

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 433**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2011 PCT/EP2011/069864**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12062869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2011 E 11781797 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2638053**

54 Título: **Fosforamidados de espironucleósido oxetánico uracílico**

30 Prioridad:

10.11.2010 EP 10190658

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

14.03.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN PRODUCTS, L.P. (50.0%)
800/850 Ridgeway Drive
Horsham PA 19044, US y
MEDIVIR AB (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JONCKERS, TIM HUGO MARIA;
RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD;
VANDYCK, KOEN;
VAN HOOFF, STEVEN MAURICE PAULA;
HU, LILI y
TAHRI, ABDELLAH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 605 433 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

Fosforamidatos de espiro nucleósido oxetánico uracílico.

Antecedentes de la invención

5 Esta invención se refiere a un fosforamidato de espiro nucleósido oxetánico uracílico útil en el tratamiento de pacientes infectados con el virus de la hepatitis C (HCV, por sus siglas en inglés).

10 El HCV es un virus de ARN de sentido positivo, monocatenario, que pertenece a la familia *Flaviviridae* de los virus en el género hepacivirus. La región NS5B del poligen de ARN codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), que es esencial para la replicación vírica. Después de la infección aguda inicial, una mayoría de los individuos infectados desarrolla hepatitis crónica debido a que el HCV se replica preferentemente en los hepatocitos pero no es directamente citopática. En particular, la ausencia de una respuesta vigorosa de los linfocitos T y la alta propensión del virus a mutar parecen fomentar una alta tasa de infección crónica. La hepatitis crónica puede progresar a fibrosis hepática, conduciendo a cirrosis, enfermedad hepática terminal y HCC (carcinoma hepatocelular), haciéndola la causa principal de trasplantes de hígado. Hay seis genotipos de HCV principales y más de 50 subtipos, que se distribuyen geográficamente de manera diferente. El genotipo 1 de HCV es el genotipo predominante en Europa y en los Estados Unidos. La extensa heterogeneidad genética de HCV presenta importantes implicaciones de diagnóstico y clínicas, que explica quizá las dificultades en el desarrollo de vacunas y la ausencia de respuesta al tratamiento actual.

20 La transmisión de HCV puede tener lugar por contacto con sangre o productos sanguíneos contaminados, por ejemplo después de transfusión sanguínea o uso de fármacos intravenosos. La introducción de ensayos de diagnóstico usados en cribado sanguíneo ha conducido a una tendencia descendente en la frecuencia de HCV postransfusión. Sin embargo, dado el lento progreso a la enfermedad hepática terminal, las infecciones existentes continuarán presentando una seria carga médica y económica durante décadas.

25 El tratamiento actual de HCV se basa en interferón-alfa (pegilado) (IFN- α) junto con ribavirina. Este tratamiento asociado proporciona una respuesta virológica sostenida en más del 40% de los pacientes infectados por HCV de genotipo 1 y aproximadamente 80% de los infectados por los genotipos 2 y 3. Además de la eficacia limitada contra el genotipo 1 de HCV, este tratamiento asociado presenta efectos secundarios significativos y es deficientemente tolerado en muchos pacientes. Los principales efectos secundarios incluyen síntomas de tipo gripe, anomalías hematológicas y síntomas neuropsiquiátricos. Por lo tanto, hay una necesidad de tratamientos más eficaces, convenientes y mejor tolerados.

30 La experiencia con fármacos de VIH, en particular con inhibidores de la proteasa del VIH, ha explicado que la farmacocinética subóptima y las pautas posológicas complejas dan como resultado rápidamente fracasos en la adhesión al tratamiento accidentales. Esto a su vez significa que la concentración mínima de 24 horas (concentración mínima en plasma) para los respectivos fármacos en un tratamiento de VIH con frecuencia cae por debajo del umbral de IC₉₀ o ED₉₀ durante partes prolongadas del día. Se considera que una concentración mínima de 24 horas de al menos el IC₅₀, y de manera más realista, el IC₉₀ o ED₉₀, es esencial para retardar el desarrollo de mutantes de escape del fármaco. Conseguir la farmacocinética y el metabolismo del fármaco, necesarios, para permitir dichas concentraciones mínimas proporciona un reto riguroso para el diseño de fármacos.

40 La RdRp de NS5B es esencial para la replicación del genoma de ARN de HCV, de sentido positivo, monocatenario. Esta enzima ha provocado un interés significativo entre los químicos farmacéuticos. Se conocen tanto los inhibidores de nucleósidos como de no nucleósidos de NS5B. Los inhibidores de los nucleósidos pueden actuar como terminador de cadena o como un inhibidor competitivo o como ambos. Para ser activos, se tienen que absorber los inhibidores de nucleósidos por la célula y convertirse *in vivo* en un trifosfato. Esta conversión en el trifosfato está mediada comúnmente por cinasas celulares, que imparte requerimientos estructurales adicionales sobre un inhibidor nucleósido de la polimerasa potencial. Además esto limita la evaluación directa de los nucleósidos como inhibidores de la replicación de HCV para ensayos basados en células capaces de fosforilación *in situ*.

45 Se han realizado diversos intentos para desarrollar nucleósidos como inhibidores de RdRp de HCV, ninguno ha proseguido todo el camino hasta el registro. Entre los problemas que han encontrado los nucleósidos fijados como objetivo de HCV hasta la fecha son toxicidad, mutagenicidad, ausencia de selectividad, deficiente eficacia, deficiente biodisponibilidad, pautas posológicas subóptimas y consiguiente alta carga de medicamentos y coste de productos.

50 Hay una necesidad de inhibidores de HCV que puedan superar las desventajas del tratamiento de HCV actual tales como efectos secundarios, eficacia limitada, la aparición de resistencia y fracasos en la adhesión al tratamiento, así como mejorar la respuesta vírica sostenida.

