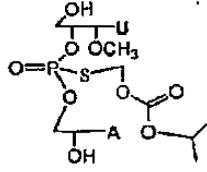
10 En los presentes estudios, la mezcla *R_p*,*S_p* del análogo fosforotioato 3-dApsU₂-OMe (**5**), se sintetizó a gran escala (soporte de vidrio con tamaño de poro controlado (CPG) cargado con 1 milimol de nucleósido) usando química de fosforamidita en fase sólida, (Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. Tetrahedron 1993, 49, 1925) junto con un reactor LOTUS[®] fabricado especialmente (Padmanabhan, S.; Coughlin, J. E.; Iyer, R. P. Tetrahedron Lett. 2005, 46, 343; Iyer, R. P.; Coughlin, J. E.; Padmanabhan, S. Org. Prep. Proc. Intl. 2005, 37, 205). El soporte de CPG ligado a dA se preparó usando nuestro procedimiento de funcionalización y carga ultrarrápida descubierto recientemente para soportes sólidos. Para la sulfuración del producto acoplado a dinucleósido fosfito internucleotídico, se empleó una solución de 3*H*-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido (0,4 M en CH₃CN seco) (Iyer, R. P.; Regan, J. B.; Egan, W.; Beaucage, S. L. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 1253). Después del procesamiento, la purificación cromatográfica y la liofilización, se obtuvo la sal sódica de *R_p*,*S_p* **5** (mezcla ~60:40) con >96% pureza, que se caracterizó por ³¹P y ¹H RMN. La Tabla 3 proporciona las estructuras de los profármacos específicos de **5**, que se habían diseñado, sintetizado y evaluado.

