

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 668**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2004 E 13152340 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2604620**

54 Título: **Análogos de nucleósidos fluorados modificados**

30 Prioridad:

30.05.2003 US 474368 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2016

73 Titular/es:

**GILEAD PHARMASSET LLC (100.0%)
c/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

CLARK, JEREMY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 586 668 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

Análogos de nucleósidos fluorados modificados

5 **Campo de la invención**

La presente invención incluye nucleósidos de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo que tienen la configuración β -D natural y composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

Antecedentes de la invención

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un gran problema de salud que conduce a enfermedad hepática crónica, tal como cirrosis y carcinoma hepatocelular, en un número sustancial de individuos infectados, que se estima es del 2-15 % de la población mundial. Se estima que hay 4,5 millones de personas infectadas solamente en los Estados Unidos de América, conforme al Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen más de 200 millones de individuos infectados en todo el mundo, y cada año se infectan al menos de 3 a 4 millones de personas. Una vez infectadas, aproximadamente el 20 % de las personas desecha el virus, pero el resto mantiene el VHC durante el resto de sus vidas. Del diez al veinte por ciento de los individuos infectados crónicos desarrollan eventualmente cáncer o cirrosis que destruye el hígado. La enfermedad viral es transmitida por vía parenteral por sangre y hemoderivados contaminados, agujas contaminadas o sexualmente y verticalmente de madres infectadas o madres portadoras a su descendencia. Los tratamientos actuales para la infección por VHC, que están restringidos a la inmunoterapia con interferón α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina, tienen beneficios clínicos limitados ya que rápidamente se desarrolla resistencia. Además, no existe una vacuna establecida contra el VHC. Consecuentemente, existe una necesidad urgente de agentes terapéuticos mejorados que combatan efectivamente la infección por VHC crónica.

15

20

25

30

35

40

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

El VHC pertenece a una familia mucho más grande de virus que comparten muchas características en común.

45 *Virus Flaviviridae*

La familia Flaviviridae de virus comprende por lo menos tres géneros distintos: *Pestivirus*, que causan enfermedades en ganado y cerdos; *Flavivirus*, que son la principal causa de enfermedades tales como la fiebre del dengue y la fiebre amarilla y los *Hepacivirus*, cuyo único miembro es el VHC. El género *Flavivirus* incluye más de 68 miembros separados en grupos basados en su relación serológica (Calisher et al., *J. Gen. Virol.*, 1993, 70, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica (Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). Los flavivirus de interés global que se asocian con enfermedades humanas incluyen los virus de la fiebre hemorrágica del dengue (DHF), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa y del síndrome de choque (Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med.*, 1988, 319, 641-643).

50

55

El género *Pestivirus* incluye el virus de la diarrea bovina viral (BVDV), el virus de la fiebre de cerdos clásica (CSFV, también llamada virus del cólera porcino) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV) del ganado ovino (Moennig, V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Las infecciones por pestivirus de ganado domesticado (ganado vacuno, cerdos y ovejas) causan pérdidas económicas significativas en todo el mundo. El BVDV causa una enfermedad de la mucosa en el ganado y es de gran importancia económica en la industria del ganado (Meyers, G. and Thiel, H.J., *Advances in Virus Research*, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al, *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Los pestivirus humanos no han sido caracterizados exhaustivamente como los pestivirus animales. Sin embargo, el seguimiento serológico indica una exposición considerable a pestivirus en humanos.

60

65

Los pestivirus y los hepacivirus son grupos de virus estrechamente relacionados dentro de la familia Flaviviridae. Otros virus estrechamente relacionados en esta familia incluyen los virus GB A, los agentes virales GB similares a los virus A, virus GB-B y virus GB-C (también llamados virus de la hepatitis G, HGV). El grupo hepacivirus (virus de la hepatitis C; VHC) consiste en un gran número de virus estrechamente relacionados pero que pueden distinguirse genotípicamente que infectan a los seres humanos. Existen al menos 6 genotipos del VHC y más de 50 subtipos. Debido a las analogías entre los pestivirus y los hepacivirus, junto con la escasa capacidad de los hepacivirus para crecer eficientemente en cultivos de células, el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) se usa con frecuencia como un sustituto para estudiar los virus VHC.

La organización genética de los pestivirus y de los hepacivirus es muy similar. Estos virus de ARN de hebra positiva tienen un solo marco de lectura abierto (ORF) muy amplio que codifica para todas las proteínas virales necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que es procesada durante y después de la traducción por proteinasas celulares y codificadas por el virus para producir las proteínas virales maduras. Las proteínas virales responsables de la replicación del ARN del genoma viral se localizan aproximadamente en el carboxi terminal. Dos terceras partes del ORF son proteínas denominadas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de la poliproteína de la porción proteica no estructural del ORF para los pestivirus y para los hepacivirus es muy similar. Tanto para los pestivirus como para los hepacivirus, las proteínas no estructurales (NS) maduras, en orden secuencial desde el amino-terminal de la región que codifica para la proteína no estructural hasta el carboxi terminal del ORF, consiste en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

Las proteínas NS de los pestivirus y de los hepacivirus comparten dominios de la secuencia que son característicos de funciones proteicas específicas. Por ejemplo, las proteínas NS3 de los virus en ambos grupos poseen residuos de la secuencia de aminoácidos característicos de las serina proteinasas y de las helicasas (Gorbalenya et al. (1988) Nature 333:22; Bazan and Flsterick (1989) Virology 171: 637-639; Gorbalenya et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17, 3889-3897). Análogamente, las proteínas NS5B de los pestivirus y de los hepacivirus tienen los residuos característicos de las ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, E. V. and Dolja, V. V. (1993) Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 28:375-430).

El papel y las funciones reales de las proteínas NS de pestivirus y hepacivirus en el ciclo de vida de los virus están análogamente dirigidos. En ambos casos, la serina proteinasa NS3 es responsable de todos los procesos proteolíticos de los precursores de la poliproteína en dirección 3' con respecto a su posición en el ORF (Wiskerchen and Collett (1991) Virology 184:341-350; Bartenschlager et al. (1993) J. Virol. 67:3835-3844; Eckart et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Comm. 192:399-406; Grakoui et al. (1993; J. Virol. 67:2832-2843; Grakoui et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10583-10587; Hijikata et al. (1993) J. Virol. 67:4665-4675; Tome et al. (1993) J. Virol. 67:4017-4026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager et al. (1994) J. Virol. 68:5045-5055; Failla et al. (1994) J. Virol. 68: 3753-3760; Xu et al. (1997) J. Virol. 71:53 12-5322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Comm. 215: 160-166; Jin and Peterson (1995) Arch. Biochem. Biophys., 323:47-53; Warrenner and Collett (1995) J. Virol. 69:1720-1726). Por último, las proteínas NS5B de pestivirus y hepacivirus tienen la actividad de ARN polimerasas dirigidas por ARN predicha (Behrens et al. (1996) EMBO. 15:12-22; Lechmann et al. (1997) J. Virol. 71:8416-8428; Yuan et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 232:231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; Zhong et al. (1998) J. Virol. 72.9365-9369).

Tratamiento de la infección por VHC con interferón

Los interferones (IFN) han estado disponibles comercialmente para el tratamiento de la hepatitis crónica durante casi una década. Los IFN son glicoproteínas producidas por células inmunitarias en respuesta a las infecciones virales. Los IFN inhiben la replicación de un gran número de virus, incluyendo el VHC y cuando se usan como único tratamiento contra la infección por el virus de la hepatitis C, el IFN en ciertos casos puede suprimir el ARN del VHC sérico hasta niveles indetectables. Adicionalmente, el IFN puede normalizar los niveles séricos de amino transferasa. Desafortunadamente, el efecto del IFN es temporal y la respuesta sostenida ocurre solamente en 8 %-9 % de los pacientes infectados crónicamente con el VHC (Gary L. Davis. Gastroenterology 18: S104-S114, 2000). La mayoría de los pacientes, sin embargo, tienen dificultades para tolerar el tratamiento con interferón, que causa graves síntomas pseudogripales, pérdida de peso y falta de energía y de vitalidad.

Numerosas patentes divulgan Flaviviridae, incluyendo el VHC y tratamientos que utilizan terapias basadas en interferón. Por ejemplo, la Patente US-5.980.884 de Blatt et al. divulga métodos para la repetición del tratamiento de pacientes afectados con el VHC usando interferón de consenso. La Patente US-5.942.223 de Bazer et al. divulga una terapia anti-VHC usando interferón-tau ovino o bovino. La Patente US-5.928.636 de Alber et al. divulga la terapia de combinación de la interleucina-12 y el interferón alfa para el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyendo VHC. La Patente US-5.849.696 de Chretien et al. divulga el uso de timosina, sola o en combinación con interferón, para el tratamiento del VHC. La Patente US-5.830.455 de Valtuena et al. divulga una terapia de combinación para el VHC que emplea interferón y un eliminador de radicales libres. La Patente US-5.738.845 de Imakawa divulga el uso de proteínas de interferón tau humano para para el tratamiento del VHC. Otros tratamientos basados en interferón para el VHC se divulgan en la Patente US-5.676.942 de Testa et al., la Patente US-5.372.808 de Blatt et al., y la Patente US-5.849.696. Numerosas patentes también divulgan formas pegiladas de interferón,

tales como las patentes US-5.747.646, US-5.792.834 y US-5.834.594 de Hoffmann-La Roche; la Publicación PCT N.º WO 99/32139 y WO 99/32140 de Enzon; WO 95/13090 y la Patente US- 5.738.846 y US-5.711.944 de Schering y la Patente US-5.908.621 de Glue et al.

5 El interferón alfa-2a y el interferón alfa-2b se han aprobado frecuentemente como monoterapias para el tratamiento del VHC. ROFERON®-A (Roche) es la forma recombinante del interferón alfa-2a. PEGASYS® (Roche) es la forma pegilada (es decir, modificada con polietilenglicol) de interferón alfa-2a. INTRON®A (Schering Corporation) es la forma recombinante de interferón alfa-2b y PEG-INTRON® (Schering Corporation) es la forma pegilada del interferón alfa-2b.

10 Otras formas de interferón alfa, así como interferón beta, gamma, tau y omega están actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento del VHC. Por ejemplo, están en fase de desarrollo INFERGEN (interferón alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferón natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, REBIF (interferón beta-la) por Ares-Serono, Interferón Omega por BioMedicine, Interferón Alfa Oral por Amarillo Biosciences e interferón gamma, interferón tau e interferón gamma-lb.

Ribavirina

20 La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de nucleósido antiviral sintético de amplio espectro que no induce interferón, vendido con el nombre comercial de Virazole (The Merck Index, 11ª edición, Editor: Budavari, S., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, p1304, 1989). La Patente US-3.798.209 y RE29.835 divulga y reivindica la ribavirina. La ribavirina es estructuralmente similar a la guanosina y tiene actividad in vitro contra varios virus de ADN y ARN incluyendo los de la familia Flaviviridae (Gary L. Davis. Gastroenterology 118:5104-51 14, 2000).

25 La ribavirina reduce los niveles séricos de amino transferasa hasta niveles normales en el 40 % de los pacientes, pero no disminuye los niveles séricos de ARN del VHC (Gary L. Davis, 2000). Así, la ribavirina sola no es efectiva en reducir los niveles virales de ARN. Adicionalmente, la ribavirina tiene toxicidad significativa y es conocida por inducir anemia. La ribavirina no está aprobada como monoterapia contra el VHC. Ha sido aprobada en combinación con interferón alfa-2a o interferón alfa-2b para el tratamiento del VHC.

30 La ribavirina es un inhibidor de la deshidrogenasa monofosfato de inosina conocido que no tiene actividad específica anti-VHC en el sistema replicón del VHC (Stuyver et al. Journal of Virology, 2003, 77, 10689-10694).

Combinación de Interferón y ribavirina

35 El tratamiento de referencia actual para la hepatitis C crónica es la terapia de combinación con un interferón alfa y ribavirina. La combinación de interferón y ribavirina para el tratamiento de la infección por VHC ha sido descrita como efectiva en el tratamiento de pacientes no tratados previamente con interferón (Battaglia, A.M. et al., Ann. Pharmacother. 34:487-494, 2000), así como para el tratamiento de pacientes con enfermedad histológica (Berenguer, M. et al. Antivir. Ther. 3 (Suppl. 3): 125-136,1998). Los estudios han demostrado que más pacientes con hepatitis C responden a la terapia de combinación de ribavirina/interferón-alfa pegilado que a la terapia de combinación con interferón alfa no pegilado. Sin embargo, al igual que con la monoterapia, se desarrollan efectos secundarios significativos durante la terapia de combinación, incluyendo hemólisis, síntomas pseudogripales, anemia y fatiga. (Gary L. Davis, 2000). La terapia de combinación con PEG-INTRON® (peg- interferón alfa-2b) y cápsulas de REBETOL® (Ribavirina, USP) está comercializada por Schering Corporation. REBETOL® (Schering Corporation) ha sido aprobado también en combinación con INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante, Schering Corporation). PEGASYS® de Roche (interferón alfa-2a pegilado) y COPEGUS® (ribavirina), así como el Ribosphere® de Three River Pharmaceutical también están aprobados para el tratamiento del VHC.

50 Las Publicaciones PCT números WO 99/59621, WO 00/37110, WO 01/81359, WO 02/32414 y WO 03/024461 de Schering Corporation divulgan el uso de la terapia de combinación de interferón alfa pegilado y ribavirina para el tratamiento del VHC. Las Publicaciones PCT números WO 99/15 194, WO 99/64016 y WO 00/24355 de Hoffmann-La Roche Inc. también divulgan el uso de la terapia de combinación de interferón alfa pegilado y ribavirina para el tratamiento del VHC.

Métodos adicionales para tratar infecciones por Flaviviridae

60 Actualmente se están desarrollando nuevos agentes antivirales para infecciones por *Flaviviridae*, especialmente para la hepatitis C. Se están desarrollando inhibidores específicos de las enzimas derivadas del VHC tales como los inhibidores de la proteasa, helicasa y polimerasa. Los fármacos que inhiben otras etapas en la replicación de VHC están también en desarrollo, por ejemplo, fármacos que bloquean la producción de antígenos del VHC a partir del ARN (inhibidores del IRES), fármacos que impiden el procesamiento normal de las proteínas del VHC (inhibidores de la glicosilación), fármacos que bloquean la entrada del VHC a las células (bloqueando su receptor) y agentes citoprotectores no específicos que bloquean el daño celular causado por la infección por el virus. Además, también están siendo desarrollados aspectos moleculares para tratar la hepatitis C, por ejemplo, se están investigando las

ribozimas, que son enzimas que rompen moléculas de ARN virales específicas, oligonucleótidos antisentido, que son segmentos pequeños complementarios de ADN que se unen al ARN viral y que inhiben la replicación viral y las técnicas de interferencia del ARN (Bymock et al. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11:2; 79-95 (2000); De Francesco et al. en *Antiviral Research*, 58: 1-16 (2003) y Kronke et al., *J. Virol.*, 78: 3436-3446 (2004).

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) es un pestivirus que pertenece a la familia *Flaviviridae* y que ha sido usado como sustituto para *ensayos in vitro* de posibles agentes antivirales. Aunque la actividad contra el BVDV puede sugerir actividad contra otros flavivirus, frecuentemente un compuesto puede ser inactivo contra el BVDV y activo contra otros flavivirus. Sommadossi y La Colla han revelado ("Methods and compositions for treating flaviviruses and pestiviruses", PCT WO 01/92282) que los ribonucleósidos que contienen un grupo metilo en la posición 2' "hacia arriba" tienen actividad contra el BVDV. Sin embargo, no está claro si estos compuestos pueden inhibir otros flavivirus, incluido el VHC en un cultivo celular o a nivel de la NS5B del VHC. Es interesante que, aunque esta publicación divulga un gran número de compuestos que son 2'-metil-2'-X-ribonucleósidos, donde X es un halógeno, no se considera el flúor. Además, estos inventores no presentan una vía de síntesis que conduzca a los nucleósidos halogenados en la posición 2' "hacia abajo".

El virus del dengue (DENV) es el agente causal de la fiebre hemorrágica del dengue (DHF). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), dos quintas partes de la población mundial están ahora en riesgo de infectarse con este virus. Se estima que cada año requieren hospitalización unos 500,000 casos de DHF, con una tasa de mortalidad del 5 % en niños.

El virus del Nilo Occidental (WNV), un flavivirus previamente conocido por existir solo en regiones intertropicales, ha emergido en los últimos años en áreas templadas de Europa y Norteamérica, lo que representa un desafío para la salud pública. La manifestación más grave de la infección por el WNV es la encefalitis mortal en seres humanos. Desde 1999 se han descrito brotes en la ciudad de Nueva York e incidencias esporádicas en el sur de los Estados Unidos.

No existe actualmente ningún tratamiento preventivo para infecciones por VHC, virus del Dengue (DENV) o virus del Nilo Occidental. Las terapias aprobadas actualmente, que existen solo contra el VHC, son limitadas. Ejemplos de agentes antivirales que han sido identificados como activos contra el flavivirus de la hepatitis C incluyen:

1) Inhibidores de la proteasa;

Los inhibidores de la proteasa NS3 basados en sustratos (Attwood et al. PCT WO 98/22496, 1998; Attwood et al., *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1999,10, 259-273; Attwood et al., Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents, Publ. de Patente Alemana DE 19914474; Tung et al. Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease, PCT WO 98/17679), incluyendo alfacetoamidas e hidrazinouras e inhibidores que terminan en un electrófilo tales como ácido borónico o fosfonato (Llinas-Brunet et al, Hepatitis C inhibitor peptide analogues, PCT WO 99/07734) están siendo investigados.

Los inhibidores de la proteasa NS3 no basados en sustratos tales como derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitro-benzamida (Sudo K. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 238, 643-647; Sudo K. et al. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1998,9, 186), incluyendo RD3-4082 y RD3-4078, el primero sustituido en la amida con una cadena de 14 carbonos y el último que procesa un grupo para-fenoxifenilo también están siendo investigados.

SCH 68631, una fenantrenquinona, es un inhibidor de la proteasa del VHC (Chu M. et al., *Tetrahedron Letters* 37:7229-7232,1996). En otro ejemplo por los mismos autores, el SCH 351633, aislado a partir del hongo *Penicillium griseofulvum*, se identificó como un inhibidor de la proteasa (Chu M. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 1949-1952). Se ha logrado una potencia nanomolar contra la enzima proteasa NS3 del VHC mediante el diseño de inhibidores selectivos basados en la macromolécula eglina c. La eglina c, aislada a partir de las sanguijuelas, es un potente inhibidor de varias serina proteasas tales como las proteasas A y B de *S. griseus*, α -quimiotripsina, quimasa y subtilisina (Qasim M.A. et al., *Biochemistry* 36: 1598-1607, 1997).