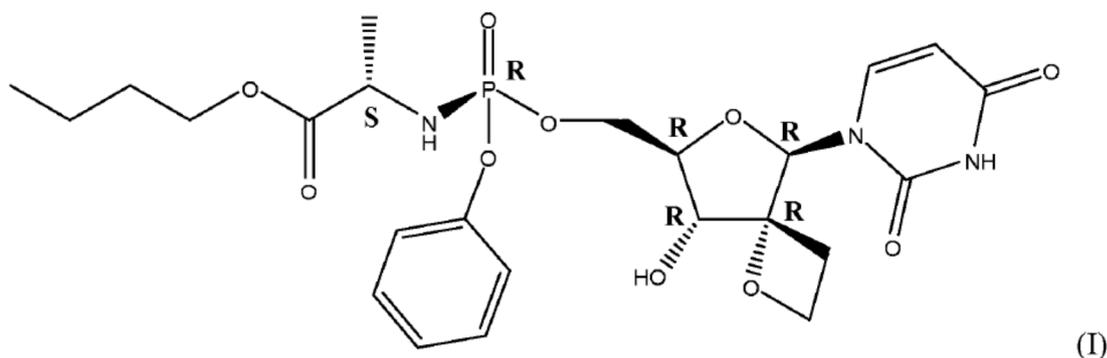
55 La presente invención se refiere a N-[(R)-[[[(4R,5R,7R,8R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[3.4]oct-7-il]metoxi](fenoxi)-fosforil]-L-alaninato de butilo con propiedades antivíricas útiles. Se han descrito espiro nucleósidos oxetánicos, en particular 1-(2-O,2-C-etano- β -D-ribofuranosil)timina y 1-(2-O,2-C-etano- β -D-ribofuranosil)uracilo en *Org. Biomol. Chem.*, 2.003, 3.514-3.526. Se ensayaron estos compuestos contra VIH, pero no se encontró actividad. La patente internacional WO 2007/095269, la patente internacional WO 2007/020193 y la

patente internacional WO 2006/012078 describen todos compuestos anti-HCV que consisten en nucleósidos modificados ligados a un profármaco de fosoramidato.

El compuesto de la invención también puede ser atractivo debido al hecho de que carece de actividad frente a otros virus, en particular frente a VIH. Los pacientes infectados por VIH con frecuencia padecen co-infecciones tales como HCV. El tratamiento de dichos pacientes con un inhibidor de HCV que también inhibe VIH puede conducir a la aparición de cepas de VIH resistentes.

Descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona N-[(R)-{[(4R,5R,7R,8R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[3.4]oct-7-il]metoxi}(fenoxi)fosforil]-L-alaninato de butilo y las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos del mismo. Este compuesto se representa por la fórmula I:



Siempre que se use en la presente memoria, el término "compuesto de la fórmula I", "el compuesto presente", "compuesto de la presente invención", significa que incluye el compuesto de la fórmula I así como las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, a menos que se especifique de otro modo.

El nombre IUPAC en esta descripción para el compuesto de la fórmula (I) ha sido generado por la versión 12 del programa informático NAME ACD/Labs comercial.

En un aspecto más, la invención se refiere al uso del compuesto de la fórmula I como una medicina, más en particular, para inhibir HCV. Convenientemente, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula I para uso en el tratamiento o la profilaxis de infección por HCV. Alternativamente, se proporciona el uso de un compuesto de la fórmula I para la fabricación de un medicamento para inhibir HCV. Convenientemente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de la fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de infección por HCV.

Genotipos de HCV representativos en el contexto de tratamiento o profilaxis según la invención incluyen genotipo 1b (dominante en Europa) o 1a (dominante en Norteamérica). La invención también proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de infección por HCV, en particular del genotipo 1a o 1b.

El compuesto de la fórmula (I) es una forma estereoisómera pura. Una forma estereoisómera pura como se menciona en la presente memoria se define como un estereoisómero sustancialmente exento de otras formas enantiómeras o diastereómeras de la misma estructura molecular básica del compuesto de la fórmula (I). En particular, una forma estereoisómera pura se refiere a un compuesto con un exceso de estereoisómero de al menos 80% (es decir, mínimo 90% de un isómero y máximo 10% de los otros isómeros posibles) hasta un exceso de estereoisómero de 100% (es decir, 100% de un isómero y nada del otro), más en particular, un compuesto que tiene un exceso de estereoisómero de 90% hasta 100%, incluso más en particular con un exceso de estereoisómero de 94% hasta 100% y lo más en particular con un exceso de estereoisómero de 97% hasta 100% o de 98% hasta 100%. Los términos "enantioméricamente puro" y "diastereoméricamente puro" se deberían entender de una manera similar, pero teniendo en cuenta entonces el exceso de enantiómero y el exceso de diastereómero, respectivamente, de la mezcla en cuestión.

La forma estereoisómera pura del compuesto presente se puede obtener por técnicas de separación o por procedimientos de síntesis estereoespecífica usando formas isómeras estereoquímicamente puras de los materiales de partida apropiados. Por ejemplo, se pueden separar enantiómeros entre sí por la cristalización selectiva de sus sales diastereómeras con ácidos o bases ópticamente activos. Ejemplos de los mismos son ácido tartárico, ácido dibenzoil-tartárico, ácido ditoluilitartárico y ácido camforsulfónico. Alternativamente, se pueden separar enantiómeros por técnicas cromatográficas usando capas estacionarias quirales o usando cromatografía de fluidos supercríticos.

Las sales de adición farmacéuticamente aceptables comprenden las formas de sal de adición de ácido o base, no

tóxicas, terapéuticamente activas, del compuesto de fórmula I. Tiene interés la forma libre, es decir, no de sal, del compuesto de fórmula I.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden obtener de manera conveniente tratando la forma básica con dicho ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrácidos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propiónico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir, ácido hidroxilbutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y similares. A la inversa, se pueden convertir dichas formas de sal por tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables, tales como formas de sal de metal o de amina, se pueden obtener de manera conveniente por tratamiento de la forma ácida con una base orgánica o inorgánica apropiada. Las formas de sal básica apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metal alcalino y de alcalino-térreo, por ejemplo, las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, por ejemplo, las sales de benzatina, N-metil-D-glucamina, hidrabamina y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término "solvatos" cubre cualquier solvato farmacéuticamente aceptable que pueda formar el compuesto de fórmula I, así como las sales del mismo. Dichos solvatos son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos, por ejemplo etanolatos, propanolatos y similares.