15

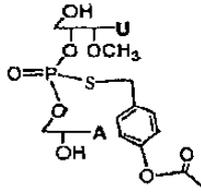
Tabla 3



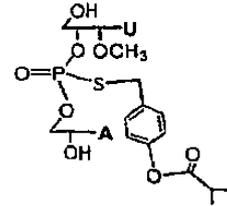
1



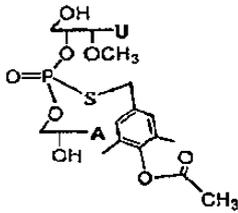
2



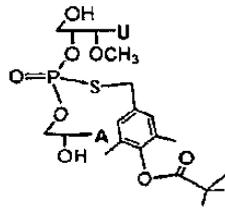
3



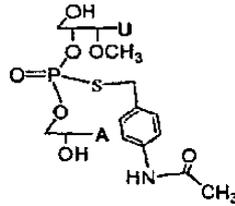
4



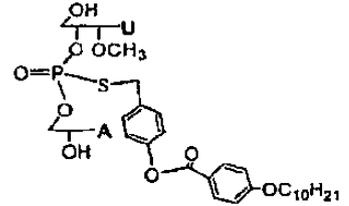
5



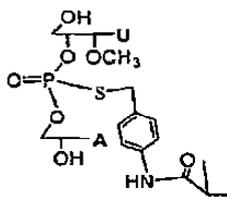
6



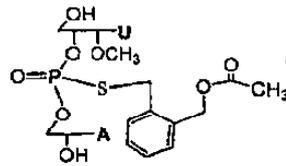
7



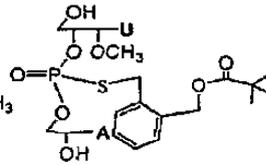
8



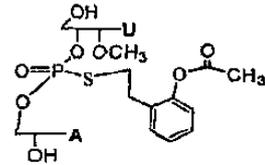
9



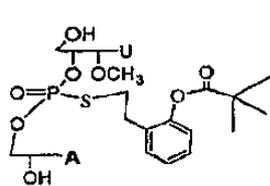
10



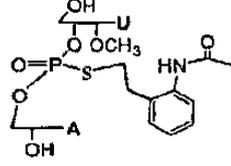
11



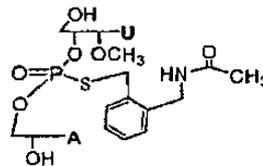
12



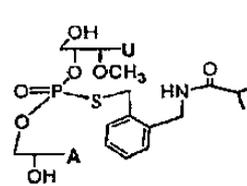
13



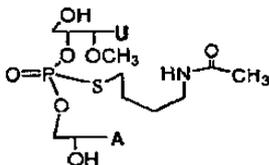
14



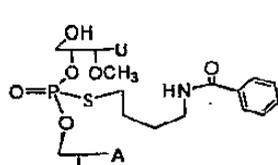
15



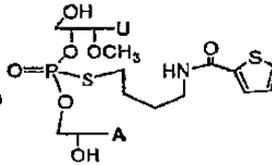
16



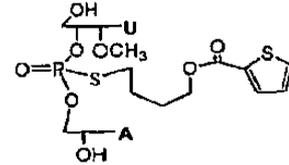
17



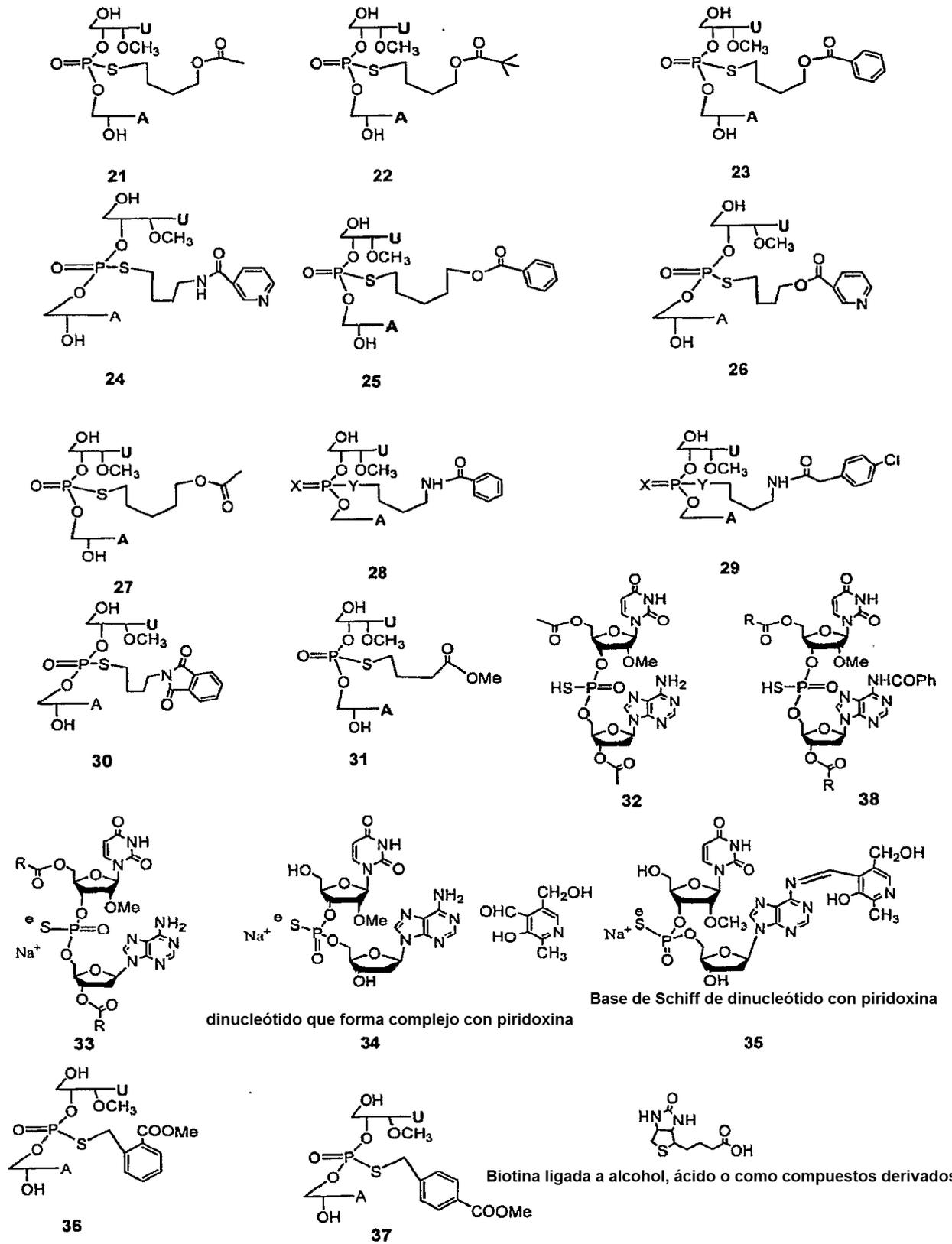
18



19



20



se pueden utilizar derivados de 2-carbometoxibencilo (heteroarilo) sustituidos de forma adecuada, para liberar cualquier fármaco farmacológicamente activo, lo que implica una ciclación intramolecular a través de la hidrólisis del éster *in vivo*.

Además, los profármacos o los derivados de pronucleótidos **6a-j** se sintetizaron con rendimientos del 50 a 70% mediante S-alkilación quimioselectiva de *R_p*,*S_p*-**5** con los correspondientes derivados de yodo o bromo **7a-j** en acetona acuosa o metanol, seguido de elaboración y purificación cromatográfica.

5 Síntesis de pronucleótidos: Preparación representativa del pronucleótido **6a**. A una solución de la sal sódica del dinucleótido (50 mg, 0,082 mmol) en agua (1 mL) se añadió una solución de pivalato de yodometilo (**7a** (Tabla 4), 85 mg, 0,35 mmol) en acetona (2 mL). La reacción se agitó durante una noche en la oscuridad y se concentró con unos pocos mg de bisulfito sódico. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna y **6a** eluyó en una mezcla de DCM/MeOH (90/10). La concentración *al vacío* proporcionó un sólido blanco cromatográficamente puro (³¹P RMN, 28,7, 27,9 δ ppm). Todos los análogos se prepararon usando procedimientos similares (Tabla 4).

10

Tabla 4

Estructura de los comp. intermedios			Evaluación de los pronucleótidos				
#	R	X	#	t _{1/2} (min) en suero	CC ₅₀ (μM) Vero	CC ₅₀ (μM) MDBK	CC ₅₀ (μM) HFF
7a ¹⁷		I	6a	~60*	>1000	>1000	>1000
7b [Ⓢ]		I	6b	~30*	>1000	>1000	>1000
7c [Ⓢ]		Br	6c	n.d. [‡]	>300	>300	100
7d [Ⓢ]		I	6d	%	>1000	>1000	>1000
7e [*]		I	6e	>60 [Ⓢ]	>1000	>1000	n.d
7f [Ⓢ]		I	6f	>120 [Ⓢ]	>1000	>1000	n.d
7g [Ⓢ]		I	6g	>120 [Ⓢ]	>1000	>1000	>1000
7h [*]		Br	6h	~120 [Ⓢ]	>1000	>1000	>1000
7i [Ⓢ]		I	6i	%	>1000	>1000	n.d
7j [Ⓢ]		I	6j	%	>1000	>1000	>1000

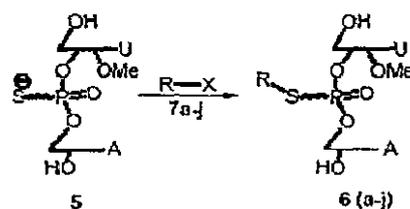
[Ⓢ] preparado por la reacción de R-OH con CsI/BF₃·Et₂O; ^{15a} R-OH con SOBr₂/DCM; [‡] R-OH con SOCl₂/DMF/KI; ^{15b} [Ⓢ] obtenido por reacción de di-yodobutano y nicotinato sódico; ^{*} obtenido de fuentes comerciales.

* Conversión al parental 5 observado; [Ⓢ] La semivida se refiere a la hidrólisis del éster y la conversión adicional a 5 no tuvo lugar; [Ⓢ] el pronucleótido permaneció invariable incluso después de 24 h en suero; [‡] no determinado porque el compuesto no era soluble en DMSO.

Los productos intermedios necesarios **7a-j** se sintetizaron directamente a partir de los compuestos hidroxilo correspondientes (Hayat, S.; Rahman, A-U, Khan, K. M.; Choudhary, M. I.; Maharvi, G. M.; Ullah, Z.; Bayer, E. Synth. Commun.2003, 33, 2531; Fernández, I.; García, B.; Muñoz, S.; Pedro, R.; de la Salud, R. Synlett. 1993, 489) o mediante una reacción de intercambio de halógeno a partir de los correspondientes derivados de cloro (véase el Esquema 4).