Varias Patentes de los Estados Unidos divulgan inhibidores de la proteasa para el tratamiento del VHC. Por ejemplo, la Patente US-6.004. 933 de Spruce et al. divulga una clase de inhibidores de la cisteína proteasa para inhibir la endopeptidasa 2 del VHC. La Patente US- 5.990.276 de Zhang et al. divulga inhibidores sintéticos de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C. El inhibidor es una subsecuencia de un sustrato de la proteasa NS3 o un sustrato del cofactor NS4A. El uso de enzimas de restricción para tratar el VHC se divulga en la patente US-5.538.865 de Reyes et al. Péptidos como inhibidores de la serina proteasa NS3 del VHC se divulgan en el documento WO 02/008251 de Corvas International, Inc. y en los documentos WO 02/08187 y WO 02/008256 de Schering Corporation. Tripéptidos inhibidores del VHC se divulgan en las Patentes US-6.534.523, US-6.410.531 y US-6.420.380 de Boehringer Ingelheim y en el documento WO 02/060926 de Bristol Myers Squibb. Péptidos de diarilo como inhibidores de la serina proteasa NS3 del VHC se divulgan en el documento WO 02/48172 de Schering Corporation. Imidazolidinonas como inhibidores de la serina proteasa NS3 del VHC se divulgan en el documento WO 02/08198 de Schering Corporation y en el documento WO 02/48157 de Bristol Myers Squibb. Los documentos WO 98/17679 de Vertex

Pharmaceuticals y WO 02/48116 de Bristol Myers Squibb también divulgan inhibidores de la proteasa del VHC.

2) Derivados de tiazolidina que muestran una inhibición importante en el ensayo de HPLC en fase inversa con una proteína de fusión NS3/4A y un sustrato NS5A/5B (Sudo K. et al., *Antiviral Research*, 1996, 32, 9- 18), especialmente el compuesto RD-1-6250, que tiene un residuo cinamoilo fusionado sustituido con una cadena larga de alquilo, RD4 6205 y RD4 6193;

3) Tiazolidinas y benzanilidas identificadas en Kakiuchi N. et al. *J. FEBS Letters* 421, 217-220; Takeshita N. et al. *Analytical Biochemistry*, 1997, 247, 242-246;

4) Una fenantrenquinona que tiene actividad contra la proteasa en un ensayo de SDS-PAGE y autorradiografía aislada a partir del caldo de fermentación del cultivo de *Streptomyces* sp., Sch 68631 (Chu M. et al., *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 7229-7232) y Sch 351633, aislada a partir del hongo *Penicillium griseofulvum*, que presenta actividad en el ensayo de proximidad de centelleo (Chu M. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952);

5) Inhibidores de la helicasa (Diana G.D. et al., *Compounds, compositions and methods for treatment of hepatitis C*, Patente US-5. 633.358; Diana G.D. et al., *Piperidine derivatives, pharmaceutical compositions thereof and their use in the treatment of hepatitis C*, PCT WO 97/36554);

6) Inhibidores de la nucleótido polimerasa y gliotoxina (Ferrari R. et al. *Journal of Virology*, 1999, 73, 1649-1654) y el producto natural cerulenina (Lohmann V. et al, *Virology*, 1998, 249, 108-118);

7) Oligodesoxinucleótidos de fosforotionato antisentido (S-ODN) complementarios a los tramos de la secuencia en la región no codificante (NCR) 5' del virus (Alt M. et al., *Hepatology*, 1995, 22, 707-717) o los nucleótidos 326-348 que comprenden el extremo 3' de la NCR y los nucleótidos 371-388 localizados en la región que codifica para el núcleo del ARN del VHC (Alt M. et al., *Archives of Virology*, 1997, 142, 589-599; Galderisi U. et al., *Journal of Cellular Physiology*, 1999, 181, 251-257);

8) Inhibidores de la traducción dependientes del IRES (Ikeda N. et al., *Agent for the prevention and treatment of hepatitis C*, Publ. de Patente Japonesa JP-8268890; Kai Y. et al. *Prevention and treatment of viral diseases*, Publ. de Patente Japonesa JP-101 01591);

9) Ribozimas, tales como las ribozimas resistentes a nucleasas (Maccjak, D.J. et al., *Hepatology* 1999, 30, resumen 995) y aquellas descritas en la Patente US-6.043.077 de Barber et al., y en las patentes US-5.869.253 y US-5.610.054 de Draper et al.;

10) Análogos de nucleósidos que también se han desarrollado para el tratamiento de infecciones por *Flaviviridae*.

El Idenix Pharmaceuticals divulga el uso de ciertos nucleósidos ramificados para el tratamiento de flavivirus (incluyendo el VHC) y pestivirus en las Publicaciones Internacionales Números WO 01/90121 y WO 01/92282, Específicamente, un método para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C (y flavivirus y pestivirus) en seres humanos y otros animales hospedadores se divulga en las publicaciones de Idenix que incluye la administración de una cantidad efectiva de un nucleósido β -D o β -L ramificado en 1', 2', 3' o 4' biológicamente activo o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo, administrado ya sea solo o en combinación con otro agente antiviral, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El documento WO 2004/002422 de Idenix publicado el 8 de enero de 2004 divulga una familia de 2'-metil nucleósidos para el tratamiento de las infecciones por flavivirus. El documento WO 2004/002999 de Idenix, publicado el 8 de enero de 2004 divulga una serie de profármacos 2' o 3' de nucleósidos ramificados en 1', 2', 3' o 4' para el tratamiento de infecciones por flavivirus incluyendo infecciones por el VHC.

Otras solicitudes de patente que divulgan el uso de ciertos análogos de nucleósidos para tratar la infección por el virus de la hepatitis C, incluyen: PCT/CAOO/O1316 (WO 01/32153; presentada el 3 de noviembre de 2000) y PCT/CAOI/00197 (WO 01/60315; presentada el 19 de febrero de 2001) presentada por BioChem Pharma, Inc. (ahora Shire Biochem, Inc.); PCT/US02/01531 (WO 02/057425; presentada el 18 de enero de 2002) y PCT/US02/03086 (WO 02/057287; presentada el 18 de enero de 2002) por Merck & Co., Inc., PCT/EPOT/09633 (WO 02/18404; publicada el 21 de agosto de 2001) presentada por Roche y las publicaciones PCT números WO 01/79246 (presentada el 13 de abril de 2001), WO 02/32920 (presentada el 18 de octubre de 2001) y WO 02/48 165 de Pharmasset, Ltd.

El documento WO 2004/007512 de Merck & Co. divulga numerosos compuestos de nucleósidos divulgados como inhibidores de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN. Los nucleósidos divulgados en esta publicación son básicamente nucleósidos 2'-metil-2'-hidroxi sustituidos. El documento WO 02/057287 de Merck et al. publicado el 25 de Julio de 2002, divulga un amplio género de nucleósidos derivados de pirimidina con sustituciones 2'-metil-2'-hidroxi. El documento WO 2004/009020 de Merck et al. divulga una serie de derivados de tionucleósido como

inhibidores de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN. El documento WO 03/105770 de Merck et al. divulga una serie de derivados de nucleósidos carbocíclicos que son útiles en el tratamiento de infecciones por el VHC.

5 La publicación PCT N.º WO 99/43691 de Emory University, titulada "2'-Fluoronucleósidos" divulga el uso de ciertos 2'-fluoronucleósidos para tratar el VHC. La Patente US-6.348.587 de Emory University titulada "2'- fluoronucleósidos" divulga una familia de 2'-fluoronucleósidos útiles para el tratamiento de la hepatitis B, el VHC, el VIH y la proliferación celular anormal. Se divulga que el sustituyente 2' está en cualquiera de las posiciones "hacia arriba" o "hacia abajo".

10 Eldrup et al. (V Sesión Oral, Virus de la hepatitis C, Flaviviridae; 16ª Conferencia Internacional de Investigación Antiviral (27 de abril de 2003, Savannah, Ga.)) describieron la relación estructura-actividad de nucleósidos 2'-modificados para la inhibición de VHC.

15 Bhat et al. (V Sesión Oral, Virus de la hepatitis C, Flaviviridae; 16ª Conferencia Internacional de Investigación Antiviral (27 de abril de 2003, Savannah, Ga.); p A75) describieron la síntesis y las propiedades farmacocinéticas de los análogos de nucleósido como posibles inhibidores de la replicación del ARN del VHC. Los autores refieren que los nucleósidos 2'-modificados demostraron una potente actividad inhibitoria en ensayos de replicón basados en células.

20 Olsen et al. (V Sesión Oral, Virus de la hepatitis C, Flaviviridae; 16ª Conferencia Internacional de Investigación Antiviral (27 de abril de 2003, Savannah, Ga.); p A76) también describieron los efectos de los nucleósidos 2'-modificados en la replicación del ARN del VHC.

25 11) Otros compuestos misceláneos que incluyen 1-amino-alquilciclohexanos (Patente US-6,034,134 de Gold et al.), lípidos de alquilo (Patente US-5.922.757 de Chojkier et al.), vitamina E y otros antioxidantes (Patente US-5.922.757 de Chojkier et al.), escualeno, amantadina, ácidos biliares (Patente US-5.846.964 de Ozeki et al.), ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico, (Patente US-5.830.905 de Diana et al.), bencendicarboxamidas (Patente US-5.633.388 de Diana et al.), derivados del ácido poliadenilico (Patente US-5.496.546 de Wang et al.), 2,3-didesoxiinosina (Patente US-5.026.687 de Yarchoan et al.), benzimidazoles (Patente US-5.891.874 de Colacino et al.), extractos de plantas (Patente US-5.837.257 de Tsai et al., Patente US-5.725.859 de Omer et al. y Patente US-6.056.961) y piperidinas (Patente US- 5.830.905 de Diana et al.).

30 12) Otros compuestos actualmente en desarrollo clínico o preclínico para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C incluyen: interleucina-10 de Schering-Plough, IP-SOI de Intemeuron, merimebodib (VX-497) de Vertex, AMANTADINE® (Symmetrel) de Endo Labs Solvay, HEPTAZYME® de RPI, IDN-6556 de Idun Pharma., XTL-002 d XTL., VHC/MFS9 de Chiron, CIVACIR® (inmunoglobulina para la hepatitis C) de NABI, LEVOVIRIN® de ICN/Ribapharm, VIRAMIDINE® de ICN/Ribapharm, ZADAXIN® (timosina alfa-1) de SciClone, timosina más interferón pegilado de Sci Clone, CEPLENE® (diclorhidrato de histamina) de Maxim, VX 950/LY 570310 de Vertex/Eli Lilly, ISIS 14803 de Isis Pharmaceutical/Elan, IDN-6556 de Idun Pharmaceuticals, Inc., JTK 003 de AKROS Pharma, BILN-2061 de Boehringer Ingelheim, CellCept (micofenolato mofetilo) de Roche, T67, un inhibidor de la β-tubulina, de Tularik, una vacuna terapéutica dirigida a E2 de Innogenetics, FK788 de Fujisawa Healthcare, Inc., IdB 1016 (Siliphos, silibin-fosfatidilcolina fitosoma oral), inhibidores de la replicación del ARN (VP50406) de ViroPharma/Wyeth, vacuna terapéutica de Intercell, vacuna terapéutica de Epimmune/Genencor, inhibidor del IRES de Anadys, ANA 245 y ANA 246 de Anadys, inmunoterapia (Therapore) de Avant, inhibidor de la proteasa de Corvas/Schering, inhibidor de la helicasa de Vertex, inhibidor de la fusión de Trimeris, terapia de linfocitos T de CellExSys, inhibidor de la polimerasa de Biocryst, química del ARN dirigida de PTC Therapeutics, Dication de Immtech, Int., inhibidor de la proteasa de Agouron, inhibidor de la proteasa de Chiron/Medivir, terapia antisentido de AVI BioPharma, terapia antisentido de Hybridon, hemopurificador de Aethlon Medical, vacuna terapéutica de Merix, inhibidor de la proteasa de Bristol-Myers Squibb/Axys, Chron-VacC, una vacuna terapéutica, de Tripep, UT 231 B de United Therapeutics, inhibidores de la proteasa, la helicasa y la polimerasa de Genelabs Technologies, inhibidores del IRES de Immusol, R803 de Rigel Pharmaceuticals, INFERGEN® (interferón alfacon-1) de InterMune, OMNIFERON® (interferón natural) de Viragen, ALBUFERON® de Human Genome Sciences, REBIF® (interferón beta-1a) de Ares-Serono, interferón omega de BioMedicine, interferón alfa oral de Amarillo Biosciences, interferón gamma, interferón tau e interferón gamma-1b de InterMune. Rigel Pharmaceuticals está desarrollando un inhibidor no nucleósido de la polimerasa del VHC, R803, que se muestra prometedor por ser sinérgico con IFN y ribavirina.

55 13) Un resumen de varios fármacos en investigación incluyendo varios de los descritos anteriormente, que están actualmente en las distintas fases de desarrollo para el tratamiento del VHC se resumen a continuación:

Fármaco	Mecanismo/Diana	Empresa	Situación en los EE.UU.
BILN-2061	Inhibidor de la serina proteasa NS3	Boehringer Ingelheim	Fase II
ISIS 14803	Antisentido / Evita la traducción del ARN	ISIS / Elan	Fase II
Viramidina	Profármaco de la ribavirina	Ribapharm	Fase II
NM 283	Inhibidor de la ARN	Idenix	Fase II / III

	polimerasa del VHC		
VX-497	Inhibidor de la IMPDH	Vertex	Fase I / II
JKT-003	Inhibidor de la ARN polimerasa del VHC	Japan Tobacco / Akros	Fase I / II
Levovirina	Análogo de la L-ribavirina	Ribapharm / Roche	Fase I / n
Isatoribina; ANA245	Análogo nucleosídico que interacciona con el receptor TLR7	Anadys	Fase I
Albuferon	Modulador inmunitario	Human Genome Sciences	Fase I
Peg-Infergen	Modulador inmunitario	Intermune	Fase I
VX-950	Inhibidor de la proteasa NS3-4A del VHC	Vertex	Preclínica
SCH 6	Inhibidor de la proteasa NS3-4A del VHC	Schering Plough	Preclínica
R803	Inhibidor de la ARN polimerasa del VHC	Rigel	Fase I
HCV-086	--	ViroPharma/Wyeth	Fase I
R1479	Inhibidor de la ARN polimerasa del VHC	Roche	Fase I

Los profármacos de los nucleósidos han sido descritos anteriormente para el tratamiento de otras formas de hepatitis. Los documentos WO 00/09531 y WO 01/96353 de Idenix Pharmaceuticals, divulgan 2'-desoxi- β -L-nucleósidos y sus profármacos 3' para el tratamiento del VHB. La Patente US-4.957.924 de Beauchamp divulga varios ésteres de aciclovir terapéuticos.

En vista del hecho que la infección por el VHC ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo y que tiene efectos trágicos en los pacientes infectados, sigue existiendo una gran necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos efectivos para tratar la hepatitis C que tengan una baja toxicidad para el hospedador.

Además, en vista del creciente reto de otras infecciones por *Flaviviridae*, sigue existiendo una gran necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos efectivos que tengan una baja toxicidad para el hospedador.

Sumario de la invención

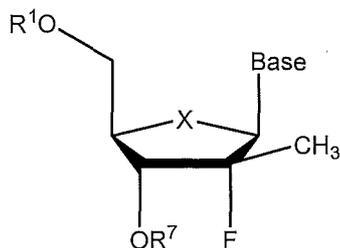
No existe actualmente ningún tratamiento preventivo para la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del Dengue (DENV) o el virus del Nilo Occidental y las terapias actualmente aprobadas, que solo son para el VHC, son limitadas. El diseño y desarrollo de compuestos farmacéuticos es esencial, especialmente de aquellos que son sinérgicos con otros *Flaviviridae* aprobados y en investigación y en particular el VHC y tratamientos terapéuticos para la evolución de los tratamientos de referencia, que incluyen terapias de combinación más efectivas.

La presente invención proporciona un nucleósido (β -D o β -L) de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el uso de tales compuestos para el tratamiento de un hospedador infectado con un virus que pertenece a la familia *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla. Además, los nucleósidos de la presente invención muestran actividad contra los rinovirus. Los rinovirus (RV) son virus pequeños (30 nm), no envueltos, que contienen un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de una sola hebra dentro de un cápside icosaédrica (20 caras). Los RV pertenecen a la familia *Picomaviridae*, la cual incluye los géneros *Enterovirus* (poliovirus, coxsackievirus de los grupos A y B, echovirus, enterovirus numerados) y *Hepatovirus* (virus de la hepatitis A). Actualmente están identificados aproximadamente 101 serotipos. Los rinovirus están más frecuentemente asociados con el resfriado común, nasofaringitis, laringotraqueobronquitis, neumonía, otitis media y exacerbaciones de asma.

El inventor ha descubierto inesperadamente que las sustituciones 2' en los nucleósidos β -D o β -L de la presente invención imparten una especificidad mayor para el virus de la hepatitis C además de mostrar una toxicidad inferior después de la administración a un hospedador.

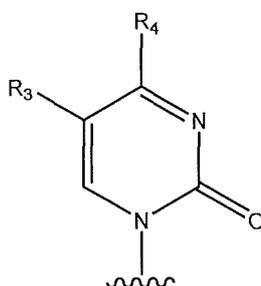
Los nucleósidos de la presente invención tienen las propiedades únicas de tener mayor especificidad para el virus de la hepatitis C y menor toxicidad en cultivo o cuando se administra a un animal. Una posible, pero no limitativa, razón para esto es la presencia de la sustitución 2'-fluoro en el anillo ribosa. Por ejemplo, la Patente US-6.348.587 de Schinazi et al., divulga una familia de compuestos de 2'-fluoro nucleósidos que son útiles en el tratamiento de infección por el virus de la hepatitis C. Por el contrario, las sustituciones 2'-metilo, tales como las existentes en la 2'-C-metilcitudina como se muestra en el documento WO 2004/02999 de Idenix, en la que la sustitución 2'-metilo en el anillo nucleósido en la posición 2' no es específica para la hepatitis C.

Así, en un aspecto, el nucleósido antiviralmente efectivo es un nucleósido β -D o β -L de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-*C*-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la fórmula general:



5

en la que la base es una base pirimidínica representada por la siguiente fórmula



10

X es O;

R¹ y R⁷ son independientemente H, un monofosfato, un difosfato o un trifosfato;

15

R³ es H y

R⁴ es NH₂ u OH.

20

Varios aspectos de la presente invención también incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los nucleósidos β -D o β -L de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-*C*-metilo descritos en la presente memoria o sus sales farmacéuticamente aceptables y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

En varios aspectos, el nucleósido β -D de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-*C*-metilo tiene una CE₅₀ (concentración efectiva para alcanzar una inhibición del 50 %) cuando se prueba en un ensayo basado en células apropiado, de menos de 15 micromolar y más particularmente, menos de 10 o 5 micromolar. En otros aspectos, el nucleósido está enantioméricamente enriquecido.