La presente invención también incluye un compuesto etiquetado de isótopo de la fórmula I en el que se reemplaza uno o más de los átomos por un isótopo que difiere de uno o unos encontrados típicamente en la naturaleza. Los ejemplos de tales isótopos incluyen isótopos de hidrógeno, tales como ^2H y ^3H ; carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C ; nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N ; oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O ; fósforo, tales como ^{31}P y ^{32}P . Un compuesto etiquetado de isótopo de la invención se puede preparar por procedimientos análogos a los descritos en la presente memoria usando los reactivos o materiales de partida etiquetados de isótopo apropiados o por técnicas conocidas en la técnica. La elección del isótopo incluido en un compuesto etiquetado de isótopo depende de la aplicación específica de ese compuesto. Por ejemplo, para ensayos de distribución de tejidos, se incorpora un isótopo radiactivo tal como ^3H o ^{14}C . Para aplicaciones de radioimágenes, será útil un isótopo emisor de positrones tal como ^{11}C , ^{18}F , ^{13}N u ^{15}O . La incorporación de deuterio puede proporcionar mayor estabilidad metabólica, dando como resultado, por ejemplo, una semivida in vivo aumentada del compuesto o requerimientos de dosificación reducidos.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula I como se especifica en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede contener de 1% a 50% o de 10% a 40% de un compuesto de la fórmula I y el resto de la composición es dicho portador. Una cantidad terapéuticamente eficaz en este contexto es una cantidad suficiente (i) para actuar de una manera profiláctica contra la infección por HCV o (ii) para inhibir la replicación de HCV o (iii) para estabilizar la infección por HCV o (iv) para reducir la infección por HCV o (v) erradicar la infección por HCV, en individuos infectados o individuos que están en riesgo de llegar a estar infectados. En otro aspecto más, esta invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar íntimamente un portador farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula I.

El compuesto de la fórmula I se puede formular en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Como composiciones apropiadas allí se pueden citar todas las composiciones empleadas normalmente para administrar sistémicamente fármacos. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, se combina una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, como el ingrediente activo en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, portador que puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en forma farmacéutica unitaria adecuada, particularmente, para administración por vía oral, por vía rectal, por vía percutánea o por inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma farmacéutica oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y disoluciones o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas farmacéuticas unitarias orales más ventajosas, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el portador comprenderá normalmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo para ayudar a la solubilidad. Se pueden preparar disoluciones inyectables, por ejemplo, en que el portador comprende disolución salina, disolución de glucosa o una mezcla de disolución salina y disolución de glucosa. También se pueden preparar suspensiones inyectables en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. También se incluyen preparaciones de formas sólidas destinadas a convertirse, poco antes de uso, en preparaciones en forma líquida. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente potenciador de la

ingrediente activo por forma farmacéutica unitaria.

- 5 Como se usa en la presente memoria el término "aproximadamente" tiene el significado conocido para el experto en la materia. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" se puede omitir y significa la cantidad exacta. En otras realizaciones, el término "aproximadamente" significa que los números a continuación del término "aproximadamente" están en el intervalo de $\pm 15\%$ o de $\pm 10\%$ o de $\pm 5\%$ o de $\pm 1\%$, de dicho valor numérico.

Métodos usados en los ejemplos

El análisis LC-MS se realizó usando uno de los siguientes métodos.

Condición de HPLC A

Sistema: Waters Alliance 2695

- 10 Columna: Waters XTerra 2,5 μm 4,6x50 mm; Temp. columna: 55°C; Caudal : 2 ml/min

Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM + HCOOH al 0,1% en H₂O

Fase móvil B: CH₃CN

Tiempo	%A	%B
0,00	85	15
3,00	5	95
4,20	5	95
4,30	85	15
5,40	85	15

Condición de HPLC B

Sistema: Waters Alliance 2695

- 15 Columna: Hypercarb 3 μm 4,6x50 mm; Temp. columna: 50°C; Caudal : 2 ml/min

Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM en H₂O/CH₃CN 1/9

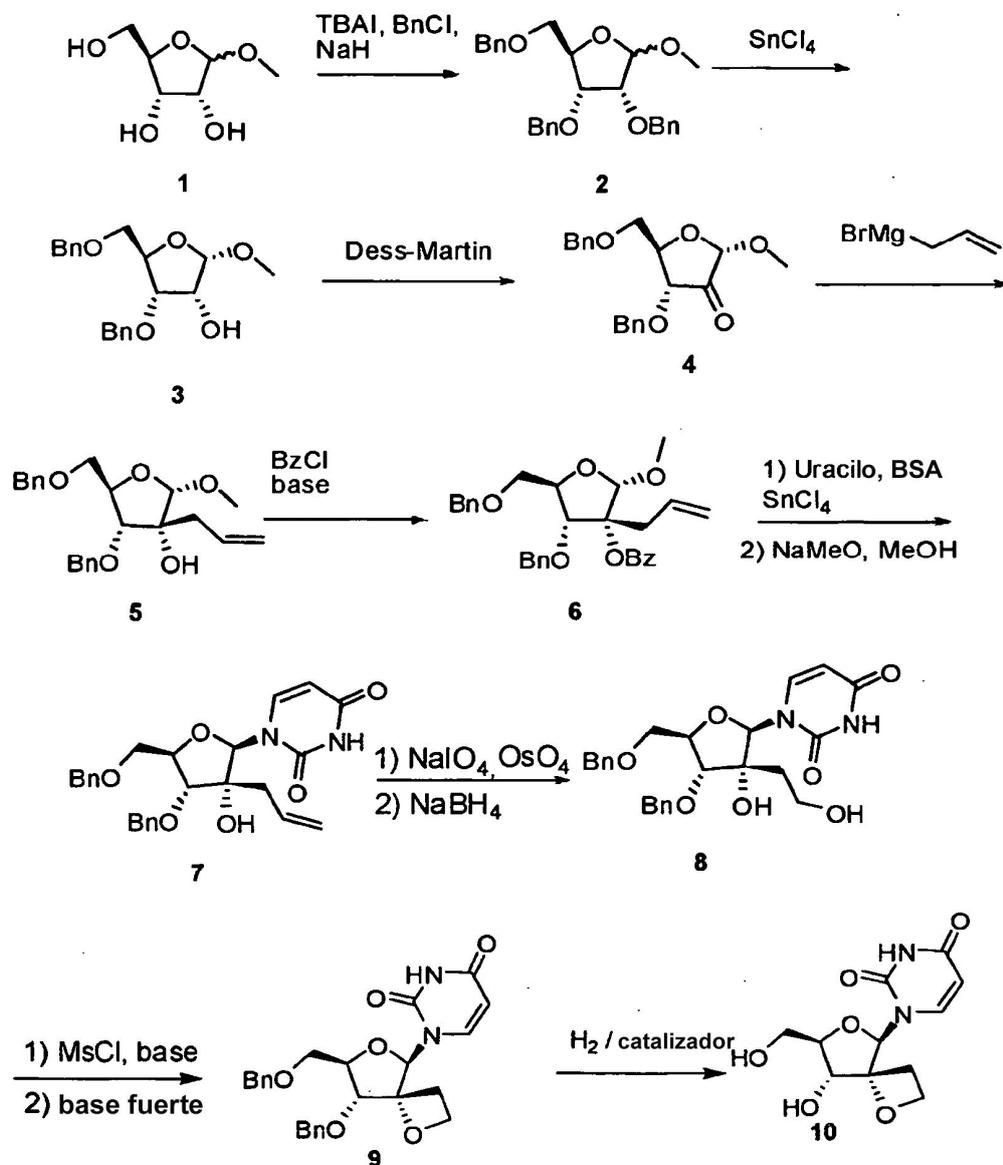
Fase móvil B: acetato de amonio 10 mM en H₂O/CH₃CN 9/1

Tiempo	%A	%B
0,00	0	100
3,00	100	0
4,20	100	0
4,30	0	100
5,40	0	100

- 20 Se registraron los espectros de RMN en un espectrómetro Bruker 400, operando a 400 MHz para ¹H. Los desplazamientos químicos se proporcionan en ppm y los valores J en Hz. La multiplicidad se indica usando las siguientes abreviaturas: d para doblete, t para triplete, m para un multiplete.

Ejemplos

- 25 El compuesto de la fórmula (I) se preparó según un esquema de síntesis 3 e implica la reacción de 1-[(4R,5R,7R,8R)-8-hidroxi-7-(hidroximetil)-1,6-dioxaspiro[3.4]oct-5-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (compuesto intermedio **10**), preparado según el esquema de síntesis 1 y (2S)- 2-(cloro(fenoxi)fosforilamino)-propanoato de butilo (compuesto intermedio **12**), preparado según el esquema de síntesis 2.

Esquema 1: Síntesis de compuesto intermedio 10

Ejemplo 1: Síntesis de compuesto intermedio (2S,3R,4R,5R)-3-allyl-4-(benciloxi)-5-(bencil-oximetil)-2-metoxitetrahidrofuran-3-ol (**5**).

5 En atmósfera de argón, se añadió a una disolución de **4** (que se puede preparar según los procedimientos descritos en *Org. Lett.*, 2.007, 9, 3.009-3.012) en tetrahidrofurano seco (THF; 400 ml) a -78°C, bromuro de alilmagnesio (400 ml, 400 mmol; 1,0 M en dietil éter). Después de agitar la mezcla de reacción a -78°C durante 4 horas, se dejó con agitación la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se enfrió rápidamente cuidadosamente la reacción con cloruro de amonio acuoso, saturado. Se extrajo la mezcla con diclorometano y se lavó la capa orgánica con salmuera. Se retiró el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía de gel de sílice (600 g de sílice), por elución en gradiente con acetato de etilo al 15% a 20% en hexano para proporcionar el producto de reacción **5** como un aceite incoloro (32,9 g, 70%).

10 Condición de HPLC A, tr: 2,97 min, $m/z = 402$ (M+NH₄)⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,38-7,20 (m, 10H), 5,84-5,97 (m, 1H), 5,12 (d, 1H, J = 10,2 Hz), 5,01 (d, 1H, J = 17,2 Hz), 4,74 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 4,56 (s, 1H), 4,53-4,40 (m, 3H), 4,05-4,11 (m, 1H), 3,32-3,53 (m, 4H), 3,44 (s, 3H), 2,37 (dd, 1H, J = 14,3; 6,7 Hz), 2,25 (dd, 1H, J = 14,3; 7,6 Hz).

Ejemplo 2: Síntesis de compuesto intermedio benzoato de (2S,3R,4R,5R)-3-allyl-4-(benciloxi)-5-(bencil-oximetil)-2-

metoxitetrahydrofuran-3-ilo (**6**).

A una disolución de **5** (26,6 g, 69,2 mmoles) en diclorometano seco (500 ml) a temperatura ambiente, se añadió N,N-dimetilpiridin-4-amina (DMAP; 2,113 g, 17,30 mmoles), trietilamina (217 ml, 1.557 mmoles) y cloruro de benzoilo (18,05 ml, 156 mmoles). Después de 1 hora, se añadió cloruro de benzoilo adicional (6 ml) y DMAP (2,1 g). La mezcla se agitó durante 5 días.