15

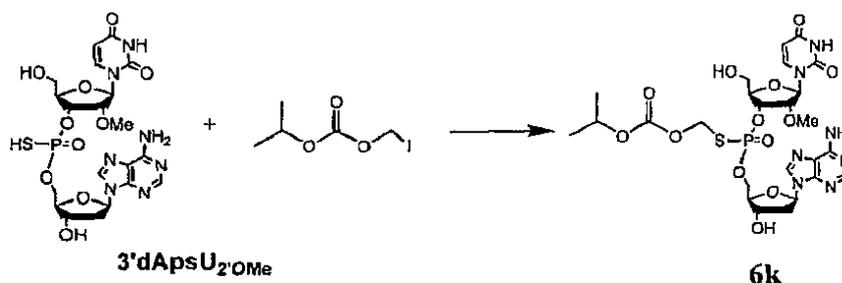
Esquema 4



La ^{31}P RMN de cada análogo de pronucleótido **6a-j** mostró dos picos en el intervalo de 28 a 34 ppm (característicos del resto de triéster tiosulfato) correspondientes a una relación de ~55:45 de los isómeros R_P, S_P (véase la Figura 1).
 5 Una evaluación de la biorreversibilidad de los pronucleótidos se llevó a cabo en suero de conejo en tampón fosfato a 37°C. Con el fin de controlar la conversión hidrolítica de los pronucleótidos al dinucleótido **5**, partes alícuotas de material incubado se retiraron en diferentes puntos temporales, se procesaron y se analizaron usando HPLC de fase inversa. Se encontró que los análogos **6a** y **6b** se convertían fácilmente en el parental **5** con una semivida ($t_{1/2}$) de 60 min y 30 min, respectivamente. Además, la conversión completa de **6a** y **6b** en el parental **5** se produjo en ~3 h. Los análogos **6a** y **6b** eran estables hasta durante 24 h en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,2). Además, no había evidencia de ninguna estereodiferenciación o desulfuración significativa durante la hidrólisis de los isómeros R_P, S_P en la mezcla. Curiosamente, tanto **6a** como **6b** eran resistentes a la acción hidrolítica de la esterasa de hígado de cerdo (PLE) y la quimotripsina bovina (datos no presentados), lo que sugiere que los análogos pueden tener una semivida significativa en el tracto GI que podría facilitar la absorción oral del pronucleótido intacto. Estas observaciones contrastan con el comportamiento de los pronucleótidos correspondientes del dímero TT-PS R_P, S_P en donde se observó una estereodiferenciación significativa, junto con muchas tasas de hidrólisis más lentas en el suero y PLE (Iyer, R. P.; Yu, D.; Agrawal, S. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995, 4, 2471). Es posible que debido a diferentes modos de plegamiento del azúcar en 2'-OMe-uridina (C_3' -endo) en comparación con una timidina (C_2' -endo), la conformación global de **6a** y **6b** pueda ser significativamente diferente de la correspondiente a pronucleótidos del dímero TT. En consecuencia, los grupos éster en **6a** y **6b** pueden estar preparados de manera más favorable para el ataque a través del sitio nucleofílico de las esterases.

Además, todos los análogos eran estables de forma indefinida cuando se almacenaban a -20°C como polvo liofilizado. A continuación examinamos el perfil de citotoxicidad de los derivados de pronucleótidos en diferentes líneas celulares, tales como MDBK, Vero y HFF. Tal y como se muestra en el Esquema 4, la mayoría de los análogos excepto **6c** tenían $CC_{50} > 1000 \mu\text{M}$ en estas líneas celulares, lo que muestra un alto perfil de seguridad para estos compuestos.

EJEMPLO 2. Derivado **6k** de 3'dApsU_{2'}OMe con tiosulfato de S-isopropilcarboniloximetilo



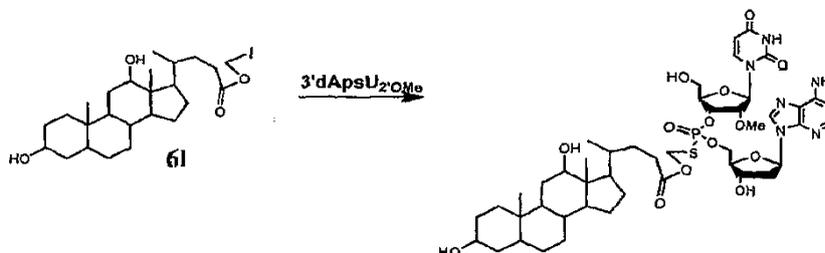
El compuesto diana **6k** se prepara en dos etapas.

30 **Etapla 1. Preparación de carbonato de yodometilisopropilo:** A una solución de yoduro de sodio anhidro (6 g, 40 mmol) en acetonitrilo anhidro (20 mL) se añadió gota a gota carbonato de clorometil isopropilo (2,9 g, 19 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 mL) durante 20 min. La mezcla de reacción, cubierta con papel de aluminio (protegida de la luz) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El sólido separado se filtró, se lavó con acetonitrilo y el material filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en agua (10 mL) y los extractos orgánicos se extrajeron con éter (25 mL). Los extractos de éter se lavaron con bisulfito de sodio (5%, 10 mL), después salmuera (10 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró y se secó a alto vacío en seco. Rendimiento 2,72 g (58%); ^1H -RMN δ 1,3 (d, 6H), 4,95 (m, 1H), 5,95 (s, 2H).

40 **Etapla 2. Alquilación del dinucleótido, 3'-ApsU_{2'}OMe.** A una solución de dinucleótido (60 mg, 0,098 mmol) en agua (HPLC, 400 mL) con agitación, se añadió una solución de carbonato de yodometil isopropilo (80 mg, 0,0166 mmol, 3,33 eq.) en acetona (1 mL). Se añadió acetona adicional (1 mL) para obtener una solución clara para evitar cualquier separación de glóbulos aceitosos de agente alquilante. La mezcla de reacción, cubierta con una hoja de papel de aluminio, se agitó durante 3 h, se concentró en condiciones de evaporador rotatorio y después a alto vacío para obtener la mezcla de reacción como un sólido blanco. Este se purificó por cromatografía en columna de sílice

usando inicialmente cloroformo y lentamente con cloroformo que contenía 2% de metanol hasta finalmente 8% de metanol. Las fracciones que contenían el componente principal, se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío durante una noche. El producto puro deseado **6k** fue aislado con casi rendimiento cuantitativo (68 mg); ^{31}P -RMN (MeOH- d_4) δ 27,7, 28,6.

5 EJEMPLO 3. Preparación de éster de ácido S-metil cólico **6l** de 3'dApsU $_2$ O $_2$ Me

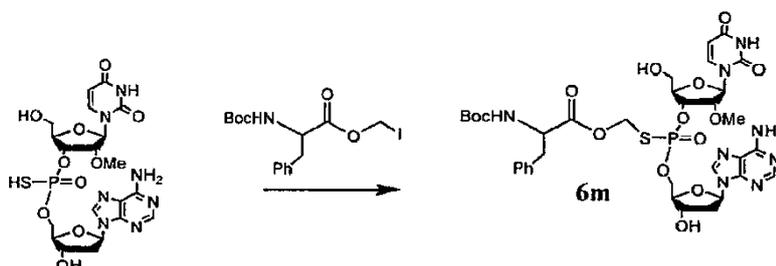


Etapa 1. Síntesis de desoxicolato de clorometilo. A ácido desoxicólico (120 mg, 0,306 mmol) en etanol (4 mL) se añadió una solución de carbonato de cesio (53 mg, 0,160 mmol) en agua (3 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se eliminó el etanol inicialmente con un evaporador rotatorio, y después a alto vacío. El residuo se liofilizó para proporcionar la sal de cesio como un polvo blanco. A una solución de sal de cesio en *N,N*-dimetilformamida (DMF, 3 mL) se añadió bromoclorometano (10 mL) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción cubierta con un papel de aluminio se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Los disolventes se eliminaron y la mezcla de reacción se extrajo en diclorometano (20 mL), se lavó con agua (5 mL), salmuera (5 mL) y se eliminó el disolvente después de secar sobre sulfato de sodio anhidro, para proporcionar el compuesto de clorometilo (100 mg, 74%). Este se utilizó sin ninguna purificación adicional para la conversión al derivado de yodometilo correspondiente.