30

Los siguientes aspectos no limitativos ilustran alguna metodología general para obtener los nucleósidos de la presente invención. Específicamente, la síntesis de los presentes nucleósidos puede ser lograda por cualquiera de dos medios generales:

35

1) alquilando el bloque estructural del carbohidrato apropiadamente modificado, fluoración subsiguiente, seguida por acoplamiento para formar los nucleósidos de la presente invención (Esquema 1) o

2) glicosilación para formar el nucleósido seguida por alquilación y fluoración de los nucleósidos preformados de la presente invención de la presente invención (Esquema 2).

40

Además los enantiómeros L correspondientes a los compuestos de la invención pueden ser preparados siguiendo los mismos métodos generales (Esquemas 1 o 2) comenzando con el correspondiente bloque estructural del carbohidrato L o del enantiómero L del nucleósido como material de partida.

Así, la presente invención incluye por lo menos los siguientes aspectos generales.

45

(a) los nucleósidos β -D y β -L de las fórmulas generales divulgadas o sus sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en la presente memoria;

(b) composiciones farmacéuticas que comprenden un nucleósido β -D o β -L de las fórmulas generales divulgadas o una sal farmacéuticamente aceptable, como se describe en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

5 **La Figura 1** es una representación gráfica de la reducción dependiente de la dosis del ARN del VHC del replicón basada en el tratamiento con β -D-(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. **(A)**: La reducción viral se comparó con la reducción de los niveles de ARN celular (ARN ribosómico) para obtener valores de índices terapéuticos. La CE_{50} que representa la concentración efectiva al 90 % 96 horas después de la administración dependiente de la dosis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina se determinó que era de 5 μ M. **(B)**: El ARN del VHC se redujo significativamente de una manera dependiente de la dosis durante 7 días después del tratamiento con 25 μ M.

15 **La Figura 2** representa el cambio en peso promedio (%) de un ratón Suizo hembra en el estudio de toxicidad de la β -D-(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina a diversas dosis. Se aplicaron inyecciones intraperitoneales en los días 0 a 5 de 0, 3,3, 10, 33, 100 mg/kg. Cada grupo de dosificación contenía 5 ratones y ningún ratón murió durante los 30 días del estudio.

20 **La Figura 3** representa la farmacocinética de la β -D-(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina en monos Rhesus a los que se les administró una sola dosis (33,3 mg/kg) oral o intravenosa de β -D-(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina.

Descripción detallada de la invención

25 A continuación se describe con detalle las diversas realizaciones de la invención. Como se usa en la presente memoria y en todas las reivindicaciones que la acompañan, el significado de "un", "una" y "el" y "la" incluye la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. También, como se utiliza en la presente memoria y las reivindicaciones que la acompañan, el significado de "en" indica "en" o "sobre" a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

30 Los términos usados en esta memoria generalmente tienen su significado ordinario en la técnica, dentro del contexto de la invención y en el contexto específico en el que cada término es usado. Ciertos términos que se usan para describir la invención están descritos a continuación o en otra parte de la memoria, para proporcionar una guía adicional al lector en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y como prepararlos y usarlos. Por conveniencia, ciertos términos pueden estar destacados, por ejemplo usando letra cursiva y/o comillas. El uso de estos destacados no tiene influencia en el alcance y significado de un término; el alcance y significado del término es el mismo, en el mismo contexto, esté o no destacado. Se apreciará que se puede decir lo mismo de más de una manera. Consecuentemente, se puede usar lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más de los términos descritos en la presente memoria y no se dará ningún significado especial dependiendo de si o no un término fue elaborado o descrito en la presente memoria. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. La mención de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier lugar de esta memoria, incluyendo ejemplos de cualquiera de los términos descritos en la presente memoria, es solo ilustrativo y de ninguna manera limita el alcance y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Asimismo, la invención no está limitada a las diversas realizaciones proporcionadas en esta memoria.

45 Como se utiliza en la presente memoria, "alrededor de" o "aproximadamente" generalmente significará dentro de un 20 por ciento, preferiblemente dentro de un 10 % y más preferiblemente dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado. Las cantidades numéricas aquí proporcionadas son aproximadas, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" pueden ser inferidos en caso de que no se mencione expresamente.

50 La presente invención proporciona nucleósidos (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo y sus sales aceptables farmacéuticamente para el tratamiento de infección por el virus de la hepatitis C, la infección por el virus del Nilo Occidental, una infección por el virus de la fiebre amarilla o una infección por rinovirus en un hospedador.

55 Los compuestos divulgados o sus derivados farmacéuticamente aceptables o sales o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos son útiles en la prevención y tratamiento de la infecciones por el VHC. Además, estos compuestos o formulaciones pueden ser usados profilácticamente para prevenir o retardar el progreso de enfermedades clínicas en individuos que son anti-antígeno del VHC positivo o que han sido expuestos al VHC.

60 Los compuestos divulgados en la presente memoria pueden ser convertidos en un éster farmacéuticamente aceptable por reacción con un agente de esterificación adecuado, por ejemplo, un haluro ácido o anhídrido. El compuesto o su derivado farmacéuticamente aceptable puede ser convertido en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una manera convencional, por ejemplo mediante el tratamiento con una base apropiada. El éster o sal del compuesto puede ser convertido en el compuesto original, por ejemplo, mediante hidrólisis.

65

Definiciones

El término “independientemente” es usado en la presente memoria para indicar que la variable, la cual se aplica independientemente, varía independientemente de aplicación a aplicación. Así, en un compuesto tal como R^aXYR^a, en el que R^a es “independientemente carbono o nitrógeno”, ambos R^a pueden ser carbono, ambos R^a pueden ser nitrógeno o un R^a puede ser carbono y el otro R^a nitrógeno.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones “enantioméricamente puro” o “enantioméricamente enriquecido” se refiere a una composición de nucleósido que comprende por lo menos aproximadamente 95 % y preferiblemente aproximadamente 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de un solo enantiómero de este nucleósido.

Como se usa en la presente memoria la expresión “sustancialmente libre de” o “sustancialmente en ausencia de” se refiere a una composición de nucleósido que incluye por lo menos 85 o 90 % en peso, preferiblemente 95 % a 98 % en peso y aún más preferiblemente 99 % a 100 % en peso de un enantiómero designado de ese nucleósido. En una realización preferida, en los métodos y compuestos de esta invención, los compuestos están sustancialmente libres de enantiómeros.

De manera similar, el término “aislado” se refiere a una composición de nucleósido que incluye por lo menos 85 o 90 % en peso, preferiblemente 95 % a 98 % en peso y aún más preferiblemente 99 % a 100 % en peso del nucleósido, comprendiendo el resto otras especies químicas o enantiómeros.

El término “alquilo” como se usa en la presente memoria, a menos que se especifique de otra manera, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico, primario, secundario o terciario, generalmente de C₁ a C₁₀, e incluye específicamente metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos alquilo tanto sustituidos como no sustituidos. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato o cualquier otro grupo funcional viable que no inhibe la actividad farmacológica de este compuesto, ya sea protegido o no protegido, según sea necesario, como es sabido por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en T. W. Greene and P.G.M. Wuts, “Protective Groups in Organic Synthesis” 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999, incorporado en la presente como referencia.

El término “protegido”, como se usa en la presente memoria, a menos que se especifique de otra manera, se refiere a un grupo que se añade a un átomo de oxígeno, nitrógeno o fósforo para evitar su reacción adicional o para otros propósitos. Una gran variedad de grupos protectores de oxígeno y nitrógeno son conocidos por aquellos expertos en la materia de las síntesis orgánicas. Ejemplos no limitativos incluyen: C(O)-alquilo, C(O)F, C(O)arilo, CH₃, CH₂-alquilo, CH₂-alqueno, CH₂Ph, CH₂-arilo, CH₂O-alquilo, CH₂O-arilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, *tert*-butildimetilsililo, *tert*-butildifenilsililo y 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno).

El término “arilo” como se usa en la presente memoria, a menos que se especifique de otra manera, se refiere a fenilo, bifenilo o naftilo, y preferiblemente fenilo. El término incluye restos sustituidos y no sustituidos. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, ya sea no protegido o protegido según sea necesario, como es conocido para aquellos expertos en la materia, por ejemplo como se muestra en T. W. Greene and P.G.M. Wuts, “Protective Groups in Organic Synthesis”, 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

El término “halo” como se usa en la presente memoria, incluye cloro, bromo, yodo y flúor.

El término “acilo” se refiere a un éster de ácido carboxílico en el cual el resto no carbonilo del grupo éster se selecciona de alquilo o alquilo inferior lineal, ramificado o cíclico, alcoxilalquilo que incluye metoximetilo, aralquilo que incluye bencilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido con halógeno (F, Cl, Br, I), alquilo de C₁ a C₄ o alcoxi de C₁ a C₄, ésteres de sulfonato tales como alquil o aralquil sulfonilo que incluye metanosulfonilo, éster de mono, di o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialkilsililo (por ej. dimetil-*t*-butilsililo) o difenilmetilsililo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo.

El término “aminoácido” incluye aminoácidos α , β , γ o δ naturales y sintéticos e incluye pero no están limitados a, aminoácidos encontrados en proteínas, es decir, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En una realización preferida, el aminoácido está en la configuración L. En otra alternativa, el aminoácido puede ser un derivado de alanil, valinil, leucinil, isoleucinil, prolinil, fenilalaninil, triptofanil, metioninil, glicinil, serinil, treoninil, cisteinil, tirosinil, asparaginil, glutaminil, aspartoil, glutaroil, lisinil, argininil, histidinil, δ -alanil, β -valinil, β -leucinil, β -isoleucinil, β -prolinil, β -fenilalaninil, β -triptofanil, β -metioninil, β -glicinil, β -serinil, β -treoninil, β -cisteinil, β -tirosinil, β -asparaginil, β -glutaminil, β -aspartoil, β -glutaroil, β -lisinil, β -argininil o β -histidinil. Cuando se usa el término aminoácido, se considera que es una descripción específica e independiente de cada uno de los ésteres de α , β , γ o δ .

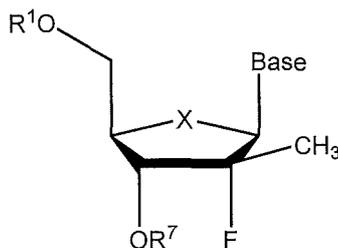
δ glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteina, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina en las configuraciones D y L.

5 El término "hospedador" como se usa en la presente memoria, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el cual se pueden replicar los virus, incluyendo líneas celulares y animales y preferiblemente seres humanos. Como alternativa, el hospedador puede llevar una parte del genoma viral, cuya replicación o funciones pueden ser alteradas mediante los compuestos de la presente invención. El término hospedador se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con todos o parte de los genomas vírales y animales, en particular, primates y seres humanos. En la mayoría de las aplicaciones en animales de la presente invención, el hospedador es un paciente humano. Las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, sin embargo, están claramente anticipadas por la presente invención.

15 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se utiliza a través de toda la memoria para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable de un compuesto, que al administrarse a un paciente, proporciona el compuesto activo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

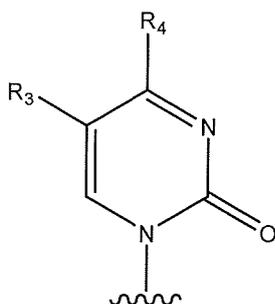
20 **I. Compuesto activo y derivados y sales fisiológicamente aceptables del mismo**

Se proporciona un nucleósido de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la estructura:



25

en la que la base es una base pirimidínica representada por la siguiente fórmula



30 X es O;

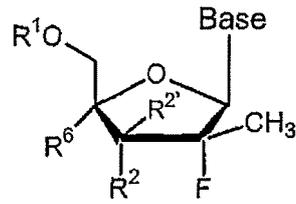
R¹ y R⁷ son independientemente H, un monofosfato, un difosfato o un trifosfato;

R³ es H y

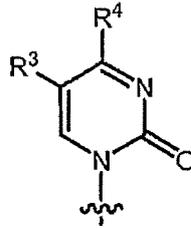
35

R⁴ es NH₂ u OH.

En una segunda realización, se proporciona un nucleósido de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la estructura:



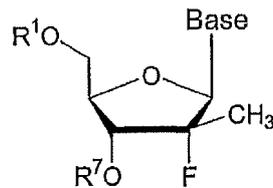
en la que la base es:



5

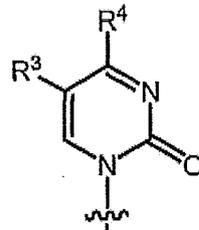
y en la que R¹ es H, R² es OH, R^{2'} es H, R³ es H, R⁴ es NH₂ u OH y R⁶ es H.

En una tercera realización se proporciona un nucleósido de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la estructura:



10

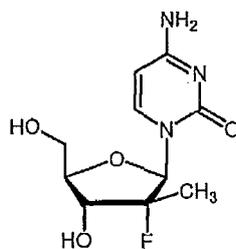
en la que la base es:



15

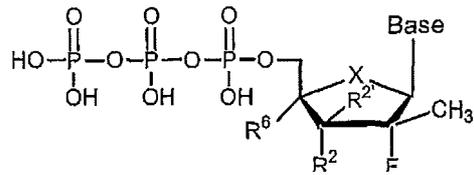
y en la que R¹ es H, R³ es H, R⁴ es NH₂ u OH y R⁷ es H.

Una cuarta realización proporciona un nucleósido de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la estructura:



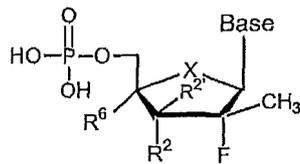
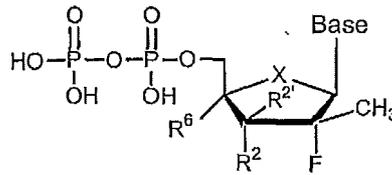
20

La presente invención también contempla derivados éster del ácido 5'-trifosfato trifosfórico del grupo 5'-hidroxilo de un compuesto nucleósido de la presente invención que tiene la siguiente fórmula estructural:



en la que la base, X, R², R^{2'} y R⁶ son como se ha definido anteriormente.

- 5 También se pretende que los compuestos de la presente invención incluyan sales farmacéuticamente aceptables del éster trifosfato, así como sales farmacéuticamente aceptables de los derivados éster 5'-difosfato y 5'-monofosfato de las siguientes fórmulas estructurales, respectivamente.

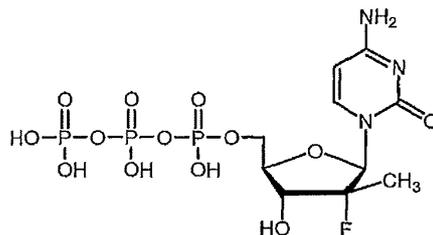
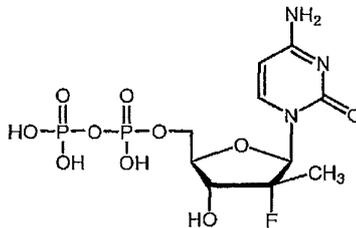
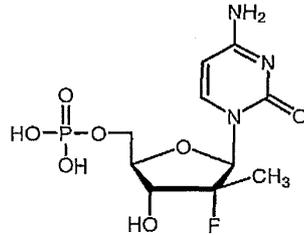


10

en la que la base, X, R², R^{2'} y R⁶ son como se ha definido anteriormente.

Otros ejemplos no limitativos de derivados de ácido fosfórico son los nucleósidos de la presente invención mostrados a continuación:

15



En las diversas realizaciones, se prefieren los derivados fluorados. Flúor es considerado como "isostérico" del hidrógeno debido a su tamaño (los radios de Van der Waals son para el H 1,20 Å y para el F 1,35 Å). Sin embargo, el peso atómico (18,998) y la electronegatividad del flúor (4,0 [escala de Pauling], 4,000 [escala de Sanderson]) son más similares al oxígeno (3,5 [Pauling], 3,654 [Sanderson]) que al hidrógeno (2,1 [Pauling], 2,592 [Sanderson]) (March, J., "Advances in Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure" Third edition, 1985, p. 14., Wiley Interscience, New York). El flúor es conocido por ser capaz de formar un enlace de hidrógeno, pero a diferencia del grupo hidroxilo (que puede actuar tanto como aceptor de protones como donador de protones), el flúor actúa solamente como aceptor de protones. Por otro lado, los 2'-fluoro-ribonucleósidos pueden ser considerados como análogos tanto de ribonucleósidos como de desoxinucleósidos. Pueden ser reconocidos mejor por la ARN polimerasa viral a nivel del trifosfato que por la ARN polimerasa del hospedador inhibiendo selectivamente así la enzima viral.

II. Sales farmacéuticamente aceptables

En los casos donde los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales de ácido o base no tóxicas, estables, puede ser apropiada la administración del compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre numerosos ácidos distintos bien conocidos en la técnica farmacéutica. En particular, ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos, que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, incluyendo, sales de sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Pueden obtenerse sales farmacéuticamente aceptables utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que produce un anión fisiológicamente aceptable. También pueden obtenerse sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metal alcalinotérreo (por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos.

III. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas basadas en un compuesto β -D o β -L divulgadas en la presente memoria o su sal farmacéuticamente aceptable pueden prepararse en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus, opcionalmente en combinación con un aditivo, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La cantidad farmacéuticamente efectiva puede variar con la infección o afección a ser tratada, su gravedad, el régimen de tratamiento a ser empleado, la farmacocinética del agente empleado, así como el paciente tratado.

En un aspecto de acuerdo con la presente invención, el compuesto de acuerdo con la presente invención es formulado preferiblemente en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, es preferible administrar la composición farmacéutica en forma de administración oral, pero las formulaciones pueden administrarse por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, bucal, subcutánea, por supositorio o por otra vía. Las formulaciones intravenosas o intramusculares se administran preferiblemente en solución salina estéril. Un experto con habilidades ordinarias en la técnica puede modificar la formulación dentro de las enseñanzas de la memoria para proporcionar diversas formulaciones para una vía particular de administración sin que las composiciones de la presente invención se conviertan en inestables o se vea comprometida su actividad terapéutica. En particular, una modificación de un compuesto deseado para hacerlo más soluble en agua o en otro vehículo, por ejemplo, puede realizarse fácilmente mediante una modificación de rutina (formulación salina, esterificación, etc.).

La cantidad del compuesto incluido dentro de las formulaciones terapéuticamente activas, de acuerdo con la presente invención, es una cantidad efectiva para tratar la infección o afección, en las realizaciones preferidas, una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto presente en forma de dosificación farmacéutica normalmente varía de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 2.000 mg o más, dependiendo del compuesto empleado, la afección o infección tratada y la vía de administración. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad profiláctica o preventivamente efectiva de las composiciones, de acuerdo con la presente invención, está dentro del mismo intervalo de concentración que el establecido anteriormente para una cantidad terapéuticamente efectiva y es normalmente la misma que una cantidad terapéuticamente efectiva.