Después se agitó la mezcla de reacción con HCl 1 N y se extrajo con diclorometano. Se combinaron las capas orgánicas y se lavaron con NaHCO₃ acuoso, saturado, seguido por salmuera. Después de secado con MgSO₄, filtración y evaporación de los componentes volátiles, se purificó el residuo por cromatografía de columna (400 g de sílice) eluyendo con heptano a acetato de etilo al 15% en heptano para proporcionar producto de reacción como un aceite (como una mezcla con compuesto **5**). Se purificó la mezcla de nuevo con CH₂Cl₂ como eluyente (400 g de sílice). Se recogieron las fracciones puras y se obtuvo compuesto intermedio **6** como un aceite incoloro (13,05 g; 39 %). Condición de HPLC A; tr: 3,41 min; *m/z* = 457 (M-OMe)⁺. RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ ppm 8,1 (d; 2H; J = 7,9 Hz); 7,68-7,28 (m; 13H); 5,84-5,77 (m; 1H); 5,12 (d; 1H; J = 16 Hz); 4,95 (d; 1H; J = 16 Hz); 4,92 (d; 1H; J = 12,3 Hz); 4,56 (d; 1H; J = 12,3 Hz); 4,48 (d; 1H; J = 11,6 Hz); 4,40 (d; 1H; J = 11,6 Hz); 4,2 (m; 1H); 3,85 (d; 1H; J = 6,2 Hz); 3,53 (d; 1H; J = 10,8 Hz); 3,7 (s; 3H); 3,45 (dd; 1H; J = 10,8; 6,2 Hz); 3,25 (dd; 1H; J = 15,5; 7,3 Hz); 2,45 (dd; 1H; J = 15,5; 7,3 Hz).

Ejemplo 3: Síntesis de compuesto intermedio 1-[(2R,3R,4R,5R)-3-alil-4-(benciloxi)-5-(benciloximetil)-3-hidroxitetrahydrofuran-2-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (**7**).

Se añadió bis(trimetilsilil)acetamida (BSA; 29,2 ml, 118 mmoles) a una mezcla de **6** (14,0 g, 23,1 mmoles) y uracilo (5,99 g, 53,4 mmoles) en acetonitrilo anhidro (300 ml). Se calentó la mezcla de reacción para hacerla hervir a reflujo durante 1 hora y se dejó que la solución clara se enfriara a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota cloruro de estaño (11,55 ml, 99 mmoles) a temperatura ambiente y se agitó además la mezcla durante 1 hora. Después se agitó la mezcla a reflujo durante 1,5 horas y se enfrió de nuevo a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo (250 ml), seguido por NaHCO₃ acuoso, saturado (250 ml) y se agitó la mezcla durante 15 minutos. Después de filtración por Celite, se separó la capa orgánica y se lavó con NaHCO₃ acuoso, saturado (250 ml). Se extrajo la capa acuosa combinada con acetato de etilo (250 ml) y se secó la capa orgánica combinada (MgSO₄), se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida. Se disolvió el aceite amarillo resultante en metanol y se añadió metanolato de sodio al 25% (25 ml). Se continuó con agitación durante la noche. Se añadió más metanolato de sodio al 25% (15 ml) y se continuó la agitación durante la noche. Se añadió ácido acético (30 ml) y se retiró el disolvente. Se purificó el residuo por cromatografía de columna con heptano/acetato de etilo 50:50 a acetato de etilo al 100%. Se obtuvo compuesto intermedio **7** (9,38 g, 76%) como un aceite incoloro. Condición de HPLC A; tr: 2,49 min, *m/z* = 465 (M+H)⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,39 (1H, NH), 7,75 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 7,22-7,43 (m, 10H), 6,05 (s, 1H), 5,71-5,84 (m, 1H), 5,35 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,00-5,11 (m, 2H), 4,70 (d, 1H, J= 11,5 Hz), 4,53 (d, 1H, J= 11,5 Hz), 4,47 (d, 1H, J= 11,1 Hz), 4,47 (d, 1H, J= 11,1 Hz), 4,11-4,16 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 3,81-3,87 (m, 1H), 3,45-3,52 (m, 1H), 3,17 (s a, OH), 2,15-2,33 (m, 2H).

Ejemplo 4: Síntesis de compuesto intermedio 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(benciloxi)-5-(bencil-oximetil)-3-hidroxi-3-(2-hidroxietil)tetrahydrofuran-2-il]pirimidin-2,4(1H,3H)diona (**8**).

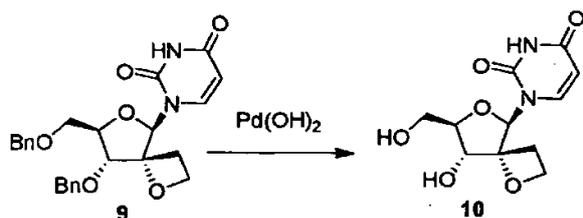
A una disolución agitada de **7** (7,8 g, 16,79 mmoles) en una mezcla de THF (10 ml) y H₂O (10 ml) se añadió peryodato de sodio (11,17 g, 52,2 mmoles) seguido por tetraóxido de osmio (VIII) (2 ml, 2,5% p/v en terc-Butanol, 0,168 mmoles) y se continuó agitando durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua (100 ml) y se realizó extracción con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la capa orgánica con NaHCO₃ acuoso, saturado (2x30 ml). Se extrajo la capa acuosa combinada con acetato de etilo y se secó la capa orgánica combinada sobre (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida. Se disolvió el residuo oleoso obtenido en una mezcla de THF (100 ml) y H₂O (20 ml) y se añadió borohidruro de sodio (1,361 g, 36,0 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente, después de lo cual se añadió agua (100 ml) y se realizó extracción con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la capa orgánica combinada con NaHCO₃ acuoso, saturado, se extrajo la capa acuosa combinada con acetato de etilo y se secó la capa orgánica combinada sobre (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida. Se purificó el residuo oleoso obtenido por cromatografía de columna (metanol al 0-10% (v/v) en CH₂Cl₂ después isocrático al 10%) proporcionando el producto de reacción **8** como una espuma blanca (4,8 g, 57 %). Condición de HPLC A; tr: 2,12 min, *m/z* = 469 (M+H)⁺, RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 9,85 (1H, NH), 7,85 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 7,22-7,43 (m, 10H), 6,05 (s, 1H), 5,35 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 4,75 (d, 1H, J= 11,5 Hz), 4,53 (d, 1H, J= 11,5 Hz), 4,45 (d, 1H, J= 11,3 Hz), 4,35 (d, 1H, J= 11,3 Hz), 4,27 (d, 1H, J= 6,6 Hz), 4,2 (s, 1H), 4,1, (d, 1H, J= 6,6 Hz), 3,95 (d, 1H, J= 10,8 Hz), 3,75-3,7 (m, 1H), 3,62 (d, 1H, J= 10,8 Hz), 3,17 (s a, OH), 1,8-1,7 (m, 2H).