Etapa 2. Preparación de desoxicolato de yodometilo. A una solución de yoduro de sodio (304 mg, 2,03 mmol) en acetonitrilo anhidro (3 mL) se añadió lentamente éster clorometílico (438 mg, 0,99 mmol) en una mezcla de acetonitrilo (6 mL) y diclorometano (2 mL). La mezcla de reacción, protegida de la luz, se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Después de la concentración, la mezcla de reacción se extrajo en diclorometano (15 mL), la capa orgánica se lavó con agua (5 mL), bisulfito de sodio (5%, 5 mL) y finalmente salmuera (5 mL). Se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el producto crudo obtenido después de la eliminación del disolvente, se purificó por cromatografía en columna de sílice para obtener el compuesto de yodo (110 mg, 21%).

Etapa 3. Acoplamiento de desoxicolato de yodometilo. A una solución de 3'dApsU $_2$ O $_2$ Me (50 mg, 0,082 mmol) en agua (400 mL), se añadió una solución de desoxicolato de yodometilo (110 mg, 2,066 mmol) en acetona (3 mL). El sólido separado se disolvió mediante la adición de más acetona (~6 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante una noche. Se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna de sílice usando cloroformo hasta cloroformo que contenía metanol (2 a 10%). Las fracciones se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para proporcionar el producto deseado **6l** (40 mg, 49%); ^{31}P -RMN (MeOH) δ 28,2, 29,1.

30 EJEMPLO 4. Preparación del análogo **6m** de 3'dApsU $_2$ O $_2$ Me con L-fenilalaninato *N*-(*t*-butoxicarbonilo)



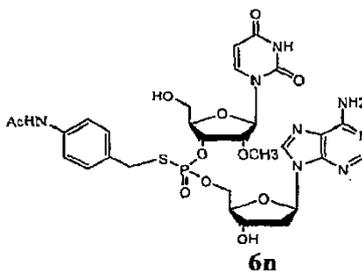
L-fenilalaninato de *N*-(*t*-butoxicarbonilo) de yodometilo. A *N*-(*t*-butoxicarbonil)-L-fenilglicina (663 mg, 2,49 mmol) en etanol (3 mL) se añadió una solución de carbonato de cesio (427 mg, 1,31 mmol) en agua (2 mL). Después de que cesara la evolución de gases, la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. Los disolventes se eliminaron y se liofilizó para obtener la sal de cesio. A una solución de sal de cesio (270 mg, 0,82 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (DMF, 2 mL) se añadió bromoclorometano (5 mL) y se agitó durante una noche con la mezcla de reacción cubierta con papel de aluminio. El sólido separado se filtró, los sólidos se lavaron con DMF (2 mL) y el material filtrado se concentró a alto vacío. Se encontró que el producto (206 mg, 80%) era puro mediante TLC (Hex:EtOAc 4:1). Este producto intermedio se usó para la conversión a compuesto de yodo sin una purificación adicional. A una solución de yoduro de sodio (196 mg, 1,31 mmol) en acetonitrilo anhidro (3 mL), se añadió derivado de fenilalaninato de clorometilo (206 mg, 0,656 mmol) en acetonitrilo anhidro (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, protegida contra la luz, durante una noche. El sólido con DMF (3 mL) se filtró y se lavó, y el material

filtrado se concentró a vacío. El residuo se extrajo en diclorometano (10 mL) y agua (5 mL), se lavó la capa orgánica con NaHSO_3 (5%, 5 mL) y salmuera (saturada, 5 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró, para proporcionar el compuesto de yodo deseado (199 mg, 75%).

5 **Alquilación de 3'dApsU_{2'}OMe.** A una solución de 3'dApsU_{2'}OMe (44 mg, 0,072 mmol) en agua (400 ul), se añadió el yoduro (100 mg, 0,25 mmol) en acetona (800 ul) y la mezcla de reacción se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a vacío, se liofilizó y se purificó por cromatografía en columna de sílice utilizando cloroformo y una mezcla que contenía cloroformo y metanol (2% a 10%). Se recogieron las fracciones, se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para proporcionar el producto 6m acoplado a fenilalanina protegido con *t*-Boc (40 mg, 65%); ³¹P-RMN (MeOH-d₄) δ 28,7, 27,9.

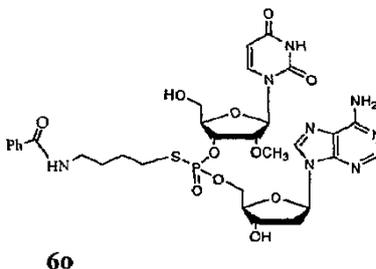
10 EJEMPLO 5. Preparación del derivado 6n de 3'dApsU_{2'}OMe con 4-acetamidobencilo

Preparación de alcohol 4-acetamidobencilico. A una solución de 4-acetamidobenzaldehído (10 g, 61,3 mmol) en metanol (100 mL) se añadió borohidruro de sodio (800 mg) a temperatura ambiente en porciones. La mezcla de reacción se agitó durante una noche, y el progreso de la reacción se comprobó mediante TLC usando 4:1 de hexanos:EtOAc como eluyente. La ausencia de material de partida indicaba la finalización de la reducción y la
15 mezcla de reacción se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se repartió entre agua (25 mL) y acetato de etilo (4 X 50 mL) y la capa orgánica se lavó con salmuera (25 mL). La capa de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio anhidro y la eliminación del disolvente proporcionó el alcohol como un sólido amarillo pálido, que se secó a alto vacío. 8,6 g (85%); ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 2,0 (s, 3H), 4,5 (d, 2H), 5,2 (t, 1H), 7,25 (d, 2H), 7,55 (d, 2H), 9,95 (s, 1H).



Preparación de yoduro de 4-acetamidobencilico. A una solución enfriada de DMF anhidro (5 mL) se añadió cloruro de tionilo (0,2 mL, 2,8 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min y se añadió una solución de KI (2,49 g, 15 mmol) en DMF anhidro (12 mL), seguida de la adición de alcohol (0,165 g, 1 mmol). La mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo durante 3 h y se dejó agitar a t.a. durante una noche. La mezcla de reacción se vertió en hielo-agua (25 mL) y se extrajo con éter (3 X 25 mL). La capa de éter se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para eliminar el disolvente. Se obtuvo el producto (138 mg, 50%) como un sólido amarillo limpio. (TLC Hex:EtOAc (1:1) ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,17 (s, 3H), 4,45 (s, 2H), 7,17 (br.s, 1H), 7,33 (d, 2H), 7,43 (d, 2H). Este compuesto se preparó también con rendimientos mejorados (~75%) utilizando yoduro de cesio y eterato de trifluoruro de boro en acetonitrilo. El acoplamiento del yoduro de 4-acetamidobencilico con 3'dApsU_{2'}OMe se realizó
25 como se ha descrito para el ácido cólico análogo de antes.