La administración del compuesto activo puede variar de la administración continua (goteo intravenoso) a varias orales por día (por ejemplo, Q.I.D., B.I.D., etc.) y puede incluir la administración oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente adyuvante de la penetración), bucal y por supositorio, entre otras vías de administración. También pueden utilizarse comprimidos orales con

recubierto entérico para mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de los compuestos a partir de una vía de administración oral. La forma farmacéutica más efectiva dependerá de la farmacocinética del agente particular elegido, así como de la gravedad de la enfermedad en el paciente. Las formas farmacéuticas orales son particularmente preferidas, debido a la facilidad de administración y cumplimiento favorable prospectivo del paciente.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, se mezcla preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las técnicas de composición farmacéuticas convencionales para producir una dosis. Un vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral. En la preparación de composiciones farmacéuticas en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. De esta forma, para preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, elixires y soluciones, pueden utilizarse vehículos y aditivos adecuados, incluyendo agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para las preparaciones orales sólidas tales como polvos, comprimidos, cápsulas y para las preparaciones sólidas tales como supositorios, pueden usarse vehículos y aditivos adecuados incluyendo almidones, vehículos de azúcar, tales como dextrosa, manitol, lactosa y vehículos relacionados, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes de disgregación y similares. Si se desea, los comprimidos o cápsulas pueden tener recubrimiento entérico para la liberación prolongada mediante técnicas estándar. El uso de estas formas de administración puede impactar significativamente en la biodisponibilidad de los compuestos en el paciente.

Para las formulaciones parenterales, el vehículo comprenderá normalmente agua estéril o una solución de cloruro de sodio acuoso, aunque también pueden incluirse otros ingredientes, incluyendo los adyuvantes de la dispersión. Si es necesario utilizar agua estéril y mantenerla estéril, las composiciones y vehículos deben también esterilizarse. También pueden prepararse suspensiones inyectables, en cuyo caso pueden emplearse vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares.

También pueden prepararse suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a antígenos virales) por métodos convencionales para producir vehículos farmacéuticamente aceptables. Esto puede ser apropiado para la administración de nucleósidos libres de los compuestos de nucleósido de acuerdo con la presente invención.

En realizaciones particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención, los compuestos y composiciones se utilizan para tratar, prevenir o retardar el comienzo de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus. Los presentes compuestos son preferiblemente administrados por vía oral, pero pueden administrarse por vía parenteral, tópica o en forma de supositorio.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención, debido a su baja toxicidad en las células hospedadoras en ciertos casos, pueden emplearse ventajosamente de manera profiláctica para prevenir una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus o para prevenir la aparición de síntomas clínicos asociados con la infección viral o afección. En este aspecto, las presentes composiciones se usan para prevenir o retardar el comienzo de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus. Este método profiláctico comprende la administración a un paciente que necesita de tal tratamiento, o que está en riesgo de desarrollo del virus o afección de una cantidad de un compuesto de acuerdo con la presente invención, efectiva para aliviar, prevenir o retardar el comienzo de la infección viral o afección. En el tratamiento profiláctico, se prefiere que el compuesto antiviral utilizado debe tener baja toxicidad y preferiblemente no sea tóxico para el paciente. Es particularmente preferido en este aspecto de la presente invención que el compuesto que se utiliza sea lo máximo efectivo contra el virus o afección y debe presentar un mínimo de toxicidad para el paciente. En el caso de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus, los compuestos de acuerdo con la presente invención, que pueden utilizarse para tratar estos estados patológicos, pueden administrarse dentro del mismo intervalo de dosificación para el tratamiento terapéutico (es decir, aproximadamente 250 microgramos hasta 1 gramo o más de una a cuatro veces por día de una forma farmacéutica oral) como un agente profiláctico para prevenir la proliferación de la infección viral, o como alternativa, para prolongar el comienzo de la infección viral, que se manifiesta por los síntomas clínicos.

Además, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en combinación o de forma alternada con uno o más agentes antivirales, incluyendo otros compuestos de la presente invención. Ciertos compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser efectivos para aumentar la actividad biológica de ciertos agentes de acuerdo con la presente invención al reducir el metabolismo, catabolismo o inactivación de otros compuestos y como tales, son co-administrados para este efecto pretendido.

IV. Estereoisomerismo y polimorfismo

Se aprecia que los nucleósidos de la presente invención tienen diversos centros quirales y pueden existir en y ser aislados en formas ópticamente activas y racémicas. Algunos de los compuestos pueden presentar polimorfismo. Hay que entender que la presente invención abarca cualquier forma racémica, ópticamente activa, diastereomérica, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, de un compuesto de la invención, que posee las propiedades útiles descritas en la presente memoria. Se conoce muy bien en la técnica la forma de preparación de las formas ópticamente activas (por ejemplo, mediante resolución de la forma racémica por técnicas de recristalización, mediante síntesis de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral o mediante separación cromatográfica utilizando una fase estacionaria quiral).

Los carbonos del nucleósido son quirales, sus sustituyentes sin hidrógeno (la base y los grupos CHOR, respectivamente) pueden estar en *cis* (en el mismo lado) o en *trans* (en los lados opuestos) con respecto al sistema de anillo del azúcar. Por lo tanto los cuatro isómeros ópticos están representados por las siguientes configuraciones (cuando se orienta el resto de azúcar en un plano horizontal de tal manera que el átomo de oxígeno está en la parte posterior): *cis* (con ambos grupos "hacia arriba", lo que corresponde a la configuración de los nucleósidos β -D natural), *cis* (con ambos grupos "hacia abajo", que es una configuración β -L no natural), *trans* (con el sustituyente C2' "hacia arriba" y el sustituyente C4' "hacia abajo") y *trans* (con el sustituyente C2' "hacia abajo" y el sustituyente C4' "hacia arriba"). Los "nucleósidos D" son nucleósidos *cis* en una configuración natural y los "nucleósidos L" son nucleósidos *cis* en la configuración no natural.

Del mismo modo, la mayoría de los aminoácidos son quirales (designados como L o D, en los que el enantiómero L es la configuración natural) y pueden existir como enantiómeros separados.

Son conocidos en la técnica ejemplos de métodos para obtener materiales ópticamente activos, e incluyen al menos los siguientes.

i) Separación física de cristales - una técnica con la cual los cristales macroscópicos de los enantiómeros individuales son manualmente separados. Esta técnica puede utilizarse si existen cristales de los enantiómeros separados, es decir, el material es un conglomerado y los cristales son visualmente distintos;

ii) Cristalización simultánea - una técnica con la cual los enantiómeros individuales son cristalizados separadamente de una solución del racemato, solamente es posible si la última es un conglomerado en el estado sólido;

iii) Resoluciones enzimáticas - una técnica con la cual la separación parcial o completa de un racemato tiene lugar en virtud de las diferentes velocidades de reacción para los enantiómeros con una enzima;

iv) Síntesis asimétrica enzimática - una técnica de síntesis con la cual al menos una etapa de la síntesis utiliza una reacción enzimática para obtener un precursor sintético enantioméricamente puro o enriquecido del enantiómero deseado;

v) Síntesis asimétrica química - una técnica de síntesis con la cual se sintetiza el enantiómero deseado a partir de un precursor aquiral en condiciones que producen asimetría (es decir, quiralidad) en el producto, lo que puede lograrse utilizando catalizadores quirales o auxiliares quirales;

vi) Separaciones de diastereómeros - una técnica con la cual se hace reaccionar un compuesto racémico con un reactivo enantioméricamente puro (el auxiliar quiral) que convierte los enantiómeros individuales en diastereómeros. Los diastereómeros resultantes se separan luego por cromatografía o cristalización en virtud de sus diferencias estructurales ahora más distintas y el auxiliar quiral se elimina posteriormente para obtener el enantiómero deseado;

vii) Transformaciones asimétricas de primer y segundo orden - una técnica con la cual los diastereómeros del equilibrado de racemato producen una preponderancia en solución del diastereómero del enantiómero deseado o donde la cristalización preferencial del diastereómero del enantiómero deseado perturba el equilibrio, de tal modo que eventualmente, en principio, todo el material se convierte al diastereómero cristalino del enantiómero deseado. Posteriormente se libera el enantiómero deseado del diastereómero;

viii) Resoluciones cinéticas - esta técnica se refiere a la consecución de la resolución parcial o completa de un racemato (o de una resolución adicional de un compuesto parcialmente resuelto) en virtud de las velocidades de reacción desiguales de los enantiómeros con un reactivo no racémico, quiral o catalizador en condiciones cinéticas;

ix) Síntesis enantioespecífica de precursores no racémicos - una técnica de síntesis con la cual se obtiene el enantiómero deseado a partir de materiales de partida no quirales y donde la integridad estereoquímica no está o solamente está comprometida mínimamente durante el transcurso de la síntesis;

x) Cromatografía líquida quiral - una técnica con la cual los enantiómeros de un racemato se separan en una fase móvil líquida en virtud de sus diferentes interacciones con una fase estacionaria. La fase estacionaria puede estar constituida por material quiral o la fase móvil puede contener un material quiral adicional para provocar las diferentes interacciones;

5 xi) Cromatografía de gas quiral - una técnica con la cual se volatiliza el racemato y se separan los enantiómeros en virtud de sus diferentes interacciones en la fase móvil gaseosa con una columna que contiene una fase adsorbente quiral no racémica, fija;

10 xii) Extracción con disolventes quirales - una técnica con la cual se separan los enantiómeros en virtud de la disolución preferencial de un enantiómero en un disolvente quiral particular;

15 xiii) Transporte a través de membranas quirales - una técnica con la cual un racemato se pone en contacto con una barrera de membrana delgada. La barrera generalmente separa dos fluidos miscibles, uno que contiene el racemato y una fuerza motriz tal como la concentración o la presión diferencial provoca transporte preferencial a través de la barrera de membrana. La separación ocurre como resultado de la naturaleza quiral no racémica de la membrana que permite solamente pasar a un enantiómero del racemato.

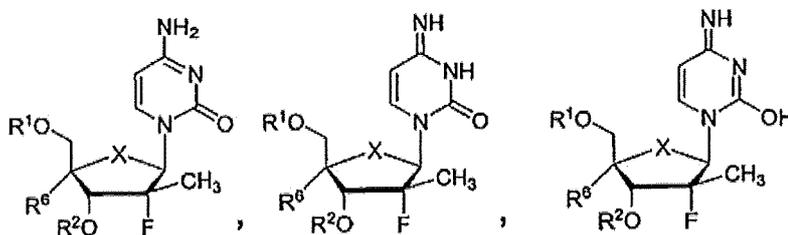
20 En una realización se utiliza cromatografía quiral, incluyendo cromatografía de lecho móvil simulado. Una amplia variedad de fases estacionarias quirales están disponibles comercialmente.

Algunos de los compuestos descritos en la presente memoria contienen dobles enlaces olefinicos y a menos que se especifique de otra manera, se pretende que incluyan ambos isómeros geométricos E y Z.

25 Además, algunos de los nucleósidos descritos en la presente memoria, pueden existir como tautómeros, tales como tautómeros ceto-enol. Se pretende que los tautómeros individuales así como también sus mezclas, estén abarcados dentro de los compuestos de la presente invención como se ilustra a continuación.

Una (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina:

30



En cada uno de los ejemplos anteriores, la primera estructura mostrada es la forma preferida.

35 V. Derivados

El compuesto activo puede administrarse como cualquier sal que tras la administración al receptor es capaz de proporcionar directa o indirectamente el compuesto original, o que presenta la propia actividad. Ejemplos no limitativos son las sales farmacéuticamente aceptables (o también referidas como "sales fisiológicamente aceptables"). Además, las modificaciones pueden afectar a la actividad biológica del compuesto, en algunos casos aumentando la actividad respecto al compuesto original. Esto puede valorarse fácilmente al preparar la sal y ensayar su actividad antiviral de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria u otros métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica.

45 Sales farmacéuticamente aceptables

En los casos donde los compuestos son suficientes básicos o ácidos para formar sales de ácido o base no tóxicas, estables, puede ser apropiada la administración del compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas por la adición de ácidos, que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, α -glicerofosfato, formiato, fumarato, propionato, glicolato, lactato, piruvato, oxalato, maleato y salicilato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, incluyendo sales de sulfato, nitrato, bicarbonato, carbonato, hidrobromato y ácido fosfórico. En una realización preferida, la sal es una sal mono- o di-clorhidrato.

55 Pueden obtenerse sales farmacéuticamente aceptables utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo al hacer reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido

adecuado que produce un anión fisiológicamente aceptable. También pueden obtenerse sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metal alcalinotérreo (por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos. En una realización, la sal es un clorhidrato, bromhidrato o una sal mesilato del compuesto. En otra realización, la sal farmacéuticamente aceptable es un diclorhidrato, dibromhidrato o una sal dimesilato.

VI. Terapia de combinación o alternación

En otra realización, para el tratamiento, inhibición, prevención y/o profilaxis de cualquier infección descrita en la presente memoria, el compuesto activo o su derivado o sal pueden administrarse en combinación o alternación con otro agente antiviral. En general, en terapia de combinación, se administran juntas dosis efectivas de dos o más agentes, mientras que durante la terapia de alternación, se administra en serie una dosis efectiva de cada agente. La dosis dependerá de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos para aquellos expertos en la técnica. Hay que señalar que los valores de la dosis también variarán con la gravedad de la afección que debe ser aliviada. Se entiende además que para cualquier sujeto particular, los regímenes y pautas posológicas específicas y relaciones deben ajustarse durante un tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Se sabe que después del tratamiento prolongado con un agente antiviral, pueden aparecer variantes de flavivirus, pestivirus o del VHC resistentes al fármaco. La resistencia al fármaco normalmente ocurre por mutación de un gen que codifica para una enzima utilizada en la replicación viral. La eficacia de un fármaco contra la infección viral puede ser prolongada, aumentada o restaurada al administrar el compuesto en combinación o alternación con un segundo, y quizás tercer, compuesto antiviral que induce una mutación diferente de la causada por el fármaco principal. Como alternativa, la farmacocinética, biodistribución u otro parámetro del fármaco puede alterarse por dicha terapia de combinación o alternación. En general, la terapia de combinación es normalmente preferida a la terapia de alternación porque induce estrés múltiple simultáneo en el virus.

Por ejemplo, un experto en la técnica reconocerá que cualquier fármaco o terapia antiviral puede utilizarse en combinación o alternación con cualquier nucleósido de la presente invención. Cualquiera de los tratamientos virales descritos en los Antecedentes de la invención pueden utilizarse en combinación o alternación con los compuestos descritos en esta memoria. Ejemplos no limitantes de los tipos de agentes antivirales o sus profármacos que pueden utilizarse en combinación con los compuestos divulgados en la presente memoria incluyen: interferón, incluyendo interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, un interferón pegilado, interferón beta, interferón gamma, interferón tau e interferón omega; una interleucina, incluyendo la interleucina 10 y la interleucina 12; ribavirina; interferón alfa o interferón alfa pegilado en combinación con ribavirina o levovirina; levovirina; un inhibidor de la proteasa incluyendo un inhibidor de NS3, un inhibidor de NS3-4A; un inhibidor de la helicasa; un inhibidor de la polimerasa incluyendo la ARN polimerasa del VHC y un inhibidor de la NS5B polimerasa; gliotoxina; un inhibidor del IRES y un oligonucleótido antisentido; un derivado de tiazolidina; una benzanilida, una ribozima; otro nucleósido, profármaco de nucleósido o derivado de nucleósido; un 1-amino-alkilciclohexano; un antioxidante incluyendo la vitamina E; escualeno; amantadina; un ácido biliar; ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspártico; una bencendicarboxamida; ácido poliadenilico; un benzimidazol; timosina; un inhibidor de beta-tubulina; una vacuna profiláctica; un modulador inmunitario, un inhibidor de la IMPDH; fitosoma de silibina-fosfatidilcolina y micofenolato.

Ejemplos adicionales no limitantes de los tipos de fármacos o sus profármacos descritos anteriormente incluyen: aciclovir (ACV), ganciclovir (GCV o DHPG) y sus profármacos (por ejemplo valil-ganciclovir), E-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU), (E)-5-vinil-1-β-D-arabonosiluracilo (VaraU), (E)-5-(2-bromovinil)-1-β-D-arabinosiluracilo (BV-araU), 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinosil)-5-yodocitosina (D-FIAC), 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-L-arabinosil)-5-metiluracilo (L-FMAU o clevidina), (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)adenina [(S)-HPMPA], (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)-2,6-diaminopurina [(S)-HPMPDAP], (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil)citosina [(S)-HPMPC o cidofovir] y (2S,4S)-1-[2-(hidroximetil)-1,3-dioxolan-4-il]-5-yodouracil (L-5-loddU), entecavir, lamivudina (3TC), LdT, LdC, tenofovir y adefovir, el (-)-enantiómero de 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ((-)-FTC); el (-)-enantiómero de 2-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatiolano (3TC); carbovir, aciclovir, famciclovir, penciclovir, AZT, DDI, DDC, L(-)-FMAU, D4T, amdoxovir, Reverset, Racivir, abacavir, profármacos de fosfato de L-DDA y β-dioxolanil-6-cloropurina (ACP), inhibidores no nucleósidos de la TI, tales como nevirapina, MKC-442, DMP-226 (sustiva), inhibidores de la proteasa tales como indinavir, saquinavir, Kaletra, atazanavir; y compuestos anti-VIH tales como BILN-2061, ISIS 14803; viramidina, NM 283, VX-497, JKT-003, levovirina, isatoribina, Albuferon, Peg-infergen, VX-950, R803, VHC-086, R1479 y DMP45.

Composiciones farmacéuticas

Los hospedadores, incluyendo seres humanos, infectados con pestivirus, flavivirus, infección por VHC, o cualquier otra afección descrita en la presente memoria, u otro organismo que se replica a través de una ARN polimerasa viral dependiente de ARN, o para tratar cualquier otro trastorno descrito en la presente memoria, puede ser tratado administrando al paciente una cantidad efectiva del compuesto activo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en presencia de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los materiales activos pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o

tópica, en forma líquida o sólida.

Una dosis preferida del compuesto para una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus estará en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg una a cuatro veces por día. Pueden ser útiles dosis inferiores, y de esta forma los intervalos pueden incluir de 50 – 1.000 mg una a cuatro veces por día. El intervalo de dosis efectiva de las sales farmacéuticamente aceptables y profármacos pueden calcularse basándose en el peso del nucleósido original a ser administrado. Si la propia sal o profármaco presenta actividad, la dosificación efectiva puede estimarse como antes utilizando el peso de la sal o profármaco, o por otros medios conocidos para aquellos expertos en la técnica.

El compuesto se administra convenientemente en cualquier forma farmacéutica unitaria adecuada, incluyendo pero sin limitarse a una que contiene de 25 a 3.000 mg, preferiblemente de 50 a 2.000 mg de principio activo por forma farmacéutica unitaria. Una dosis oral de 50-1.000 mg es normalmente conveniente, incluyendo en una o múltiples formas farmacéuticas de 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 mg. También son contempladas dosis de 0,1-50 mg o de 0,1-20 mg o de 0,1-10 mg. Además, pueden utilizarse dosis inferiores en el caso de administración por una vía no oral, como, por ejemplo, por inyección o inhalación.