Ejemplo 5: Síntesis de compuesto intermedio 1-[(4R,5R,7R,8R)-8-(benciloxi)-7-(benciloxi-metil)-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-5-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (**9**).

Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,800 ml, 10,34 mmoles) a **8** (4,32 g, 9,22 mmoles) en piridina seca (100 ml). Después de 1 hora y 15 minutos, se añadieron 0,1 equivalentes más de cloruro de metanosulfonilo y se agitó además la mezcla a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después, se añadió una cantidad pequeña de metanol y se evaporó la mezcla a sequedad. Se disolvió el residuo en acetato de etilo (100 ml) y se lavó con

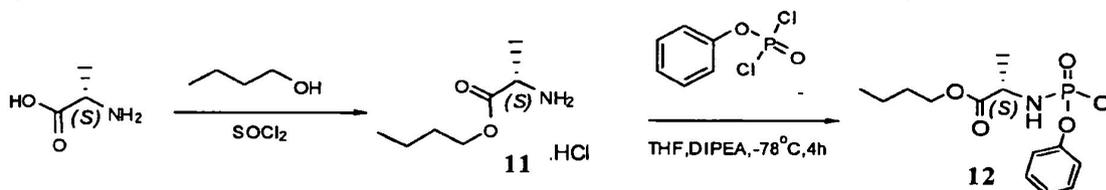
NaHCO₃ saturado (2x50 ml). Se extrajo la capa acuosa combinada con acetato de etilo. Después se secó la capa orgánica combinada sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo obtenido en THF seco y se añadió NaH al 95% (932 mg, 36,9 mmoles) inmediatamente a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se vertió la mezcla de reacción sobre una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (30 ml) seguido por adición de CH₂Cl₂ (250 ml). Se lavó la capa orgánica separada con NaHCO₃ acuoso, saturado (2 x 100 ml) y se extrajo la capa acuosa combinada con CH₂Cl₂ (250 ml). Se secó la capa orgánica combinada (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida. Se purificó el residuo obtenido por cromatografía de columna eluyendo primero con heptano, después con acetato de etilo para proporcionar **9** (3,27 g, 79%) como una espuma. Condición de HPLC A, tr: 2,33 min, *m/z* = 451 (M+H)⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2,20 - 2,38 (m, 1 H), 2,38 - 2,52 (m, 1 H), 3,62 - 3,73 (m, 1 H), 3,89 - 4,13 (m, 3 H), 4,38 - 4,56 (m, 3 H), 4,56 - 4,68 (m, 1 H), 4,70 - 4,88 (m, 2 H), 5,25 (d, J=8,00 Hz, 1 H), 6,25 (s, 1 H), 7,18 - 7,47 (m, 10 H), 7,87 (d, J=8,20 Hz, 1 H), 8,90 (s a, 1 H).

Ejemplo 6: Síntesis de compuesto intermedio 1-[(4R,5R,7R,8R)-8-hidroxi-7-(hidroxil-metil)-1,6-dioxaspiro[3.4]octan-5-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (**10**).



Una mezcla de **9** (50 mg, 0,111 mmoles) en metanol (1 ml) y Pd(OH)₂ (8 mg) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Después de 4 horas, se añadió más Pd(OH)₂ (30 mg) y metanol (1 ml). Se agitó vigorosamente la mezcla bajo atmósfera de H₂ durante la noche. Se retiró el catalizador por filtración sobre decalita y se retiró el disolvente por evaporación. Se purificó el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice eluido con metanol al 10% en acetato de etilo para proporcionar el compuesto intermedio **10** como polvo blanco (16,8 mg; 56%). Condición de HPLC B, tr: 1,98 min, *m/z* = 271 (M+H)⁺. RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ ppm 7,65 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 6,11 (s, 1H), 5,82 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 4,46-4,61 (m, 2H), 4,06-4,13 (m, 1H), 3,87-3,95 (m, 1H), 3,69-3,77 (m, 2H), 2,62-2,73 (m, 1H), 2,48-2,58 (m, 1H).

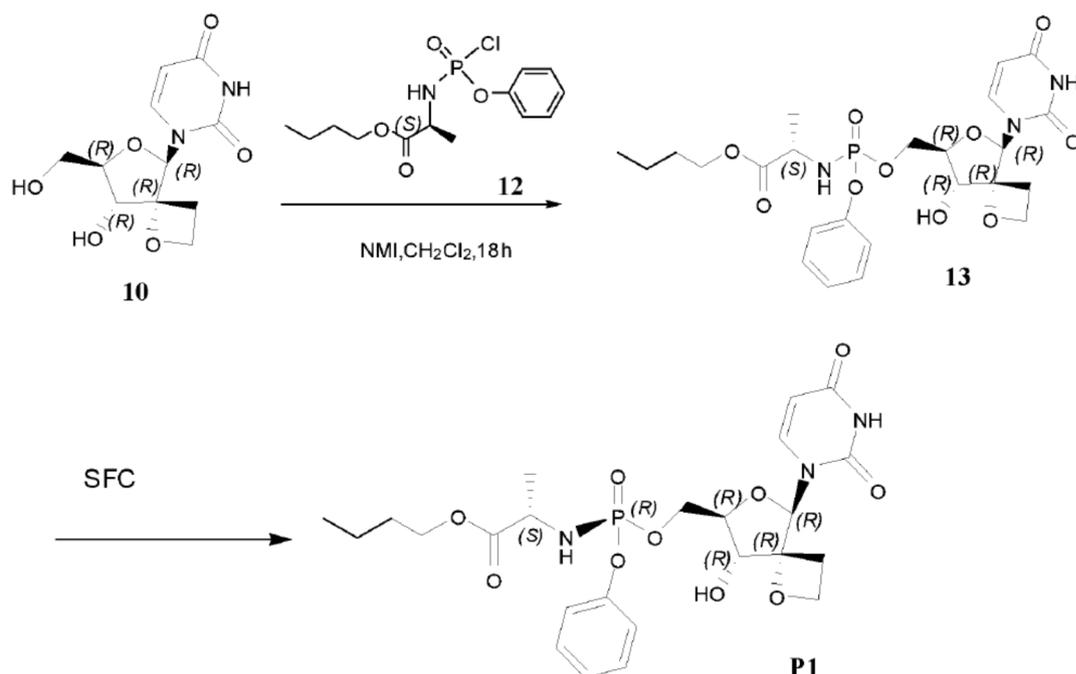
Esquema 2: Síntesis de compuesto intermedio **12**