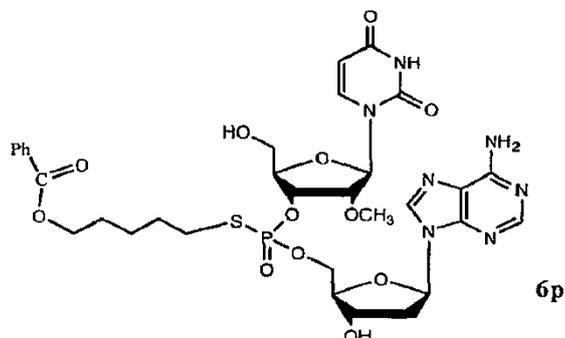
30 EJEMPLO 6. Síntesis del análogo 6o de 3'dApsU_{2'}OMe con 4-benzamidobutilo



Preparación de yoduro de 4-benzamidobutilo: a DMF anhidra fría (5 mL) a 0-5°C se añadió cloruro de tionilo (0,2 mL) y la mezcla se agitó durante 15 min. Se añadió una solución de yoduro de potasio (2,4 g, 5 mmol) en DMF anhidra (8 mL) seguida de una solución de 4-benzamidobutanol (193 mg, 1 mmol) en DMF anhidra (2 mL). La mezcla de reacción con color se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se trató vertiéndola en agua enfriada con hielo (~10 mL) y se extrajo con éter (3 X 15 mL). Finalmente, la capa de éter se lavó con agua, salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El producto crudo, obtenido después de la filtración y la eliminación del disolvente, se purificó por cromatografía en columna, usando una mezcla de hexano y acetato de etilo (4:1) para proporcionar el compuesto de yodo como un aceite. 45%; ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,77 (m, 2H), 1,93 (m, 2H), 3,23 (t, 2H), 3,55 (q, 2H), 6,26 (br.s, 1H), 7,48 (m, 3H), 7,75 (m, 2H).
40

El acoplamiento del yoduro de 4-benzamidobutilo con 3'dApsU_{2'}OMe se llevó a cabo como anteriormente para obtener el compuesto del título 6o.

EJEMPLO 7. Síntesis del análogo de 3'dApsU_{2'}OMe con 5-benzoiloxipentilo



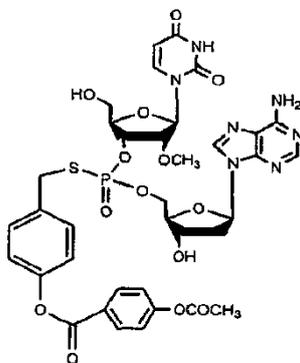
6p

- 5 **Preparación de 5-benzoiloxipentan-1-ol:** Una mezcla de ácido benzoico (1 g), 1,5-pentanodiol (5 mL) y ácido *p*-toluenosulfónico (110 mg) se calentó en un baño de aceite a 100°C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua (50 mL) y se extrajo con EtOAc (2 X 25 mL), se lavó con sodio carbonatado (5%, 20 mL) seguido de salmuera (15 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar el producto casi puro (1,15 g, 67%).
- 10 **Preparación de 5-benzoiloxi-1-yodopentano.** 36% de rendimiento. ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,57 (m, 2H), 1,85 (m, 4H), 3,22 (t, 2H), 4,33 (t, 2H), 7,44 (m, 2H), 7,57 (m, 1H), 8,04 (m, 2H).

El acoplamiento de 5-benzoiloxi-1-yodopentano con 3'dApsU_{2'}OMe se llevó a cabo como anteriormente.

Preparación de 5-benzoiloxibutan-1-ol: Se preparó con un rendimiento del 73% usando 1,4-butanodiol en el procedimiento de 5-benzoiloxipentan-1-ol.

- 15 **EJEMPLO 8. Síntesis del análogo 6q de 3'dApsU_{2'}OMe con 4-acetoxibencilo**



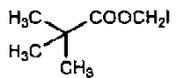
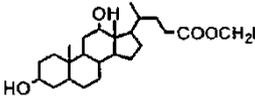
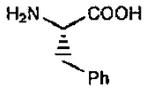
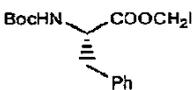
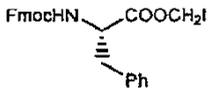
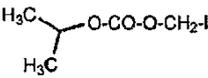
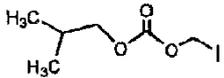
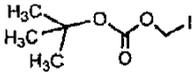
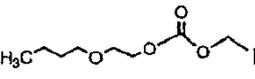
6q

- Etapas 1. Preparación de alcohol 4-acetoxibencílico:** A una suspensión enfriada de alcohol 4-hidroxibencílico (1,95 g, 14 mmol) en acetato de etilo (25 mL) en un baño de hielo, se añadió trietilamina (2,1 mL, 14,9 mmol) en un lote con agitación. Se añadió gota a gota una solución de cloruro de acetilo (1,1 mL, 15,5 mmol) en acetato de etilo (12 mL) desde un embudo de adición. La mezcla de reacción se agitó durante una noche. El sólido se filtró, se lavó con acetato de etilo y el residuo, después de la concentración, se purificó por cromatografía en columna usando inicialmente hexanos y después gradualmente acetato de etilo al 40%. Rendimiento del 40%. ¹H-RMN (CDCl₃), δ 2,02 (br. s, 1H), 2,29 (s, 3H), 4,65 (s, 2H), 7,07 (d, 2H), 7,36 (d, 2H).
- 20 **Etapas 2. Preparación de yoduro de 4-acetoxibencilo:** A una solución de alcohol 4-acetoxibencílico (0,332 g, 2 mmol) y yoduro de cesio (0,571 g, 2,2 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 mL) bajo atmósfera de nitrógeno, se introdujo eterato de trifluoruro de boro (0,28 mL, 2,2 mmol) en acetonitrilo (5 mL). Después de agitar durante una noche, la mezcla de reacción se vertió en agua enfriada con hielo (20 mL) y el sólido separado se filtró, se lavó con agua y después con hexanos. El producto se secó a alto vacío. Rendimiento, 0,39 g, 71%; TLC, hexanos: EtOAc (4:1). ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,3 (s, 3H), 4,35 (s, 2H), 7,05 (d, 2H), 7,5 (d, 2H).
- 25 **Etapas 3. Síntesis del análogo de 3'dApsU_{2'}OMe con 4-acetoxibencilo.** La alquilación de 3'dApsU_{2'}OMe con yoduro de 4-acetoxibencilo se llevó a cabo como anteriormente.
- 30

EJEMPLO 9. Ensayos de citotoxicidad: Los ensayos MTT convencionales se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando el kit del ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter96 de Promega, junto con un lector de placas de 96 pocillos (ThermoMax, Molecular Devices), y utilizando las líneas celulares MDBK, Vero y HFF (obtenidas de la ATCC).