Idealmente el principio activo debe administrarse para lograr concentraciones plasmáticas máximas ($C_{máx}$) del compuesto activo desde aproximadamente 5,0 a 70 μ M, preferiblemente de aproximadamente 5,0 a 15 μ M. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa de una solución de 0,1 a 5 % del principio activo, opcionalmente en solución salina, o administrada como un bolo del principio activo.

La concentración del compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos para aquellos expertos en la técnica. Hay que señalar que los valores de la dosis también variarán con la gravedad de la afección a ser aliviada. Se entiende además que para cualquier sujeto particular, los regímenes posológicos específicos deben ajustarse durante un tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de concentración establecidos en la presente memoria son solamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada. El principio activo puede administrarse una vez o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para ser administradas en intervalos de tiempo variables.

Un modo preferido de administración del compuesto activo es oral. Las composiciones orales incluirán en general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden estar incluidas en cápsulas de gelatina o comprimidos en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en la forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como aceite graso. Además, las formas farmacéuticas unitarias pueden contener varios materiales distintos que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca u otros agentes entéricos.

El compuesto puede administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como un agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y sabores.

El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede mezclarse también con otros materiales activos que no afectan a la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada, tal como antibióticos, antifúngicos, anti-inflamatorios u otros antivirales, incluyendo otros compuestos nucleósidos. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Si se administra por intravenosa, los vehículos preferidos son solución salina o solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una realización preferida, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegen el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como vinilacetato de etileno, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales también pueden ser obtenidos comercialmente en Alza Corporation.

Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) también son preferidas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones liposomales disolviendo lípidos apropiados (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina y colesterol) en un disolvente inorgánico que posteriormente se evapora, dejando detrás una película delgada de lípido seco sobre la superficie del recipiente. A continuación, una solución acuosa del compuesto activo o sus derivados monofosfato, difosfato y/o trifosfato se introduce en el recipiente. El recipiente se agita a mano mediante suaves movimientos circulares para liberar el material lipídico de los lados del recipiente y para dispersar los agregados de lípidos, formando así la suspensión liposomal.

VII. Métodos biológicos

20 Prueba antiviral de los compuestos candidatos con el sistema de replicón del VHC en células Huh7

Las células Huh7 que albergan el replicón del VHC pueden cultivarse en medios DMEM (alto contenido de glucosa, sin piruvato) que contienen suero bovino fetal 10 %, aminoácidos 1X no esenciales, Pen-Strep-Glu (100 unidades/litro, 100 microgramos/litro y 2,92 mg/litro, respectivamente) y 500 a 1000 microgramos/mililitros de G418. Los ensayos de selección antiviral pueden hacerse en los mismos medios sin G418 como se explica a continuación: para mantener las células en una fase de crecimiento logarítmica, las células se siembran en una placa de 96 pocillos a baja densidad, por ejemplo 1.000 células por pocillo. El compuesto de prueba se añade inmediatamente después de sembrar las células y se incuba durante un período de 3 a 7 días a 37 °C en un incubador. Se eliminan luego los medios y las células se preparan para una extracción total del ácido nucleico (incluyendo el ARN del replicón y el ARN del hospedador). El ARN del replicón puede amplificarse luego en un protocolo Q-RT-PCR, y cuantificarse adecuadamente. Las diferencias observadas en los niveles de ARN del replicón del VHC comparadas con el control sin tratar es una forma de expresar la potencia antiviral del compuesto de prueba.

En otro contexto típico, un compuesto podría reducir la actividad de la ARN polimerasa viral, pero no la actividad de la ARN polimerasa del hospedador. Por lo tanto, la cuantificación del ARNr o del ARNm de la beta-actina (o cualquier otro fragmento de ARN del hospedador) y la comparación con los niveles de ARN del control sin fármaco es una medición relativa del efecto inhibitorio del compuesto de prueba sobre las ARN polimerasas celulares.

40 Ensayo de fosforilación de nucleósidos a trifosfato activo

Para determinar el metabolismo celular de los compuestos, se obtuvieron las células Huh-7 de la American Type Culture Collection (Rockville, MD) y se desarrollan en matraces de cultivo de tejido de 225 cm² en un medio esencial mínimo complementado con aminoácidos no esenciales, 1 % de penicilina-estreptomina. El medio se renueva cada tres días y las células son sub-cultivadas una vez a la semana. Después de la separación de la monocapa adherente con una exposición de 10 minutos a 30 ml de tripsina-EDTA y tres lavados consecutivos con medio, se siembran las células Huh-7 confluentes a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células por pocillo en una placa de 6 pocillos y se exponen a 10 μ M de compuesto activo marcado con [³H] (500 dpm/pmol) durante los períodos de tiempo especificados. Las células se mantuvieron a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %. En los puntos de tiempo seleccionados, las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo. El compuesto activo intracelular y sus metabolitos respectivos se extrajeron incubando el sedimento celular durante la noche a -20 °C con metanol 60 % seguido por extracción con unos 20 μ l adicionales de metanol frío durante una hora en un baño de hielo. Los extractos se combinaron a continuación, se secaron bajo un flujo de aire filtrado suave y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis de HPLC.

55 Ensayo de biodisponibilidad en monos Cynomolgus

En la semana previa al inicio del estudio, se implantó quirúrgicamente al mono cynomolgus un catéter venoso crónico y un puerto de acceso venoso subcutáneo (VAP) para facilitar la recolección de sangre y se sometió a un examen físico incluyendo hematología y se registraron los parámetros séricos y el peso corporal. Cada mono (seis en total) recibió aproximadamente 250 μ Ci de un compuesto marcado con ³H combinado con cada dosis de compuesto activo a un nivel de dosis de 10 mg/kg a una concentración de dosis de 5 mg/ml, ya sea vía bolo intravenoso (3 monos, IV), o vía sonda oral (3 monos, PO). Cada jeringa de dosificación se pesa antes de la administración para determinar de manera gravimétrica la cantidad de formulación administrada. Se recolectaron muestras de orina mediante un recipiente colector en los intervalos designados (aproximadamente 18-0 horas pre-dosis, 0-4, 4-8 y 8-12 post-administración) y se procesaron. También se recolectaron muestras de sangre (pre-dosis, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8, 12 y 24 horas post-administración) mediante el catéter venoso crónico y el VAP o de un vaso

periférico si el procedimiento del catéter venoso crónico no era factible. Las muestras de sangre y orina se analizan para determinar la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo cuando se alcanza la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$), el área bajo la curva (AUC), la semivida de la concentración de la dosis ($T_{1/2}$), el aclaramiento (CL), el volumen y distribución en el estado estacionario (V_{ss}) y la biodisponibilidad (F).

5

Ensayo de toxicidad en médula ósea

Se recolectaron células de médula ósea humana de voluntarios sanos normales y la población mononuclear se separó mediante centrifugación de gradiente con Ficoll-Hypaque como se ha descrito previamente por Sommadossi J-P, Carlisle R. "Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1987; 31:452-454 y ommadossi J-P, Schinazi RF, Chu CK, Xie M-Y. "Comparison of cytotoxicity of the (-)- and (+)-enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine in normal human bone marrow progenitor cells" *Biochemical Pharmacology* 1992; 44:1921-1925. Los ensayos de cultivo para CFU-GM y BFU-E se realizan utilizando una bicapa de agar blando o el método de la metilcelulosa. Los fármacos se diluyeron en un medio de cultivo de tejido y se filtraron. Después de 14 a 18 días a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire, se contaron las colonias de más de 50 células utilizando un microscopio invertido. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de la formación de colonias en presencia del fármaco comparado con los cultivos de control de disolvente.

Ensayo de toxicidad mitocondrial

Se añadieron 50 microlitros de diluciones de fármaco 2X por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se utilizó un control "sin fármaco" (solo medios) para determinar la cantidad máxima de ADN mitocondrial y ADN ribosómico producido. Se utilizó 3TC @ 10 µM como un control negativo y se utilizó ddC @ de 10 µM como un control tóxico. Se utilizaron los niveles de ADN ribosómico para determinar la toxicidad específica para la mitocondria o la citotoxicidad en general. Se añadieron a la placa células HepG2 (5.000 células/pocillo a 50 µl). La placa se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % durante 7 días. Después de la incubación, se eliminó el sobrenadante y se almacenó para la cuantificación del ácido láctico y se extrajo el ADN total de las células como se describe en el manual del RNeasy 96 (Febrero de 1999), páginas 22-23. No se realizaron digestiones de ADN, por lo tanto, se extrajeron ARN y ADN totales.

Se amplificó el ADN extraído y se determinó el cambio en el ADN mitocondrial y en el ADN ribosómico para cada muestra. Se calculó la magnitud de la diferencia en el ADN mitocondrial normalizado para el ADN ribosómico con relación al control.

Se realizó la cuantificación de ácido láctico mediante el kit de ensayo del ácido D-Láctico/ácido L-Láctico (Boehringer Mannheim/R-Biopharm/Roche). Se determinó la cantidad total de ácido láctico producida para cada muestra, así como también la magnitud del cambio en la producción de ácido láctico (% de ácido láctico / % de ADNr) como se describe en las instrucciones de los fabricantes.

40

Ensayo de citotoxicidad

Se añadieron 50 µl de diluciones de fármaco 2X por pocillo en una placa de 96 pocillos. La concentración final del fármaco variaba de 1 a 100 µM. Se utilizó un control "sin fármaco" (solo medios) para determinar los valores de absorbancia mínima y un control de "células + solo medios" para el valor de la absorbancia máxima. Se utilizó también un control de disolvente. A continuación se añadieron las células (PBM: 5 x 10⁴ células/pocillo; CEM: 2,5 x 10³ células/pocillo; Vero, HepG2, Huh-7 y Clone A: 5 x 10³ células/pocillo) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % durante 3-5 días (PBM: 5 días; CEM: 3 días, el resto: 4 días). Después de la incubación, se añadieron 20 µl de colorante MTS del Ensayo de proliferación celular de una solución acuosa de título celular a cada pocillo y la placa se re-incubó durante 2-4 días. La absorbancia (490 nm) se leyó después en un lector de placa ELISA utilizando los pocillos solo medios/sin células como blancos. Se determinó el porcentaje de inhibición y se utilizó para calcular la CC₅₀.

Toxicidad in vivo en ratones

Se determinó también la toxicidad *in vivo* después de las inyecciones en ratones Suizos hembras de los diversos nucleósidos divulgados en la presente invención. Se administraron inyecciones intraperitoneales en los días 0, día 1, día 2, día 3 y día 5 de dosis variables del nucleósido particular. Se inyectaron animales por separado con vehículo como grupos control. En estos estudios, cada grupo de dosis contenía 5-10 ratones. El cambio de peso promedio en cada uno de los ratones se midió como un signo de toxicidad del compuesto.

60

(BVDV) Ensayo de reducción del rendimiento

Se cultivaron células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK) en un medio de Eagle modificado de Dulbecco complementado con suero de caballo 10 % y 100 µg/ml de penicilina-estreptomicina. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 5 x 10³ células/pocillo y se incubaron durante 72 horas a 37 °C en una atmósfera

65

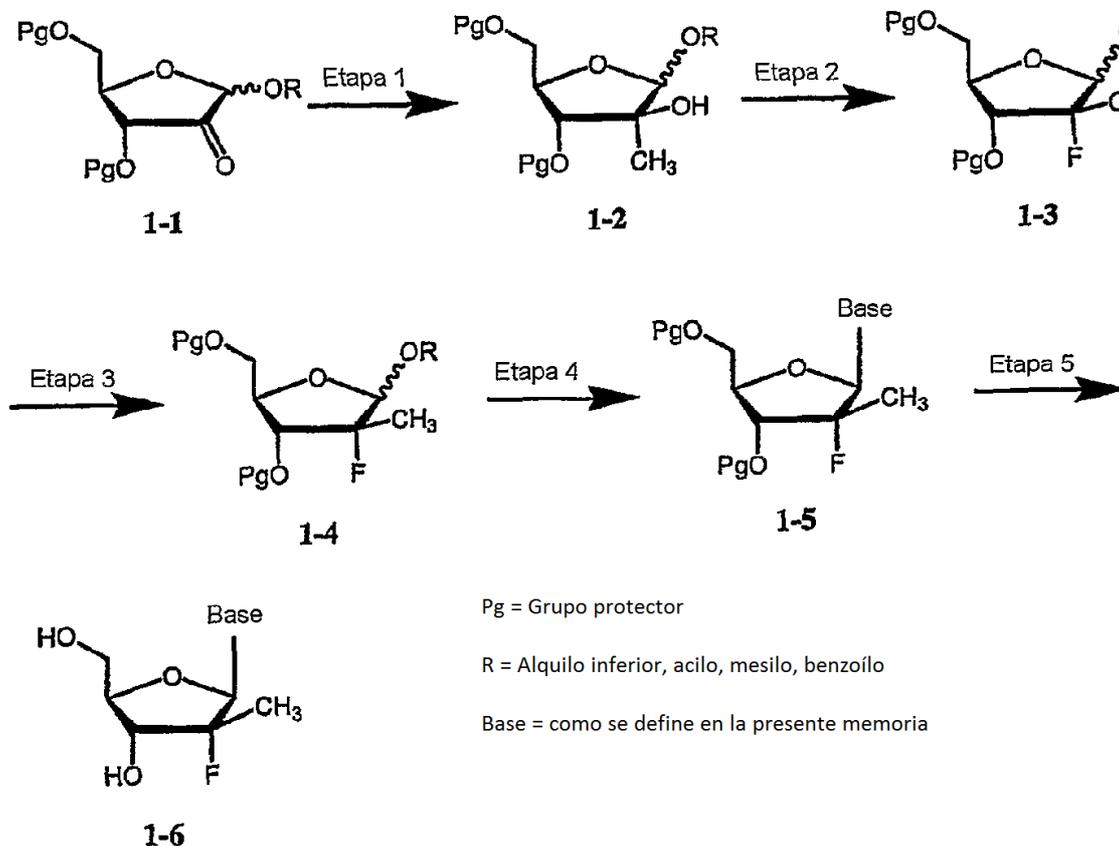
humidificada de CO₂ al 5 %. Las células se infectaron con BVDV citopático (cepa NADL) o no citopático (cepa SD-1) a una dilución de virus de 10⁻² y se incubaron durante 45 minutos. Las monocapas celulares se lavaron tres veces con el medio. Se añadió a los cultivos medio fresco que contenía los compuestos de prueba en concentraciones de respuesta a la dosis o ribavirina, como un control positivo, y se añadió un medio que no contiene fármaco a los controles sin fármaco. Después de 72 horas de incubación, se recolectó el sobrenadante y se extrajo el ARN viral utilizando el QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, CA). La carga viral se determinó por Q-RT-PCR utilizando cebadores específicos para NADL o SD-1 (1)

VIII. Protocolo de síntesis

Las siguientes realizaciones no limitantes ilustran algunas metodologías generales para obtener los nucleósidos de la presente invención. Dos métodos representativos generales para la preparación de los compuestos de la presente invención se describen en los Esquemas 1 y 2, mientras que ejemplos más específicos de estos métodos generales se proporcionan en el Esquema 3 (Ejemplo 1) y Esquema 4 (Ejemplo 2). El Esquema 1 representa un proceso generalizado que parte de un (2R) 2-desoxi-2-metil-2-fluoro-carbohidrato y forma los nucleósidos de la presente invención mediante condensación con una nucleobase. El Esquema 2 parte de un nucleósido de pirimidina, pre-formado, sustituido opcionalmente en C-4' y construye los fluoronucleósidos de (R) metilo C-2' de la presente invención. Estos esquemas ilustran la síntesis de los compuestos de la presente invención en los que existe un anillo de furanosa en la configuración β-D-ribo. Los expertos en la técnica de la síntesis de nucleósidos y nucleótidos apreciarán fácilmente que se pueden usar variaciones conocidas de las condiciones y procesos de los siguientes procedimientos preparativos y manipulaciones conocidas de la nucleobase para preparar estos y otros compuestos de la presente invención. Adicionalmente, los L-enantiómeros que corresponden a los compuestos de la invención pueden prepararse siguiendo los mismos métodos, comenzando con el correspondiente bloque estructural de L-carbohidrato o L-enantiómero de nucleósido como el material de partida.

1. Glicosilación de la nucleobase con un azúcar adecuadamente modificado

Esquema 1



La Etapa 1 en el Esquema 1 introduce el grupo 2-metilo utilizando un agente alquilante apropiado tal como metil-litio, trimetilaluminio o bromuro de metilmagnesio en un disolvente anhidro tal como tetrahidrofurano (THF), cloroformo o éter dietílico. Los compuestos **1-1** a **1-4** pueden ser puramente α y β o pueden existir como una mezcla anomérica que contiene ambos anómeros α y β en cualquier relación. Sin embargo, la configuración anomérica preferida de la estructura **1-1** es β .

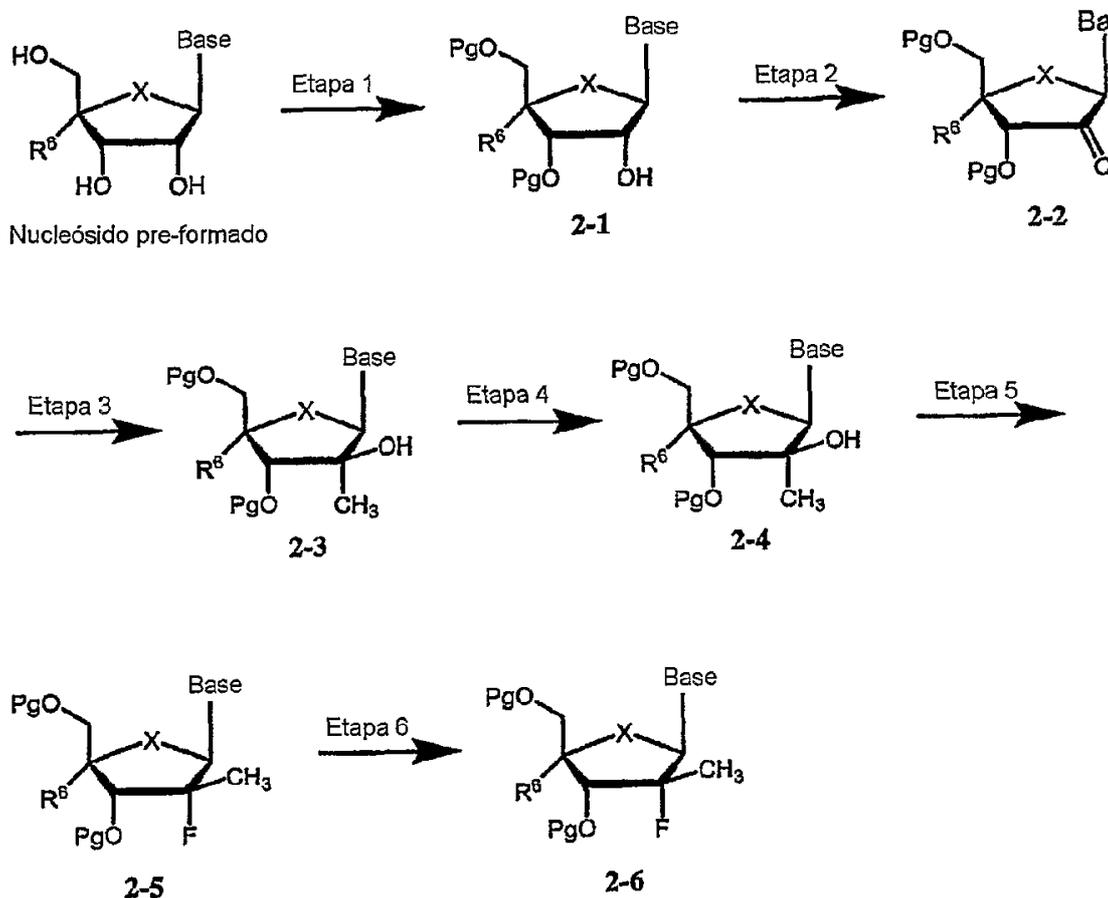
La Etapa 2 introduce el átomo de flúor en la posición 2 de la furanosida de alquilo. Esto puede lograrse por tratamiento del alcohol terciario, **1-2**, con un reactivo fluorinante comercialmente disponible tal como trifluoruro de (dietilamino)azufre (DAST) o Deoxo-Fluor en un disolvente aprótico, anhidro tal como tetrahidrofurano, cloroformo, diclorometano o tolueno. Preferiblemente la estereoquímica procede con la inversión de la configuración en C-2, es decir, partiendo de un hidroxilo C-2 "hacia arriba" (o arabinofuranosida) en la estructura **1-2**, el flúor C-2 está "hacia abajo" en el intermedio de ribofuranosida **1-3**.