Ejemplo 7: Síntesis de compuesto intermedio (2S)- 2-(cloro(fenoxi)fosforilamino)propanoato de butilo (**12**).

Se enfrió 1-butanol (1.200 ml) a -20°C y 50 ml de SOCl₂ añadido con agitación seguido por 50 g (33,67 mmoles) de ácido (S)-2-aminopropanoico. Se calentó la disolución 24 h para hacerla hervir a reflujo, se eliminó la mayor parte del disolvente y se disolvió el residuo en 800 ml de dietil éter. Se dejó la mezcla durante 1 h a 0°C para proporcionar hidrocloreuro de (S)-2-aminopropanoato de butilo (compuesto intermedio **11**, 47 g). Se suspendió fosforodichloridato de fenilo (48,9 g, 232 mmoles) e hidrocloreuro de (S)-2-aminopropanoato de butilo (42 g, 232 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (200 ml). Se añadió gota a gota N,N-diisopropiletilamina (59,9 g, 464 mmoles) a -78°C y después de 4 h se concentró la reacción. Se añadió dietil éter (Et₂O, 500 ml) y se separó por filtración el precipitado resultante y se lavó con Et₂O seco (dos veces 100 ml). Se evaporó a sequedad el líquido filtrado. Se almacenó (2S)- 2-(cloro(fenoxi)fosforilamino)propanoato de butilo (**12**) como disolución 0,5 M en THF a -18°C hasta reacción adicional.

Esquema 3: síntesis de compuesto P1

Ejemplo 8: síntesis de compuesto intermedio **13**.

- 5 A una disolución de **10** (12 g, 44,4 mmoles) en 480 ml de CH₂Cl₂ seco se añadió 1-metil-imidazol (43,74 g, 532 mmoles) a 25°C. Se añadió gota a gota una disolución de **12** (120 ml, 0,5 M en THF) y se agitó la mezcla a 25°C durante 18 h. Se añadieron gota a gota otros 120 ml de **12** (0,5 M en THF). Se agitó la mezcla resultante durante 5 h. Se enfrió rápidamente la mezcla de reacción con 20 ml de agua. Se concentró la mezcla resultante.

Ejemplo 9: Preparación de N-[(**R**)-{[(4R,5R,7R,8R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidro-pirimidin-1(2H)-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[3.4]oct-7-il]metoxi}(fenoxi)-fosforil]-L-alaninato de butilo (compuesto **P1**).

- 10 Se purificó el residuo resultante del ejemplo 8 por cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/metanol=30/1) proporcionando 3 fracciones: 1) 4 g, 96% puro (pureza basada en LC-MS), 2) 7 g, 80 % puro y 3) 3,5 g con una pureza menor que 80%. Se combinaron las fracciones impuras (con pureza < 95 %) y se purificó de nuevo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (de CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂/metanol =50/1) para obtener una fracción adicional de 3,1 g con una pureza de al menos 95%. En total se obtuvieron 7,1 g con una pureza de al menos 95%. Se purificaron 1,3 g de los mismos por cromatografía de fluidos supercríticos (SFC, por sus siglas en inglés) en un sistema II Supercritical Fluid Cromatografía Multigram™ de Berger instruments (Newark, DE, USA), usando una columna Chiralpak Diacel OJ de 20 x 250 mm.

- 20 Se realiza purificación a temperatura ambiente usando una presión de la boquilla de 10 MPa (100 bar) y un caudal de 50 ml/min. La fase móvil usada fue CO₂, etanol con isopropilamina al 0,2%. Se obtuvieron 464 mg de **P1** 100 % puro como un sólido blanco.

El tiempo de retención para el compuesto **P1** fue como sigue: **R_t (SFC): 7,7 min.**

- 25 El análisis LC-MS en este ejemplo se realizó usando las siguientes condiciones: Columna: SunFire C18 3,5 μ 4,6x100 mm, fase móvil A: NH₄OOCH 10 mM + HCOOH al 0,1% en H₂O, fase móvil B: metanol operando a una temperatura de columna de 50°C usando un caudal de 1,5 ml/min. Condiciones de gradiente: t = 0 min: 65% A, 35% B; t = 7 min, 5% de A, 95% de B; t = 9,6 min, 5% de A, 95% de B; t = 9,8 min: 65% de A, 35% de B; t = 12 min, 65% de A, 35% de B. Para **P1** se encontraron los siguientes datos: **R_t (LC-MS): 4,60 min, m/z = 554 (M+H)⁺**

- 30 RMN para **P1**: RMN de ¹H (400 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 0,92 (t, J=7,4 Hz, 3 H) 1,23 - 1,47 (m, 5 H) 1,49 - 1,67 (m, 2 H) 2,52 (ddd, J=11,9, 8,7, 6,8 Hz, 1 H) 2,60 - 2,78 (m, 1 H) 3,86 (dddd, J=9,5, 3,7, 2,0, 1,9 Hz, 1 H) 3,88 - 3,99 (m, 1 H) 4,03 (d, J=9,5 Hz, 1 H) 4,05 - 4,18 (m, 2 H) 4,34 (ddd, J=11,7, 5,6, 3,5 Hz, 1 H) 4,43 - 4,61 (m, 3 H) 5,66 (d, J=8,0 Hz, 1 H) 6,13 (s, 1 H) 7,12 - 7,29 (m, 3 H) 7,31 - 7,41 (m, 2 H) 7,56 (d, J=8,0 Hz, 1 H).