- 5 Se utilizaron varios controles incluyendo los análogos de nucleósido 3TC, AZT, ddC, así como medios sin fármaco. SDS se utilizó como control citotóxico positivo. Todos los pronucleótidos se sometieron a ensayo por triplicado a concentraciones de 100, 300 y 1000 μM . Después de 24 horas de incubación de las células con la sustancia del ensayo, se llevó a cabo el ensayo MTT. Los datos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Datos de ^{31}P -RMN y de la citotoxicidad sobre profármacos seleccionados					
Profármacos	Agente alquilante	^{31}P (δ ppm)	Ensayo de citotoxicidad (μM)		
			Vero	MDBK	HFF
6a (9001)		27,9, 28,7	>1000	>1000	>1000
6l (9023)		29,7, 30,5	>1000	>1000	>1000
		-	-	-	-
6m (9022)		27,9, 28,7	>1000	>1000	>1000
6r		27,5, 28,4	n. d.	n. d.	n. d.
6k		27,7, 28,6	>1000	>1000	>1000
6s		27,1, 27,9	>1000	>1000	>1000
6t		26,0, 26,7	>1000	>1000	>1000
6u		31,4, 32,3	>1000	>300	>1000

10

EJEMPLO 10. Evaluación de la biorreversibilidad de los profármacos.

Los estudios de biorreversibilidad se llevaron a cabo del modo siguiente: una solución madre de cada análogo se preparó disolviendo 2 mg en 100 μl de DMSO. Se diluyeron 10 μl de partes alícuotas con 90 μl de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,0) y 100 μl de partes alícuotas de suero de conejo. La mezcla se incubó a 37°C en un baño de agua. Se retiraron las partes alícuotas en diferentes puntos de tiempo y se diluyeron con 200 μl de metanol para detener la reacción. A continuación, se centrifugó el material incubado, el material sobrenadante se concentró en un Speed Vac

15

y se diluyó con 200 µl de tampón acetato de amonio 0,1 M antes de la inyección en la HPLC. El análisis por HPLC de fase inversa se llevó a cabo usando un aparato Waters Instrument equipado con un controlador 600Egradient, y un detector de matriz de fotodiodos 996 con el programa informático Millennium. Se empleó una columna X-terra MS C18 de 2,5 µm, de 2,1 X 20 mm y un gradiente de funcionamiento de 100% de A hasta 80% de B durante 30 minutos de tampón A (NH₄OAc 0,1 M) y tampón B (80:20 de CH₃CN:NH₄OAc). El tiempo de retención de los profármacos oscilaba de 16 a 18 minutos, mientras que el del dinucleótido Rp,Sp **5** era de 13,5, 13,8 minutos.

Típicamente, por ejemplo, el profármaco **6m** obtenido a partir de aminoácidos y el derivado de carbonato experimentaron una conversión casi completa a 3'dApsU_{2'OMe} en ~3 h con tratamiento de suero. Otros profármacos tenían diferentes tasas de conversión al dinucleótido parental. Algunos profármacos no se convertían de nuevo en el parental en las condiciones del experimento.

EJEMPLO 11. Estabilidad. Se examinó la estabilidad de los profármacos en líquido gástrico simulado (LGS) y líquido intestinal simulado (LIS) a 37°C. El LGS y el LIS se prepararon siguiendo los procedimientos indicados y los profármacos se incubaron por separado con el LGS y el LIS durante 1 hora a 37°C, se procesaron y se analizaron mediante HPLC de fase inversa. Se encontró que el dinucleótido parental 3'dApsU_{2'OMe} no era estable en LGS, descomponiéndose en aproximadamente 15 minutos, pero era relativamente estable en LIS. Todos los profármacos eran significativamente estables en LGS con semividas que oscilaban desde 1 a 3 horas. En el LIS, los profármacos de S-aciloxialquilo se convirtieron en el dinucleótido parental con una semivida de aproximadamente 1 h.

EJEMPLO 12. Biodisponibilidad oral. Se determinó la biodisponibilidad oral de los profármacos en ratones CD-1. Cada uno de los profármacos representativos **6a**, **6k**, **6l** se disolvió en agua y se administró a grupos de ratones mediante alimentación oral forzada. Para el estudio se utilizaron ratones Swiss-Webster machos que pesaban entre 20 y 30 g (Charles River Labs). En los puntos de tiempo designados de 5, 15, 30, 60 y 120 minutos, los ratones fueron sacrificados y la sangre se recogió por punción cardiaca. Se extirpó el hígado, el riñón, el estómago, el duodeno, el yeyuno, el íleon y el cerebro y se congelaron en hielo seco hasta su procesamiento. Se separó el plasma de la sangre por centrifugación y se procesó para analizar el contenido en fármaco mediante HPLC de fase inversa. Los niveles de cada profármaco y/o de 3'dApsU_{2'OMe} parental se determinaron por HPLC analítica. Las muestras de tejido (principalmente hígado) se procesaron después de la homogeneización en 1% de SDS en presencia de NaOAc 0,1 M. El material homogeneizado se añadió a un concentrador PALL 50K y se centrifugó durante 2 horas a 3000 rpm. Una muestra se ejecutó en una columna de HPLC de fase inversa (columna X-Terra de 2,1 X 20 mm), caudal de 1 mL/min, gradiente durante 30 min desde 100% de A (NH₄OAc 0,1 M) hasta 100% de B (acetonitrilo:NH₄OAc 0,1 M, 80:20). En el caso de sangre, el profármaco se podía detectar en puntos de tiempo tempranos, mientras que en puntos de tiempo posteriores, se observó principalmente el dinucleótido parental 3'dApsU_{2'OMe}. En el caso de hígado, se observó principalmente 3'dApsU_{2'OMe}. Estas observaciones son compatibles con la absorción oral del profármaco, seguida de una conversión mediada por enzimas, desde el profármaco a 3'dApsU_{2'OMe}. Lo más probable, las enzimas responsables de la conversión del profármaco a 3'dApsU_{2'OMe} son estererasas, encontradas tanto en la sangre como en los tejidos. La estimación de los rangos de la biodisponibilidad oral oscilaba desde un 5 a un 15% en el plasma y el hígado.

EJEMPLO 13. Actividad anti-VHB *in vivo* de los profármacos. Ciertos profármacos se evaluaron en el modelo de ratón transgénico de infección por VHB. Se utilizaron ratones transgénicos machos, infectados con VHB, con una edad que oscilaba desde 78 a 108 días. Los profármacos **6a** y **6k** se evaluaron inicialmente con una sola dosis de 300 a 400 mg/kg, administrada diariamente durante 14 días, mediante alimentación oral forzada. Los compuestos se administraron en ácido cítrico y se utilizó adefovir dipivoxil como control positivo. Un grupo de control que recibió vehículo, se utilizó como control negativo. Después del tratamiento, los ratones se sacrificaron y el tejido hepático se analizó en busca de ADN de VHB, usando análisis de transferencia Southern. Los datos se evaluaron estadísticamente mediante ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis y se muestran en el gráfico de la Figura 2. Ambos profármacos **6a** y **6k** producían hasta una reducción logarítmica de 2 del ADN de VHB hepático, en comparación con el control no tratado, lo que era estadísticamente significativo con valores de p de 0,01 a 0,001.

EJEMPLO 14. Efecto de la administración oral de los compuestos 6a y 6k sobre el virus de la hepatitis B en ratones transgénicos.