En la etapa 3, los grupos protectores opcionales (Pg) pueden desprotegerse y volverse a proteger con grupos más adecuados para las manipulaciones restantes (T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999). Por ejemplo, los éteres bencilicos (Bn) pueden ser difíciles de eliminar en el nucleósido protegido **1-5** y pueden desprotegerse y reemplazarse con un grupo más fácil de eliminar del nucleósido del tipo estructural **1-5**. Además, la posición anomérica (C-1) también puede ser manipulada opcionalmente para dar un grupo adecuado para la reacción de acoplamiento con la nucleobase (etapa 4). Los diversos métodos para las manipulaciones anoméricas son los establecidos por aquellos expertos en la técnica de la síntesis de nucleósidos. Algunos ejemplos no limitantes son el tratamiento de la furanosida de alquilo (**1-3**, R = alquilo) con una mezcla de anhídrido acético, ácido acético y una cantidad catalítica de ácido sulfúrico (acetólisis) para proporcionar la estructura **1-4** donde R = Ac, con grupos protectores opcionales. También, el grupo alquilo en **1-3** puede convertirse en un acetato, benzoato, mesilato, tosilato, triflato o tosilo, por ejemplo, hidrolizando primero el grupo 1-*Oalquilo* en un grupo 1-hidroxilo utilizando un ácido mineral que consiste en, pero no se limita a, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido bromhídrico o un ácido orgánico que consiste en, pero no se limita a, ácido trifluoroacético, ácido acético y ácido fórmico (a temperatura ambiente o temperatura elevada). El azúcar reductor podría luego convertirse en el carbohidrato deseado por tratamiento con cloruro de acetilo, anhídrido acético, cloruro de benzoilo, anhídrido benzoico, cloruro de metanosulfonilo, anhídrido triflico, cloruro de trifilo o cloruro de tosilo en presencia de una base adecuada tal como trietilamina, piridina o dimetilaminopiridina.

El enlace nucleosídico se construye por tratamiento del compuesto intermedio **1-3** o **1-4** con la nucleobase persililada apropiada en presencia de un ácido de Lewis tal como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio, trimetil-sililtriflato o un reactivo de mercurio (II) (HgO/HgBr₂) normalmente a una temperatura elevada en un disolvente aprótico tal como tolueno, acetonitrilo, benceno o una mezcla de cualquiera o todos de estos disolventes.

Los grupos protectores opcionales en los nucleósidos protegidos de fórmula estructural **1-5** pueden disociarse siguiendo las metodologías de desprotección establecidas (T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999).

2. Modificación de un nucleósido preformado

Esquema 2

Pg = Grupo protector

Base = como se define en la presente memoria (opcionalmente protegida)

X = como se define en la presente memoria

R⁶ = como se define en la presente memoria

- 5 El material de partida para este proceso es un nucleósido de purina o pirimidina apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H. El nucleósido puede adquirirse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo las técnicas de acoplamiento estándar. El nucleósido puede protegerse opcionalmente con grupos protectores adecuados, preferiblemente con grupos acilo o sililo, por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, como se enseña en T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

- 10 El nucleósido de purina o pirimidina puede oxidarse a continuación en la posición 2' con el agente oxidante apropiado en un disolvente compatible a una temperatura adecuada para producir el nucleósido 2'-modificado. Agentes oxidantes posibles son una mezcla de dimetilsulfóxido, anhídrido trifluoroacético o anhídrido acético (una oxidación de Swern/Moffat), trióxido de cromo u otro reactivo cromato, peryodinano de Dess-Martin, o por tetróxido
- 15

de rutenio/peryodato de sodio.

5 El nucleósido opcionalmente protegido 2'-cetona se alquila después utilizando dichos agentes alquilantes como metil-litio, trimetilaluminio, bromuro de metilmagnesio o reactivos similares en un disolvente anhidro tal como tetrahidrofurano (THF), cloroformo o éter dietílico normalmente a temperaturas por debajo de 0 °C. Se prefieren compuestos de la fórmula estructural **2-3** que tienen la configuración 2'(S) o 2'-metilo "hacia abajo", 2'-OH "hacia arriba".

10 El nucleósido de la estructura **2-3** puede ser desprotegido y protegido de nuevo con varios grupos protectores tales como un *O*-acilo (alquilo o arilo), *O*-sulfonilo o un *N*-acilo (alquilo o arilo) para la base. Esta etapa de re-protección opcional no necesita estar limitada a grupos protectores que funcionan como grupos protectores químicos. Otros grupos protectores tales como grupos acilo de cadena larga de entre 6 y 18 unidades de carbono o aminoácidos pueden introducirse de manera independiente en la nucleobase o en el azúcar. Los grupos protectores pueden servir como profármacos del principio activo.

15 La Etapa 5 introduce el átomo de flúor en la posición 2' del nucleósido pre-formado. Esto puede lograrse por tratamiento del alcohol terciario, **2-4**, con un reactivo fluorinante comercialmente disponible tal como trifluoruro de (dietilamino)azufre (DAST) o Deoxo-Fluor en un disolvente aprótico, anhidro tal como tetrahidrofurano, cloroformo, diclorometano o tolueno. Preferiblemente la estereoquímica procede con la inversión de la configuración en la posición 2'. Es decir, partiendo de un hidroxilo C-2' "hacia arriba" (o arabinonucleósido) en la estructura **2-4**, el flúor C-2' está "hacia abajo" en el nucleósido intermedio **2-5**. La configuración absoluta de un nucleósido de la estructura **2-4** es (2'S) mientras que la configuración absoluta de un nucleósido de la estructura **2-5** es (2'R).

20 Posteriormente, los nucleósidos del tipo estructural **2-5** pueden desprotegerse por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, como se da por T.W. Greene and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

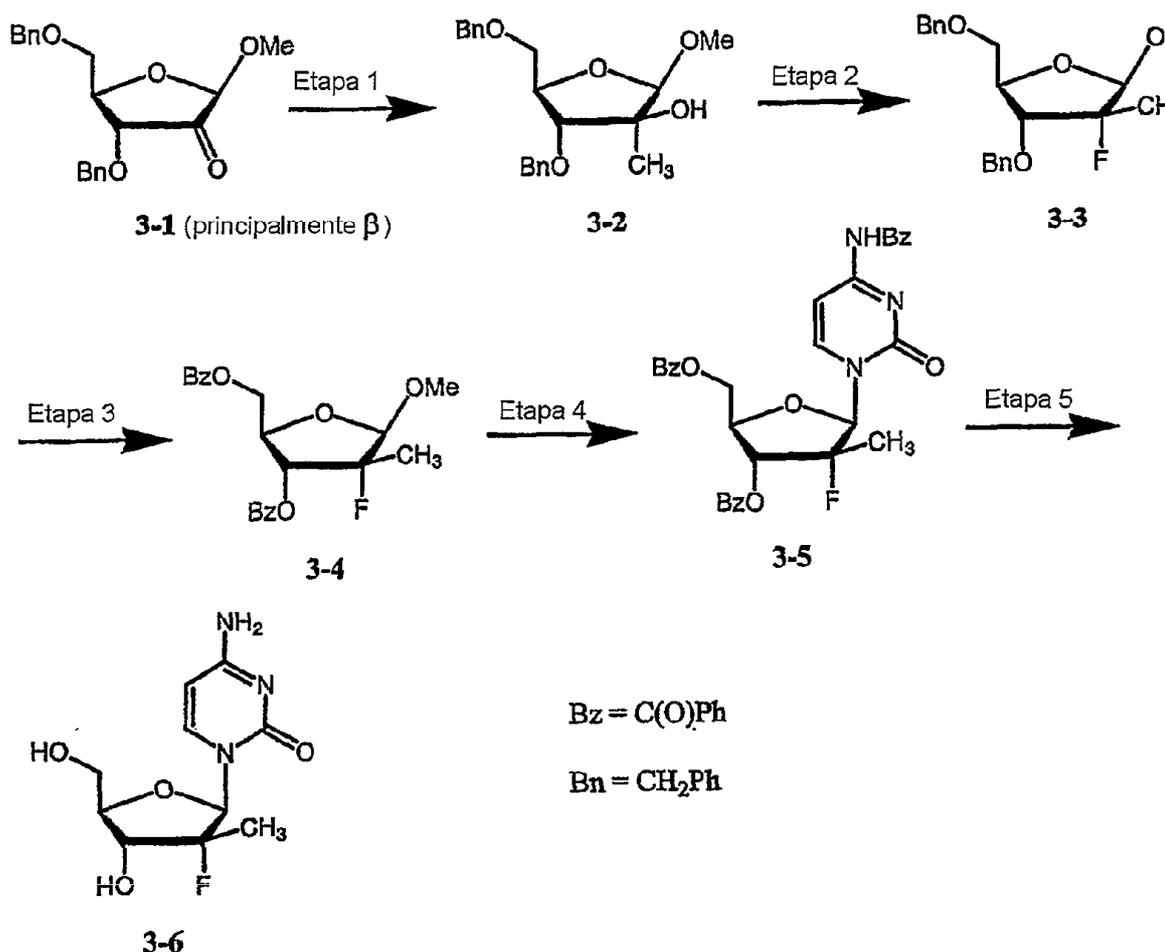
25 Los siguientes ejemplos de trabajo proporcionan un mayor entendimiento del método de la presente invención y además ejemplifican los ejemplos generales de los Esquemas 1 y 2 anteriores. Estos ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Pueden sustituirse los disolventes, reactivos o condiciones de reacción particulares descritos por otros disolventes, reactivos o condiciones de reacción equivalentes, similares o adecuados sin apartarse del alcance general del método.

30

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Síntesis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitosina partiendo de un carbohidrato

Esquema 3

Etapa 1: Se disolvió el compuesto **3-1** (7,7 g, 0,022 mmol) en éter dietílico anhidro y se enfrió a -78 °C. A esta solución se añadió MeLi (30 ml, 1,6 M en éter dietílico). Después de completada la reacción, la mezcla se trató con cloruro de amonio (1M, 65 ml) y se separó la fase orgánica, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en gel de sílice seguido por cristalización en éter dietílico-hexanos produjo el compuesto **3-2** puro (6,31 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,40 (s, 3H), 3,41 (s, 3H), 3,49 (dd, 1H, J = 10,3, 6,89 Hz), 3,57 (dd, 1H, J = 10,3, 3,88 Hz), 3,84 (d, 1H, J = 7,3 Hz), 4,03 (m, 1H), 4,48 (s, 1H), 4,58 (m, 3H), 4,83 (d, 1H, J = 11,6 Hz), 7,31-7,36 (m, 10H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 18,4, 55,4, 72,2, 73,4, 79,5, 80,2, 84,7, 107,4, 127,7, 127,8, 127,83, 128,5, 138,2, 138,3.

Etapa 2: Se disolvió el compuesto **3-2** en CH₂Cl₂ y se trató con DAST (4,0 ml, 30,3 mmol) a temperatura ambiente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla obtenida así se vertió en NaHCO₃ saturado (100 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado (1 x 15 ml). La capa orgánica se procesó de la manera habitual. La cromatografía en gel de sílice (EtOAc-hexanos 1:5) dio el compuesto bruto **3-3** (0,671 g) que era suficientemente puro para la siguiente etapa. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,43 (d, 3H, J = 22,8 Hz), 3,35 (s, 3H), 3,49 (dd, 1H, J = 10,5, 5,4 Hz), 3,55 (dd, 1H, J = 10,5, 4,1 Hz), 3,87 (dd, 1H, J = 23,5, 7,5 Hz), 4,26 (m, 1H), 4,56 (d, 2H, J = 6,9 Hz), 4,66 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 4,72 (d, 1H, J = 10,8 Hz), 7,29-7,36 (m, 10H); RMN de ¹³C

(100 MHz, CDCl₃): δ 17,0 (d, *J* = 24,4 Hz), 55,2, 77,1, 73,4, 73,8, 77,3, 80,3, 81,2 (d, *J* = 16 Hz), 99,7 (d, *J* = 178,9 Hz), 106,8 (d, *J* = 32,0 Hz), 127,7, 127,8, 128,1, 128,3, 128,5, 128,6, 137,8, 138,3; RMN de ¹⁹F (100 MHz, CDCl₃): δ -8,2 (m, 1F).

5 **Etapla 3:** Se disolvió el compuesto **3-3** (0,39 g, 1,1 mmol) en EtOH-EtOAc 1:2 y se trató con Pd/C (~0,1 g) y ciclohexano (~1 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche y luego se filtró a través de celite. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en piridina (~5 ml). A esta solución se añadió cloruro de benzoílo (0,22 ml, 1,83 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó la piridina a vacío y el residuo se dividió entre CH₂Cl₂ y NaHCO₃ saturado (10,0 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y la solución se concentró hasta sequedad. La cromatografía en columna proporcionó 0,350 g del compuesto puro **3-4**. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,53 (d, 3H, *J* = 22,4 Hz), 3,39 (s, 3H), 4,46 (dd, 1H, *J* = 11,6, 4,7 Hz), 4,58 (m, 1H), 4,65 (dd, 1H, *J* = 11,6, 3,9 Hz), 4,87 (d, 1H, *J* = 9,9 Hz), 5,64 (dd, 2H, *J* = 24,1, 7,8 Hz), 7,29-7,36 (m, 10H); RMN de ¹⁹F (100 MHz, CDCl₃): δ -7,5 (m, 1F).

15 **Etapla 4:** Una solución de bis(trimetilsilil)-*N*-benzoilcitosina (0,28 g, 0,77 mmol) y el compuesto **3-4** (0,20 g, 0,5 mmol) en 1,2-dicloroetano (2 ml) y tolueno (2 ml) se trató con TMSOTf (0,15 ml, 0,77 mmol). Después que la mayor parte del material de partida desapareció, como se determina por cromatografía de capa fina, la solución se enfrió a temperatura ambiente, se lavó con agua (1 x 5 ml), salmuera (1 x 5 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró hasta sequedad. La cromatografía instantánea seguida por cristalización en CH₂Cl₂-hexanos produjo el compuesto **3-5** (68 mg). p.f. 241 °C; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,49 (d, 3H, *J* = 22,4 Hz), 4,64 (dd, 1H, *J* = 12,9, 3,4 Hz), 4,73 (ap d, 1H, *J* = 9,5 Hz), 4,89 (dd, 1H, *J* = 12,7, 2,2 Hz), 5,56 (dd, 1H, *J* = 20,7, 8,6 Hz), 6,52 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz), 7,38-7,67 (m, 10H), 7,89 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H), 8,67 (s, 1H); RMN de ¹⁹F (100 MHz, CDCl₃): δ 2,85 (m, 1F).

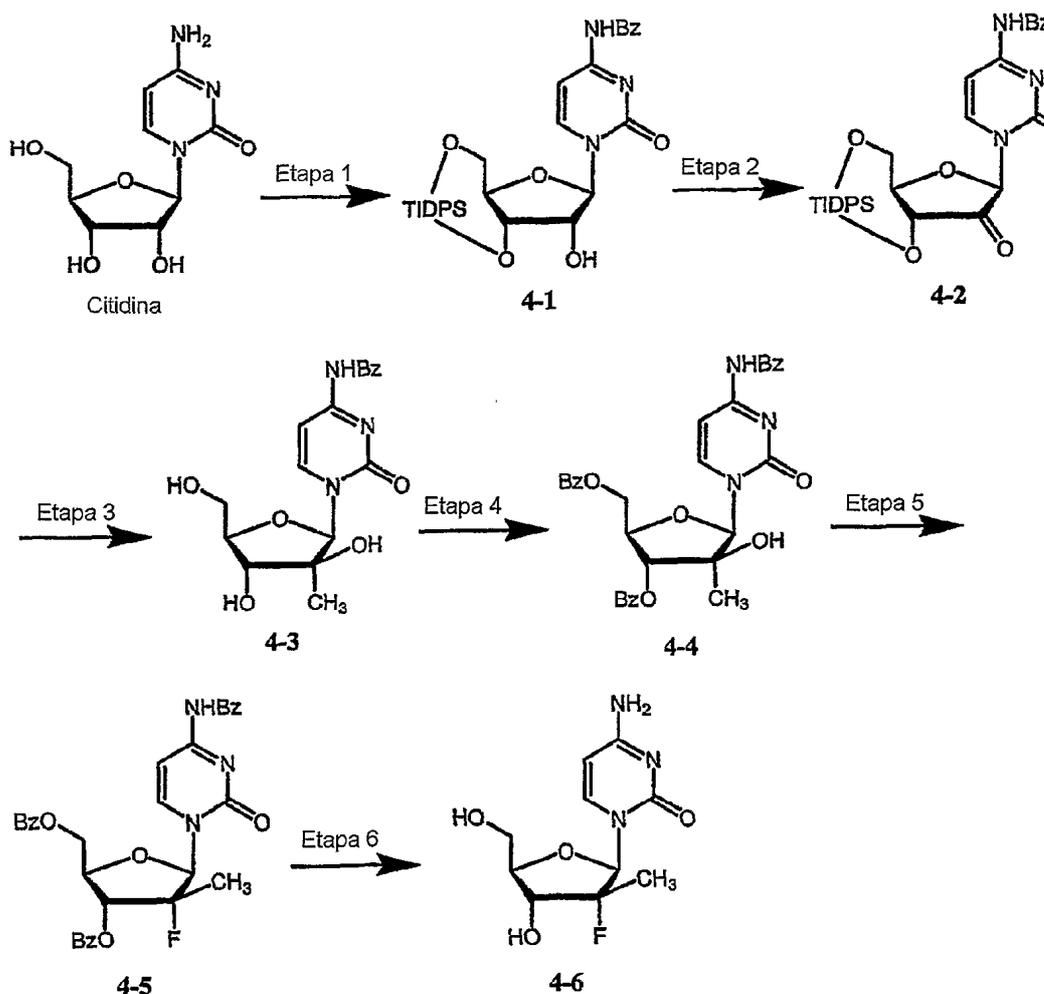
25 **Etapla 5:** Se disolvió el compuesto **3-5** (40 mg, 0,05 mmol) en amoniaco metanólico y se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La solución se concentró hasta sequedad y se cromatografió (SiO₂) eluyendo con EtOH-CH₂Cl₂ 1:4. El rendimiento fue aproximadamente 12 mg de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-*C*-metilcitosina pura, **3-6**. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,16 (d, 3H, *J* = 22,0 Hz), 3,61 (dd, 1H, *J* = 11,6, 5,2 Hz), 3,60-3,83 (m, 3H, *J* = 10,5, 5,4 Hz), 5,24 (s, 1H, intercambiable con D₂O), 5,59 (s, 1H, intercambiable con D₂O), 5,71 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz), 6,08 (d, 1H, *J* = 19,0 Hz), 7,24 (d, 1H, *J* = 17,7 Hz, intercambiable con D₂O), 7,87 (d, 1H); RMN de ¹⁹F (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4,13 (m, 1F).