Se midió la rotación óptica para **P1** usando un polarímetro Perkin Elmer 341. [α]_D²⁰ indica la rotación óptica medida con luz a la longitud de onda de la línea D del sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C. El camino óptico de la

celda es 1 dm. A continuación del valor real, se menciona la concentración y el disolvente de la disolución que se usó para medir la rotación óptica. $[\alpha]_D^{20} = +7,48^\circ$ (589 nm, c 0,3742% p/v, etanol, 20°C).

Ejemplo biológico: Ensayo de replicón.

5 Se examinó en el compuesto **P1** la actividad en la inhibición de replicación de ARN de HCV en un ensayo celular. Se usó el ensayo para demostrar que el compuesto **P1** inhibía una estirpe celular de replicación celular funcional de HCV, también conocidos como replicones de HCV. El ensayo celular se basó en una construcción de expresión bicistrónica, como se describe por Lohmann et al. (1.999) Science vol. 285 págs. 110-113 con modificaciones descritas por Krieger et al. (2.001) Journal of Virology 75: 4.614-4.624, en una estrategia de cribado multidiana.

10 En esencia, el método fue como sigue. El ensayo utilizó la estirpe celular transinfectada de manera estable Huh-7 luc/neo (a partir de ahora referida como Huh-Luc). Esta estirpe celular alberga un ARN que codifica una construcción de expresión bicistrónica que comprende las regiones NS3-NS5B de tipo natural de HCV tipo 1 traducido de un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES, por sus siglas en inglés), de virus de encefalomiocarditis (EMCV, por sus siglas en inglés), precedido por una porción informadora (FfL-luciferasa) y una porción marcadora seleccionable (neo^R, neomicina fosfotransferasa). La construcción está limitada por las NTR (regiones no traducidas) 5' y 3' de genotipo 1b de HCV. El cultivo continuado de las células de replicones en presencia de G418 (neo^R) depende de la replicación del ARN de HCV. Las células de los replicones transinfectadas de manera estable que expresan ARN de HCV, que se replica de manera autónoma y a altos niveles, codificando entre otros luciferasa, se usaron para cribar los compuestos antivíricos.

20 Se pusieron en placas las células de replicones en placas de 384 pozos en presencia de los compuestos de ensayo y de control que se añadieron en diversas concentraciones. Después de una incubación de tres días, se midió la replicación de HCV ensayando la actividad de luciferasa (usando sustratos de ensayo de luciferasa estándar y reactivos y un generador de imágenes de microplacas ultraHTS de Perkin Elmer ViewLux™). Las células de replicones en los cultivos de control presentan alta expresión de luciferasa en ausencia de cualquier inhibidor. La actividad inhibidora del compuesto sobre la actividad de la luciferasa se controló sobre las células Huh-Luc, permitiendo una curva dosis - respuesta para el compuesto de ensayo. El valor de EC₅₀ se calculó después, valor que representa la cantidad del compuesto requerida para disminuir el nivel de actividad de luciferasa detectada por 50% o más específicamente, la capacidad del ARN del replicón de HCV unido genéticamente para replicarse.

25 El resultado se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	EC ₅₀ (µM) (HCV)	CC ₅₀ (µM) (Huh-7)
P1	4,47	>98

30 Ejemplo farmacéutico: Comprimido recubierto de película.

"Ingrediente activo" como se usa en todo este ejemplo se refiere a un compuesto de la fórmula (I), incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo.

Preparación del centro del comprimido.

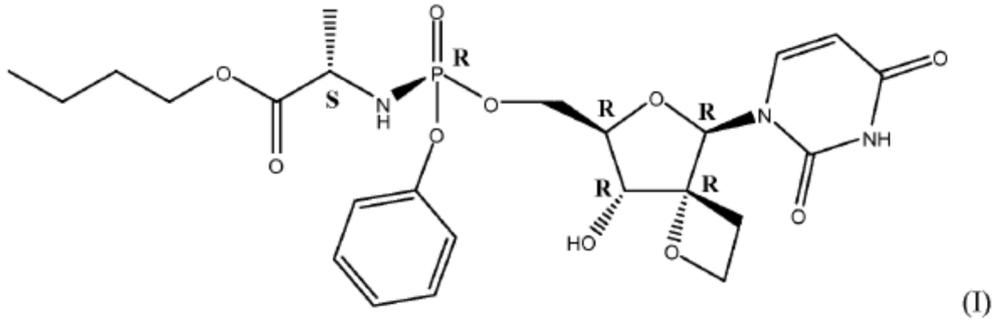
35 Se mezcla bien una mezcla de 100 g de ingrediente activo, 570 g de lactosa y 200 g de almidón y se humidifica después con una disolución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinilpirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. Se tamiza la mezcla de polvo húmedo, se seca y se tamiza de nuevo. Después hay añadidos 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. Se mezcla bien el total y se comprime en comprimidos, proporcionando 10.000 comprimidos, comprendiendo cada uno 10 mg de ingrediente activo.

Recubrimiento

40 A una disolución de 10 g de metilcelulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se añade una disolución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. Después se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol, se muelen 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. Se añade la disolución última a la primera y después se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión de color concentrada y se homogeniza el total. Se recubren los centros de los comprimidos con la mezcla así
45 obtenida en un aparato de recubrimiento.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I:



2. Una forma de sal de un compuesto según la reivindicación 1.
- 5 3. Una forma de sal según la reivindicación 2, en la que la sal es una sal farmacéuticamente aceptable.
4. Una forma solvatada de un compuesto según la reivindicación 1, 2 ó 3.
5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad antivíricamente eficaz de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como una medicina.
- 10 7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento o la profilaxis de infección por HCV.