Ratones transgénicos machos y hembras (inicial 1.3.32) se infectaron con el virus de la hepatitis B humana. Después de la infección, a los animales se administraron por vía oral los compuestos **6a** o **6k**, o un placebo de ácido cítrico 0,05 M, pH 2,0, una vez al día, durante 14 días. Las dosificaciones eran de 400 mg/kg/d, para el compuesto **6a** y 300 mg/kg/d para el compuesto **6k**. El control positivo, ADV, se administró a 10 mg/kg/d. Los datos se resumen en las Tablas 6 y 7. La significación estadística se indica como *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001 en comparación con el vehículo placebo. Las mediciones de suero HBeAg, PEI se indican según el ensayo estandarizado de "International Immuno Diagnostics", utilizando las Unidades Internacionales de Paul Ehrlich (PEI U). El estudio también estableció que no había una toxicidad aparente con las dosis elevadas empleadas.

Tabla 6

Fármaco	Dosificación (mg/kg/d)	% de cambio de peso \pm de	ADN de VHB hepático en QPCR (pg/ μ g media \pm de)	ADN de VHB hepático en transferencia Southern (pg/ μ g media \pm de)	ARN de VHB hepático (log de transcritos \pm de)
6a	400	4,5 \pm 3,5	24,3 \pm 19	10,5 \pm 9,3**	11,4 \pm 0,4
6k	300	4,3 \pm 1,8	13,3 \pm 12	5,7 \pm 3,2**	10,8 \pm 0,4
ADV	10	5,2 \pm 1,5	1,7 \pm 1,1**	0,9 \pm 1,1***	10,5 \pm 0,4
placebo	--	2,7 \pm 2,9	65 \pm 79	57 \pm 36	10,6 \pm 0,5

Tabla 7

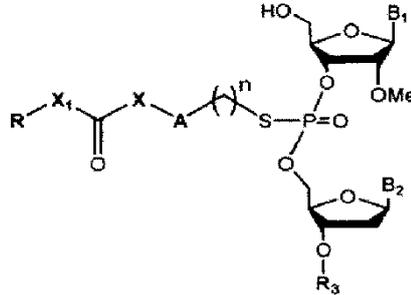
Fármaco	Dosificación (mg/kg/d)	HBeAg sérico, PEI U/mL ^a (media \pm de)	HBsAg sérico (señal/unidades de corte \pm de)
6a	400	64 \pm 6,0	68 \pm 66
6k	300	67 \pm 0,6	55 \pm 59
ADV	10	59 \pm 9,7	73 \pm 52
placebo	--	66 \pm 0,9	86 \pm 59

- 5 La bibliografía científica y de patentes a la que hace referencia el presente documento establece la información que está disponible para los expertos en la técnica.

Si bien esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a las realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y los detalles de la misma, sin apartarse del alcance de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un pronucleótido representado por la fórmula (III):



(III)

5 o los racematos, enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos, tautómeros del mismo, en donde X está ausente o es O, NH, NR, S;

X₁ está ausente o es O, NH;

A está ausente o es arilo, aralquilo;

n es 0, 1, 2, 3, 4, 5;

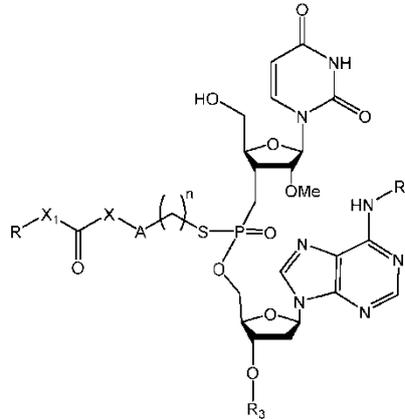
10 R es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo, heterocíclico, O-alquilo, O-heteroarilo, esteroideo;

R₃ se selecciona a partir de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, C(O)-arilo, C(O)O-arilo, C(O)NH-alquilo y C(O)NH-arilo; y

B₁ y B₂ son, independientemente, adenina, guanina, timina, citosina, uracilo o bases nucleicas modificadas.

15

2. Un pronucleótido según la reivindicación 1, representado por la fórmula (IV):

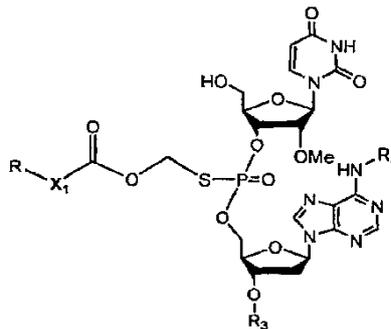


(IV)

en donde R₄ se selecciona a partir de hidrógeno, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, C(O)-arilo, C(O)O-arilo, C(O)NH-alquilo y C(O)NH-arilo; y

20 R, R₃, X, X₁, A y n son como se han definido previamente en la reivindicación 1.

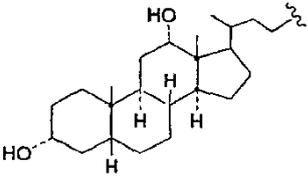
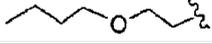
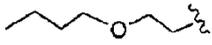
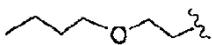
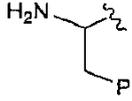
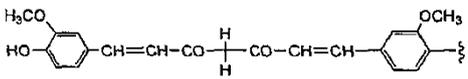
3. Un compuesto según la reivindicación 2, que tiene la Fórmula A1, seleccionado entre los compuestos 1-8 de la Tabla 1:



A1

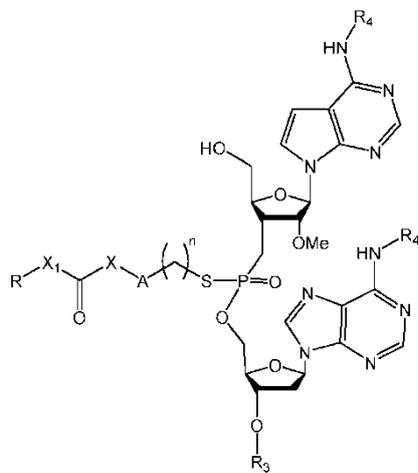
en donde R, X₁, R₃ y R₄ se definen para cada ejemplo en la Tabla 1.

TABLA 1

Nº de Compuesto	R	X ₁	R ₃	R ₄
1		ausente	H	H
2		O	H	H
3		ausente	H	H
4		O	H	H
5		O	C(O)Ph	H
6		O	H	C(O)Ph
7		ausente	H	H
8		O	H	H

4. Un pronucleótido según la reivindicación 1, representado por la fórmula (V):

5

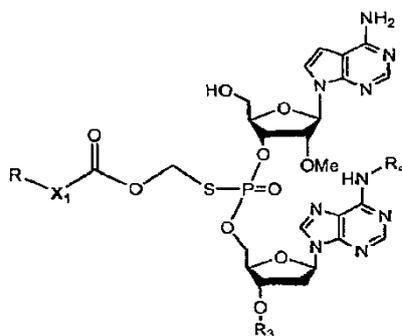


(V)

en donde R_4 se selecciona a partir de hidrógeno, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, C(O)-arilo, C(O)O-arilo, C(O)NH-alquilo y C(O)NH-arilo; y

R, R_3 , X, X_1 , A y n son como se han definido previamente en la reivindicación 1.