30

Ejemplo 2

Síntesis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitosina partiendo de citidina

Esquema 4



5

Etapa 1: A una suspensión de citidina (100 g, 0,411 mol) en DMF (2,06 l) se añadió anhídrido benzoico (102,4 g, 0,452 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Se eliminó la DMF a vacío y el residuo se trituroó con éter dietílico. El sólido resultante se recogió por filtración de succión y se lavó con éter dietílico (2 x 200 ml). El secado adicional a vacío a temperatura ambiente dio la N⁴ benzamida (140,6 g, 98,3 %). Se disolvió una porción de este material (139,3 g, 0,401 mol) en piridina anhidra (1,2 l) y se trató con 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano (141,4 ml, 0,441 mol) a temperatura ambiente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró hasta casi sequedad a vacío y se coevaporó con tolueno (3 x 200 ml). El residuo se trató con EtOAc (1,8 l) y se lavó con HCl (2 x 200 ml, 0,05 N), NaHCO₃ (5 %, 2 x 400 ml). La capa orgánica se lavó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se aisló el compuesto 4-1 (256,5 g, >100 %) como una espuma blanca y se utilizó sin otra purificación.

15

Etapa 2: Se disolvió el compuesto 4-1 (236,5 g, 0,40 mol) en THF seco (1,22 l). Se añadió DMSO anhidro (180,8 ml, 2,1 mol) y la solución resultante se enfrió entre -20 °C y -15 °C. Se añadió gota a gota anhídrido trifluoroacético (90,6 ml, 0,64 mol) durante 45 minutos y la solución se agitó entre -20 °C y -15 °C durante 2 horas después de lo cual se

añadió trietilamina anhidra (223,5 ml, 1,6 mol) durante 20 minutos. La reacción bruta que contiene la cetona **4-2** se disolvió en EtOAc (500 ml) y la solución resultante se lavó con H₂O (3 x 400 ml), se secó (Na₂SO₄) y los disolventes se eliminaron a vacío para dar un sólido amarillo que se purificó sobre una columna de gel de sílice con un gradiente en etapas de Et₂O (0-60 %) en hexanos seguido por un gradiente en etapas de EtOAc (50-100 % en hexanos). La cetona bruta obtenida así (~192 g) se cristalizó en éter de petróleo para dar la cetona **4-2** (138,91 g, 57,5 % de citidina) como un sólido blanco y 22 g de material de partida sin reaccionar, **4-1**, como un sólido amarillo.

Etapa 3: Se disolvió el compuesto **4-2** (48,57 g, 8,26 mmol) en tolueno anhidro (~400 ml) y el disolvente se eliminó a vacío con exclusión de humedad. El residuo se secó además luego a vacío (bomba de aceite) durante otras 2 horas. Con exclusión estricta de la humedad, se disolvió la espuma residual en éter dietílico anhidro (1,03 l) en atmósfera de argón. La solución resultante se enfrió a -78 °C en atmósfera de argón y se añadió gota a gota MeLi (1,6 M, 258,0 ml, 0,413 mol) mediante un embudo de adición. Después que se completó la adición, la mezcla se agitó durante 2 horas a -78 °C. Se agregó lentamente NH₄Cl 1 M acuoso (500 ml). Después del calentamiento a temperatura ambiente, se lavó la mezcla con H₂O (2 x 500 ml), se secó (Na₂SO₄) y después se concentró hasta sequedad para dar una espuma marrón (~60 g, >100 %).

La reacción se realizó dos veces más usando 37,62 g y 56,4 g del compuesto **4-2**. Los productos brutos combinados (128,0 g, 0,212 mol) se disolvieron en THF (1,28 l) y se trataron con HOAc concentrado (23 ml, 0,402 mol). A la solución se añadió TBAF (384,0 ml, 1 M en THF). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 0,75 horas y la mezcla se trató con gel de sílice (750 g) y se concentró hasta sequedad. El polvo se colocó en una columna de gel de sílice empaquetada en CH₂Cl₂. La elución con EtOH-CH₂Cl₂ 1:7 produjo un sólido ceroso oscuro que se pre-adsorbió sobre gel de sílice (300 g) y se cromatografió como antes. El compuesto **4-3** (46,4 g, 53,0 % de **4-2**) se aisló como un sólido blanquecino. RMN de ¹H (DMSO-d₆): δ 1,20 (s, 3H, CH₃), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,73-3,78 (m, 2H), 5,19 (t, 1H, J = 5,4 Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH-2'), 5,52 (d, 1H, J = 5,0 Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, J = 5,8 Hz), 7,50 (Ψt, 2H, J = 7,7 Hz), 7,62 (Ψt, 1H, J = 7,3 Hz), 8,00 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 8,14 (d, 1H, J = 6,9 Hz), 11,22 (s, 1H, NH). Anal. Calc. para C₁₇H₁₉N₃O₆ • 0,5 H₂O: C, 55,13; H, 5,44; N, 11,35. Hallado: C, 55,21; H, 5,47; N, 11,33.

Etapa 4: Se disolvió el compuesto **4-3** (46,0 g, 0,13 mol) en piridina anhidra y se concentró hasta sequedad a vacío. Se disolvió el jarabe resultante en piridina anhidra en atmósfera de argón y se enfrió a 0 °C con agitación. La solución de color marrón se trató con cloruro de benzoilo (30 ml, 0,250 mol) gota a gota durante 10 minutos. Se eliminó el baño con hielo y se continuó la agitación durante 1,5 horas y la cromatografía en capa fina no mostró material de partida restante. La mezcla se enfrió rápidamente mediante la adición de agua (5 ml) y se concentró hasta sequedad. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ saturado (1 x 500 ml) y H₂O (1 x 500 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se filtró, se concentró hasta sequedad y se sometió a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente en etapas de EtOAc-hexanos (25-60 %) para proporcionar el compuesto **4-4** como una espuma amarilla (48,5 g, 67 %). RMN de ¹H (CDCl₃): δ 1,64 (s, 3H, CH₃), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5',5a'), 5,50 (d, 1H, J = 3,4 Hz, H-3'), 6,42 (s, 1H, H-1'), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, J = 7,3 Hz). Anal. Calc. para C₃₁H₂₇N₃O₈: C, 65,37; H, 4,78; N, 7,38. Hallado: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

Etapa 5: Se disolvió el compuesto **4-4** (7,50 g, 0,013 mol) en tolueno anhidro (150 ml) en atmósfera de argón y se enfrió a -20 °C. Se añadió lentamente DAST (2,5 ml, 18,9 mmol) y se eliminó el baño de enfriamiento después de que se completó la adición. Se continuó la agitación durante 1 hora y la mezcla se vertió en NaHCO₃ saturado (100 ml) y se lavó hasta que cesó la emisión de gas. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se concentró y se purificó por cromatografía de gel de sílice eluyendo con EtOAc-hexanos 1:1. El rendimiento fue de 1,22 g (16,3 %) de **4-5** puro como un sólido blanco. P.f. 241 °C (CH₂Cl₂-hexanos); RMN de ¹H (CDCl₃): δ 1,49 (d, 3H, J = 22,4 Hz, CH₃), 4,64 (dd, 1H, J = 3,44, 12,9 Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, J = 9,5 Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, J = 2,4, 12,7 Hz, H-5a'), 5,56 (dd, 1H, J = 8,6, 20,7 Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, J = 18,0 Hz, H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, J = 6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H, Ar), 8,67 (sa, 1H, NH). RMN de ¹⁹F (CDCl₃): δ 3,3 (m). Anal. Calc. para C₃₁H₂₆FN₃O₇ • 0,7 H₂O: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20. Hallado: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20.

Etapa 6: Se suspendió el compuesto **4-5** (6,30 g, 0,011 mol) en amoníaco metanólico (aprox. 7 N, 150 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó a vacío, se co-evaporó con metanol (1 x 20 ml) y se pre-adsorbió sobre gel de sílice. El polvo blanco se colocó en una columna de gel de sílice (empaquetada en CHCl₃) y se eluyó la columna con EtOH al 9 % en CHCl₃, luego EtOH al 17 % y finalmente EtOH al 25 % en CHCl₃. La concentración de las fracciones que contienen el producto, la filtración a través de un disco de 0,4 μm y la liofilización de agua produjeron el compuesto **4-6**, 2,18 g (76 %). RMN de ¹H (DMSO-d₆): δ 1,17 (d, 3H, J = 22,3 Hz, CH₃), 3,63 (dd, 1H, J = 2,7, 13,7 Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (app s, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, J = 5,4 Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, J = 7,71 Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, J = 18,9 Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH₂), 7,42 (s, 1H, NH₂), 7,90 (d, 1H, J = 7,3 Hz, H-6). RMN de ¹⁹F (DMSO-d₆): δ 2,60 (m). Anal. Calc. para C₁₀H₁₄FN₃O₄ 1,4 H₂O: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77. Hallado: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. Se convirtió el compuesto **4-6** (0,10 g, 0,386 mmol) en la sal clorhidrato disolviendo en agua (2 ml) y ajustando el pH a aproximadamente 3,0 con HCl 1 M. Se eliminó el agua a vacío y el residuo se cristalizó a partir de EtOH acuoso para dar **4-6** como la sal clorhidrato (71,0 mg). p.f. 243 °C (descomposición); RMN de ¹H (DMSO-d₆): δ 1,29 (d, 3H, J = 22,6 Hz, CH₃), 3,65 (dd, 1H, J = 2,3, 12,7 Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, J = 17,3 Hz, H-1'), 6,15 (d, 1H, J = 7,9 Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, J = 7,9

H_z, H-6), 8,69 (s, 1,5H, NH), 9,78 (s, 1,5H, NH). RMN de ¹⁹F (DMSO-d₆): δ 1,69 (m). Anal. Calc. para C₁₀H₁₄FN₃O₄ · HCl: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21. Hallado: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

Ejemplo 3

5

Actividad antiviral de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. Ensayo del replicón del VHC

La actividad anti-flavivirus de los compuestos se determinó como se describe por Stuyver, et al. ("Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhoea and hepatitis C viruses in culture", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:244-254 (2003)). Se disolvió el compuesto en DMSO y se añadió a los medios de cultivo en concentraciones finales que varían de 3 a 100 µM. Una incubación de 4 días tuvo como resultado la reducción dependiente de la dosis del ARN del replicón del VHC (Figura 1A). A aproximadamente 2,5 µM, se logró una reducción de 1-log del ARN del replicón (o valor CE₉₀). La medición de la reducción del ARNr dio una indicación del efecto inhibitorio sobre las polimerasas celulares. La substracción de este valor de toxicidad celular de los valores antivirales tuvo como resultado la línea del índice terapéutico y el valor CE₉₀. Basándose en estos cálculos, se obtuvo un valor promedio de CE₉₀, corregido para la toxicidad celular, de aproximadamente 2,5 µM. La Figura 1A muestra la reducción dependiente de la dosis del ARN del replicón del VHC basado en el tratamiento con (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. La reducción viral se comparó con la reducción de los niveles de ARN celular (ARN ribosómico) para obtener valores de índice terapéutico. La CE₉₀ representa la concentración efectiva del 90 % en 96 horas después de la administración dependiente de la dosis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. La Figura 1B muestra la reducción prolongada en el ARN del replicón del VHC hasta 7 días después del tratamiento con 5 y 25 µM.

La actividad de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina en el sistema del replicón se resume en la Tabla 1. Los valores de CE₉₀ para la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina así como también de la 2'-C-metilcitidina y la 2'-C-metiladenosina se muestran para los tres diferentes clones del replicón (VHC-WT (Tipo Silvestre), 9-13 y 21-5) así como los otros dos clones (S282T y ARNr). Los valores de CE₉₀ para la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina estaban en el intervalo de 1,6 a 4,6 µM para los clones del replicón. Por el contrario, los valores de CE₉₀ para la 2'-C-metilcitidina estaban en el intervalo de 6,6-37,4 µM. Es interesante señalar que los valores de CE₉₀ para la 2'-C-metiladenosina eran comparables a los de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. La actividad de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina y la 2'-C-metilcitidina en otros replicones probados se muestra en la Tabla 2.

Ensayo de la polimerasa

La Tabla 3 muestra la potencia de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina-5'-trifosfato (TP) en el ensayo de la NS5B polimerasa. Se determinó que la concentración inhibitoria del 50 % estaba en el intervalo de 1,7 a 7,7 µM.

Toxicidad

Un resumen de los datos de toxicidad para la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina utilizando el ensayo de toxicidad mitocondrial se muestra en las Tablas 6 y 7. La Tabla 7 muestra la falta de efectos de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina y la 2'-C-metilcitidina en la síntesis de ADN mitocondrial y la falta de los efectos sobre el aumento de ácido láctico en este ensayo. Los resultados muestran la falta relativa de toxicidad de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. La Tabla 6 muestra un análisis de citotoxicidad en diversas líneas celulares (Clon A, Huh7, HepG2, MDBK, PBM, CEM, Vero, MRC-5). La concentración citotóxica al 50 % (CC₅₀) fue mayor de 75-100 µM en todos los clones probados para (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina, así como la 2'-C-metilcitidina. Por el contrario, cabe señalar la toxicidad relativa de la 2'-C-metiladenosina.

Los efectos de los análogos de nucleósidos probados en células de médula ósea humana se presentan en la Tabla 9. Como se muestra, los valores de CI₅₀ para la 2'-metil-2'-fluorocitidina fueron significativamente mayores (98,2, BFU-E) y 93,9 (CFU-GM) en comparación con la 2'-metilcitidina o AZT. Los resultados muestran que la 2'-metil-2'-fluorocitidina fue significativamente menos tóxica comparado con los otros compuestos de nucleósido.

Estudios en animales

La Figura 2 representa el cambio de peso promedio (%) de ratones Suizos hembras in vivo en el análisis de toxicidad de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina en diversas dosis. Se administraron inyecciones intraperitoneales en los días 0 al día 5 de 0, 3,3, 10, 33, 100 mg/kg. Cada grupo de dosificación contenía 5 ratones y no se murió ningún ratón durante el estudio de 30 días. No se observó toxicidad significativa en los ratones.

La Figura 3 y la Tabla 6 resumen los parámetros farmacocinéticos de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina en monos Rhesus a los que se administró una única dosis oral (33,3 mg/kg) (Tabla 6, Figura 3) o dosis intravenosa (Figura 3) de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina.

65

Otra actividad antiviral

El resumen del intervalo de la actividad antiviral de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina se muestra en la Tabla 4. La Tabla 4 muestra que además de contra el VHC, la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina muestra actividad contra rinovirus, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue.

La Tabla 5 muestra la falta de actividad de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina en modelos de BVDV sustitutos del VHC, así como otros virus incluyendo VIH, VHB y coronavirus. Por el contrario, la 2'-C-metilcitidina y la 2'-C-metiladenosina muestran mayor actividad en el modelo sustituto del VHC, BVDV. Estos resultados muestran la necesidad de seleccionar esta serie de compuestos contra el sistema de replicón del VHC frente a sistemas sustitutos del VHC.

Tabla 1: Resumen de la actividad del replicón anti-VHC de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina*

Replicón	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina	2'-C-metilcitidina	2'-C-metiladenosina
VHC-WT 1b	4,6 ± 2,0	21,9 ± 4,3	2,1 ± 0,27
S282T mut. 1b	30,7 ± 11,7	37,4 ± 12,1	>100
9-13 (subgenómico)	4,6 ± 2,3	13,0	0,7
21-5 (longitud completa)	1,6 ± 0,7	6,6	0,6

* Valores representados CE₉₀ (µM)

Tabla 2: Actividad de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina en otros replicones

Replicón	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina			2'-C-metilcitidina		
	CE ₉₀ (µM)	CI ₉₀ (µM)		CE ₉₀ (µM)	CI ₉₀ (µM)	
		GAPDH	MTT		GAPDH	MTT
1b (Ntat)	3,8	>100	>100	27,2	>100	>100
1b (Btat)	11,5	>100	>100	31,1	>100	>100
1a (pplaSI-7)	34,7	>100	>100	35,0	>100	>100

Tabla 3: Ensayo de la NS5B polimerasa del VHC 1b (CI₅₀, µM)

	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina TP	2'-C-metilcitidina TP	2'-C-metiladenosina TP
NS5B Tipo silvestre	1,7 ± 0,4 ^a	6,0 ± 0,5	20,6 ± 5,2
	7,7 ± 1,2 ^b		
S282T	2,0 ^a	26,9 ± 5,5	>100
	8,3 ± 2,4 ^c		

^a Valores determinados usando el lote 1; ^b Valor determinado usando el lote 2 y 3 y ^c Valor determinado usando el lote 2.

Tabla 4: Resumen de la actividad antiviral de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina

Virus	Célula	CE ₅₀ , CPE (µM)	CE ₅₀ , NR ^a (µM)	CC ₅₀ , CPE (µM)	CC ₅₀ , NR ^a (µM)
Nilo Occidental	Vero	32	12	>100	32
Dengue tipo 2	Vero	32/55	>100/>100	>100	>100
Fiebre amarilla	Vero	19/3,2	32/12	>100	>100
Gripe A (H1N1)	MDCK	>100	>100	>100	>100
Gripe A (H3N2)	MDCK	>100	>100	>100	>100
Gripe B	MDCK	>100	>100	>100	>100
Rinovirus tipo 2	KB	25	20	>100	>100
VEE	Vero	>100	>100	>100	>100
SARSCoV	Vero	>100	>100	>100	>100

^aNR = Rojo neutro.