5. Un compuesto según la reivindicación 4, que tiene la fórmula B1, seleccionado a partir de los compuestos 9-16 de la Tabla 2:



B1

en donde R, X_1 , R_3 y R_4 se definen para cada ejemplo en la Tabla 2.

TABLA 2

Nº de Compuesto	R	X_1	R_3	R_4
9		ausente	H	H
10		O	H	H
11		ausente	H	H
12		O	H	H
13		O	C(O)Ph	H
14		O	H	C(O)Ph
15		ausente	H	H
16		O	H	H

6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de VHB.
8. Un compuesto para uso según la reivindicación 7, en donde el compuesto es para administrar en combinación con otros agentes.
9. Un compuesto para uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el compuesto es para uso en el tratamiento de cepas resistentes de VHB.

Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 21022006-spring
 EXPNO 21
 PROCNO 1

F2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha 20060221
 Hora 16.50
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 nm Multinuc
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 DISOLVENTE MeOH
 NS 128
 DS 4
 SWH 48661.801 Hz
 FIDRES 0.742520 Hz
 AQ 0.6734324 sec
 RG 14596.5
 DW 10.275 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 d12 0.00002000 sec

***** CANAL f1 *****
 NUC1 31P
 P1 6.00 usec
 PL1 3.00 dB
 SF01 121.3712380 MHz

***** CANAL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 3.00 dB
 PL12 15.14 dB
 PL13 17.00 dB
 SF02 299.8411994 MHz

F2 - Parámetros de procesamiento
 SI 32768
 SF 121.3773070 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

10 Parámetros del gráfico NMA
 CX 20.00 cm
 F1P 106.326 ppm
 F1 12905.60 Hz
 F2P -5.247 ppm
 F2 -636.84 Hz
 PPMCM 5.57865 ppm/cm
 HZCM 667.12164 Hz/cm

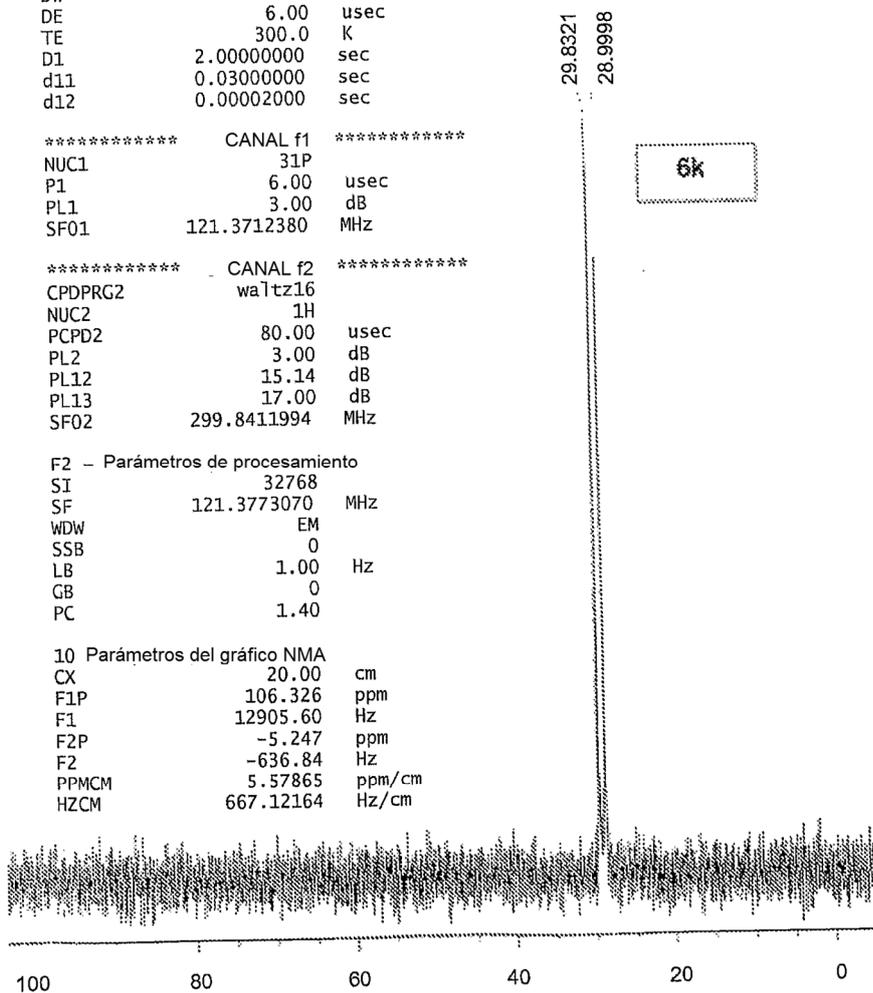


FIG. 1

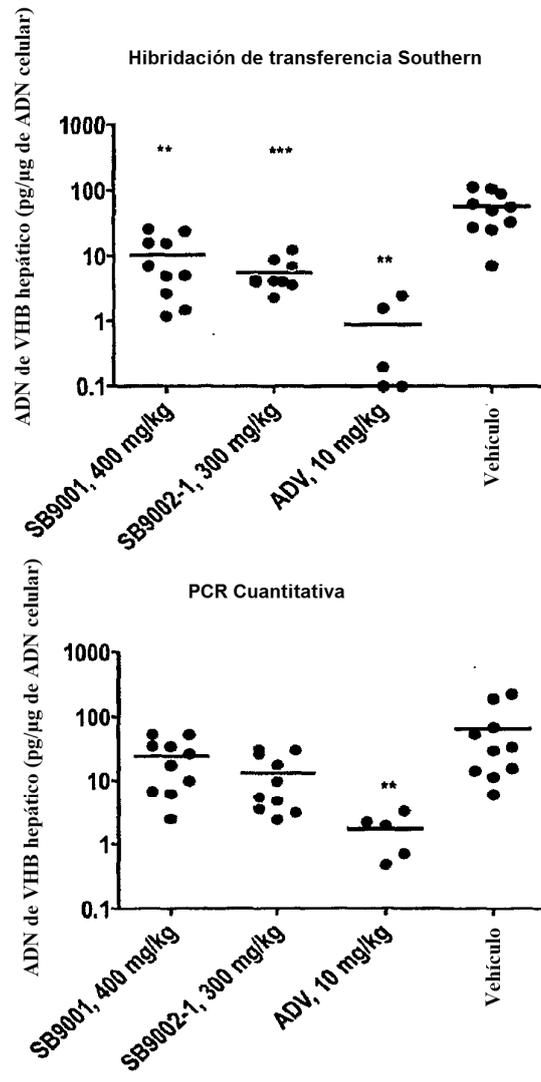


FIG. 2