Tabla 5: Resumen de la actividad antiviral de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina

Virus	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina (CE ₉₀ , µM)	2'-C-metilcitidina (CE ₉₀ , µM)	2'-C-metiladenosina (CE ₉₀ , µM)
BVDVncp	>22	0,5	1,2
BVDVcp	>100	2	1,5
RSV	>100	>100	>100
VIH ^a	>100	ND	ND
VHB	>10	>10	ND
Coronavirus 229E	>100	ND	ND

ND = No determinado.

Tabla 6: Estudios de citotoxicidad^a

Línea celular	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina CC ₅₀ , µM	2'-C-metilcitidina CC ₅₀ , µM	2'-C-metiladenosina CC ₅₀ , µM
CloneA	>100	>100	37
Huh7	>100	>100	30
HepG2	75	>100	58
MDBK	>100	>100	
PBM	>100		
CEM	>100		
Vero	>100		
MRC-5	>100		

^a Resultados determinados usando el ensayo MTS.

5

Tabla 7: Estudio de toxicidad mitocondrial

Compuesto	Síntesis de ADNmt (CI ₅₀ , µM)	Aumento del ácido láctico
(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina	>25	Sin efecto ≥ 33 µM
2'-C-metilcitidina	>25	Sin efecto ≥ 33 µM

Tabla 8: Parámetros FC preliminares en monos Rhesus tras una única dosis oral de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina a 33,3 mg/kg

Parámetro	Unidades	Media ± DE
C _{máx}	µM	9,6 ± 2,7
T _{máx}	horas	2 ± 1
AUC _{0-final}	µMxh	44,2 ± 22,2
T _{1/2}	horas	3,9 ± 0,1
Biodisponibilidad	F %	21 ± 11

10

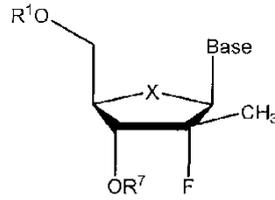
Tabla 9: Efecto de los análogos de nucleósidos sobre células de médula ósea humana

Compuesto (análogo β-D)	BFU-E	CFU-GM
	CI ₅₀ (µM)	
2'-fluoro-2'-C-metilcitidina	98,2	93,9
2'-C-metilcitidina	20,1	13,2
AZT	0,08	0,95

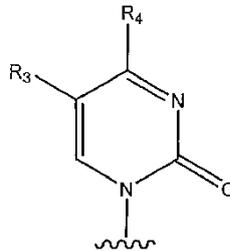
REIVINDICACIONES

1. Un nucleósido (β -D o β -L) de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la estructura:

5



en la que la Base es una base pirimidínica representada por la siguiente fórmula



10

X es O;
 R¹ y R⁷ son independientemente H, un monofosfato, un difosfato o un trifosfato;
 R³ es H y
 R⁴ es NH₂ u OH.

15

2. El nucleósido (β -D o β -L) de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R⁷ es H y R¹ es un monofosfato, un difosfato o un trifosfato.

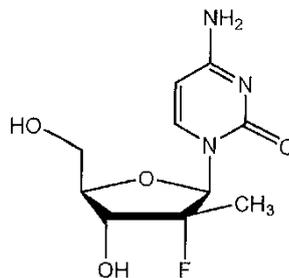
20

3. El nucleósido (β -D o β -L) de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R⁷ es H y R¹ es un trifosfato.

4. El nucleósido (β -D o β -L) de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R¹ y R⁷ son H.

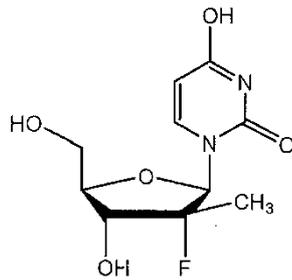
25

5. Un nucleósido (β -D) de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la fórmula:



30

6. Un nucleósido (β -D) de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la fórmula:



7. Una composición farmacéutica que comprende un nucleósido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5
8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición comprende un nucleósido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición comprende un nucleósido de acuerdo con la reivindicación 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15
10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición comprende un nucleósido de acuerdo con la reivindicación 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición comprende un nucleósido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 y 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

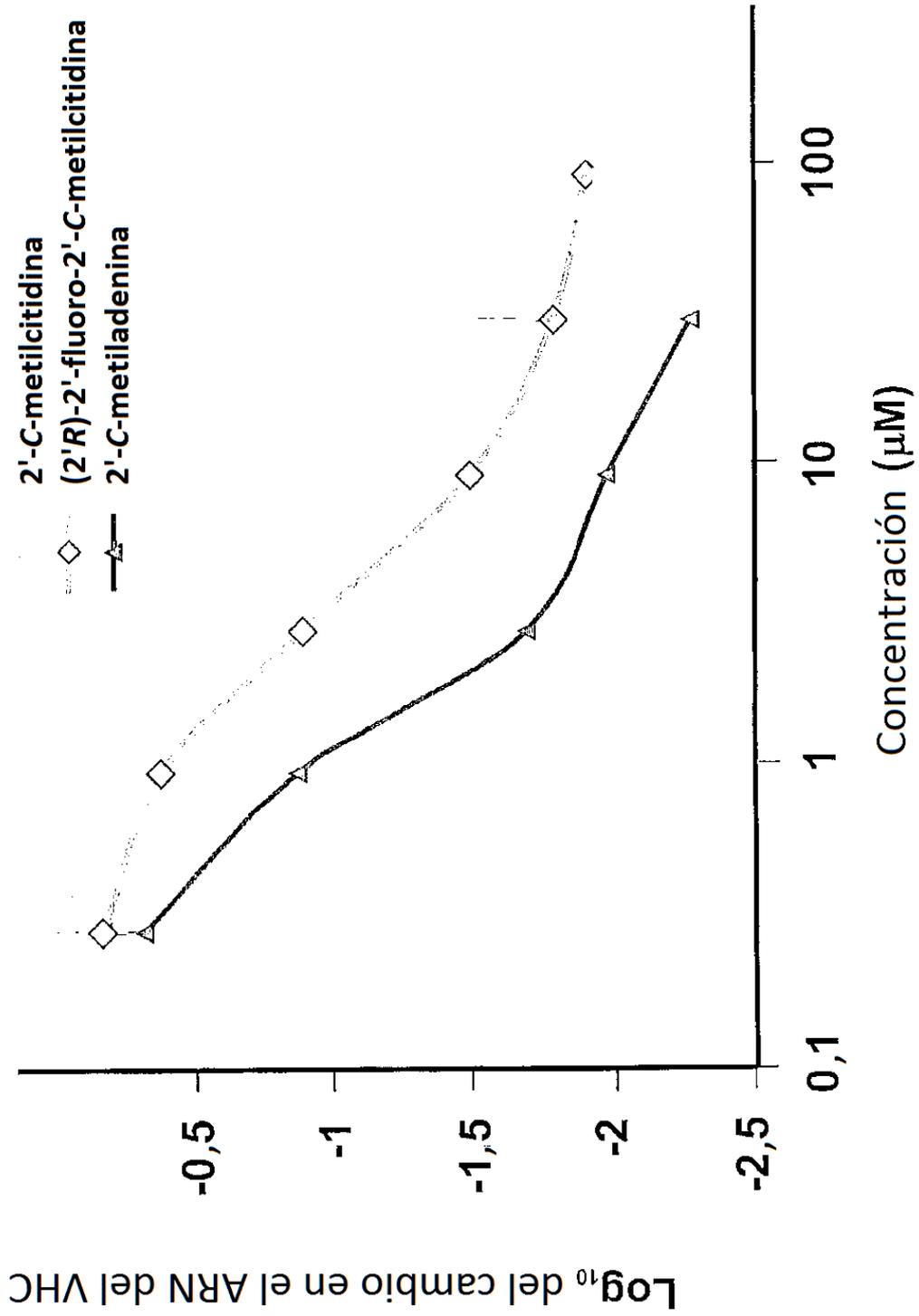


Figura 1A

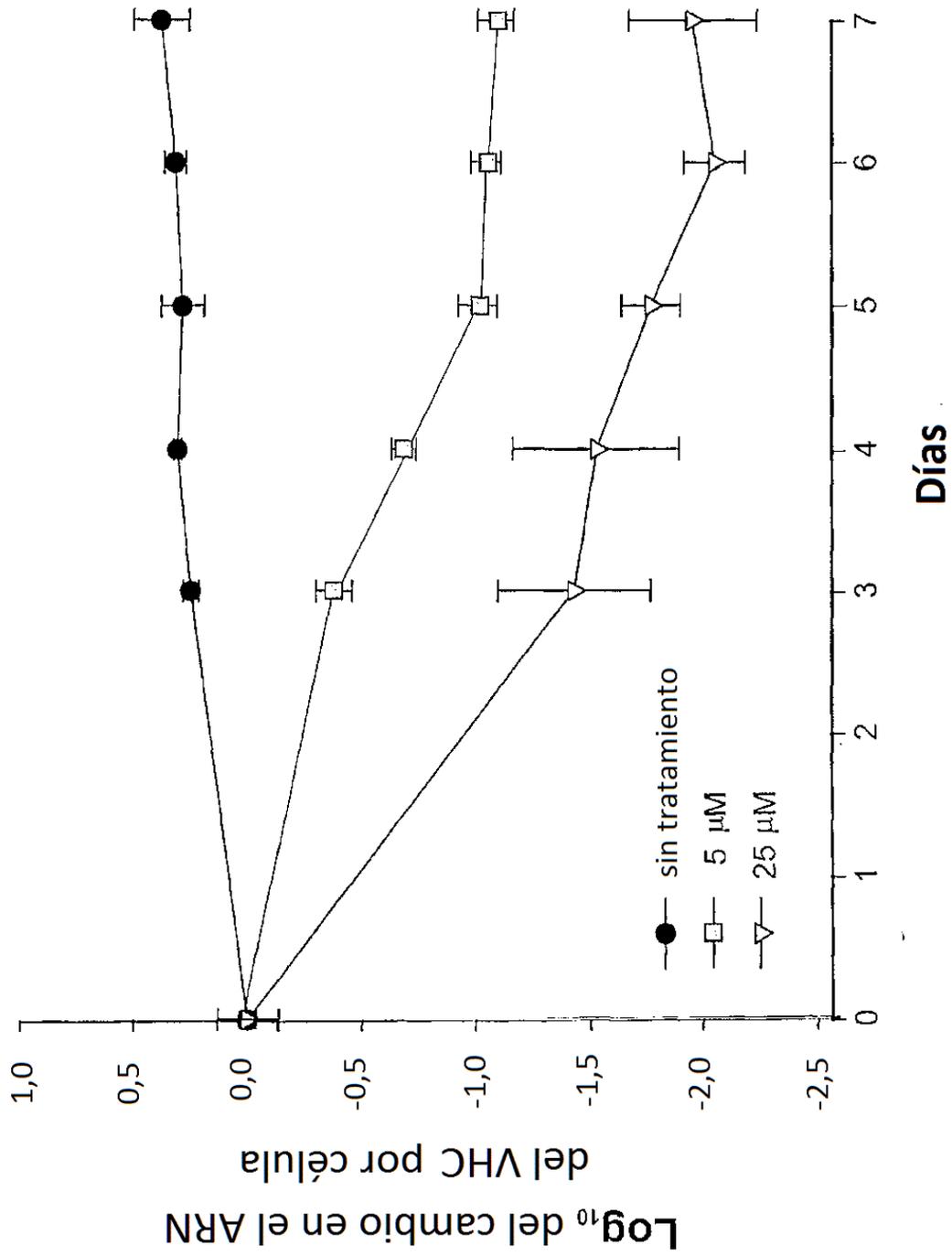


Figura 1B

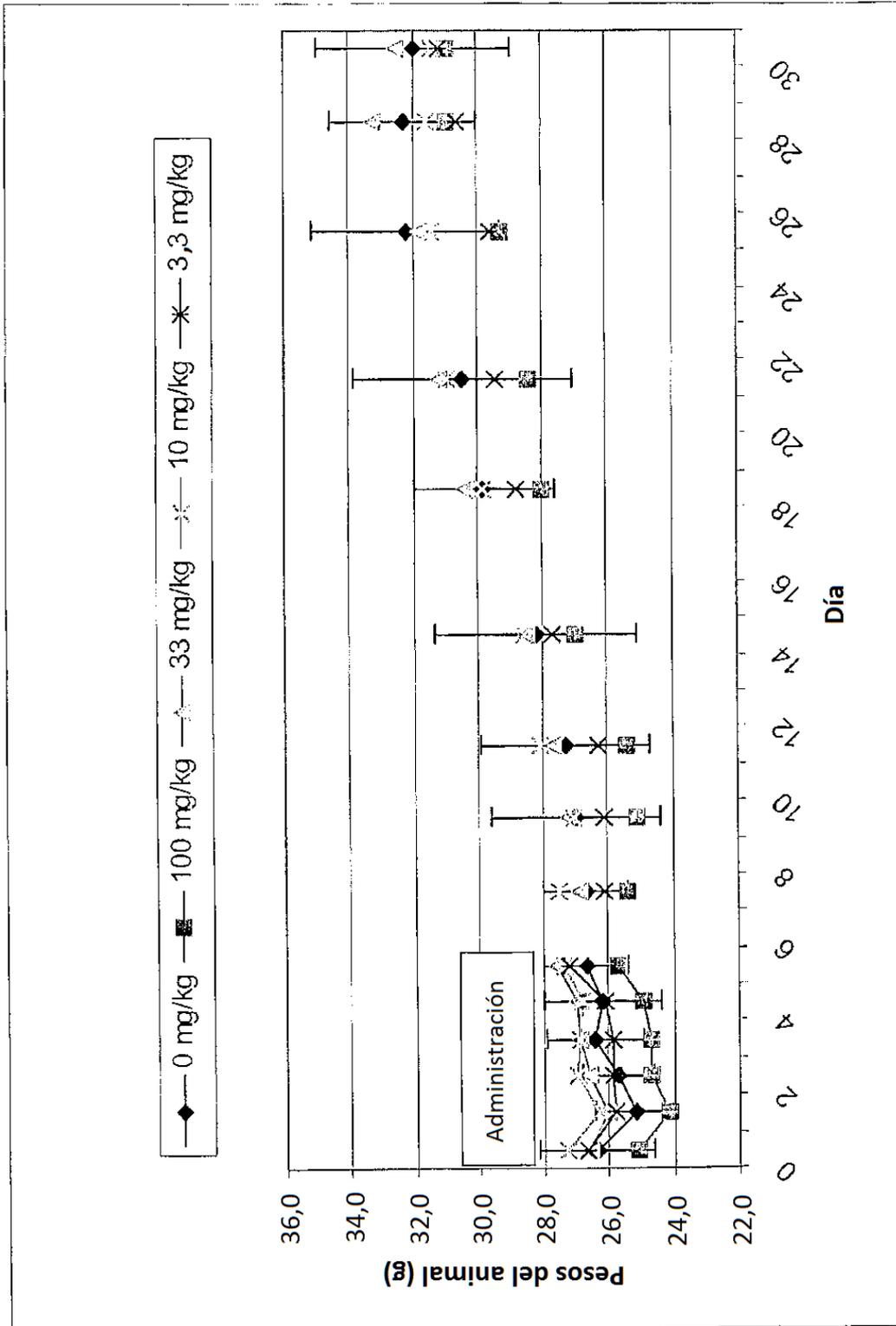


Figura 2

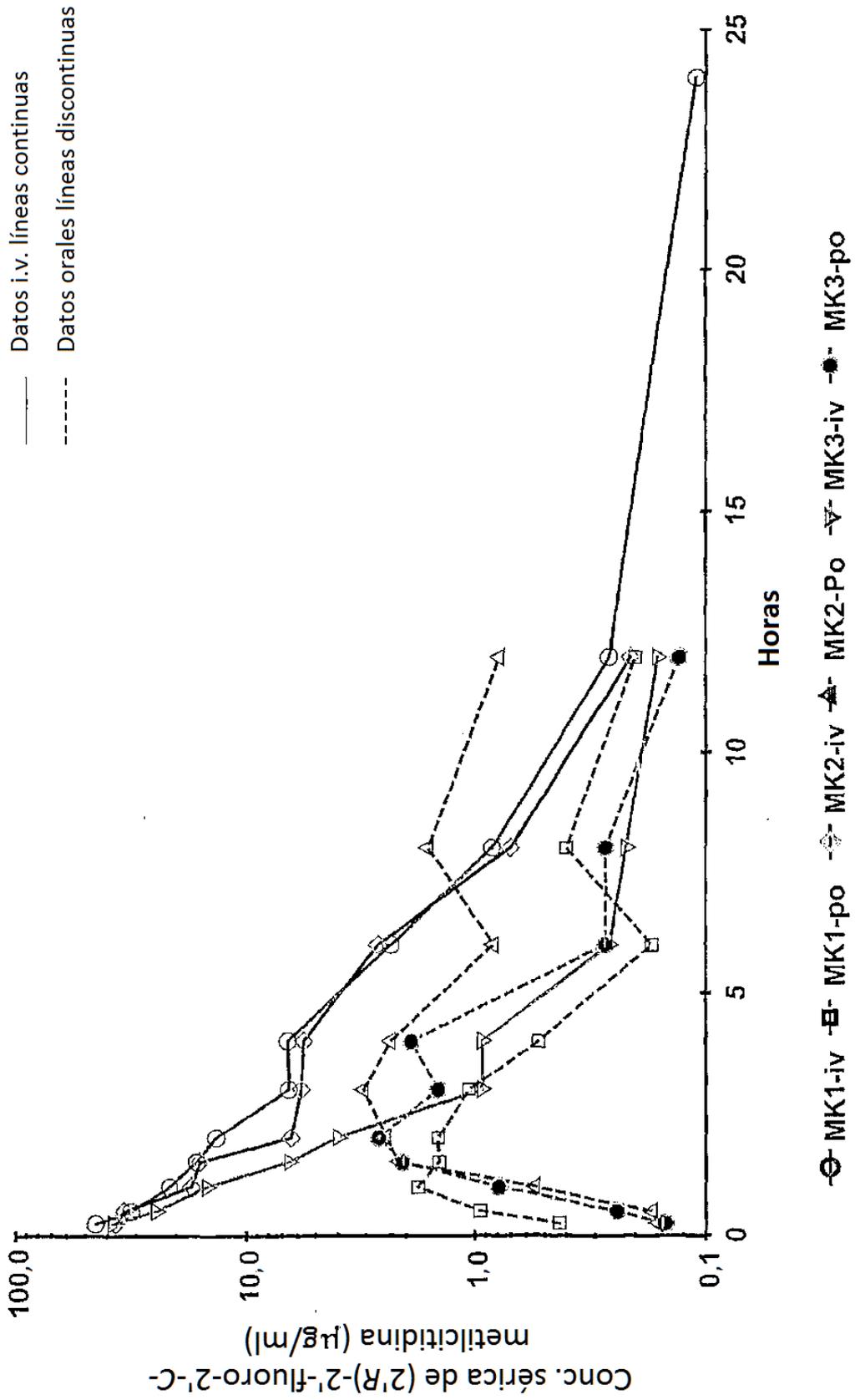


Figura 3