

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 016**

51 Int. Cl.:

C07H 19/20 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2009 PCT/US2009/069469**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10075549**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09795670 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2376088**

54 Título: **Fosforamidatos de nucleósido de 2-amino purina 6-O-sustituida**

30 Prioridad:

23.12.2008 US 140423 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SOFIA, MICHAEL, JOSEPH;
DU, JINFA;
WANG, PEIYUAN y
NAGARATHNAM, DHANAPALAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 623 016 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 nucleósido de 2-amino purina 6-O-sustituida

5 **Campo de la invención**

La presente invención concierne a fosforamidatos de nucleósido y su uso como agentes para tratar enfermedades víricas. Estos compuestos son inhibidores de la replicación vírica de ARN dependiente de ARN y son útiles como inhibidores de la polimerasa NS5B de VHC, como inhibidores de la replicación de VHC y para el tratamiento de la infección de la hepatitis C en mamíferos.

Antecedentes

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema sanitario muy importante que conduce a enfermedad crónica del hígado, tal como cirrosis y carcinoma hepatocelular, en un número considerable de individuos infectados, estimados en 2 a 15 % de la población mundial. Se estima que hay 4,5 millones de personas infectadas solo en los Estados Unidos, según el *U.S. Center for Disease Control*. Según la Organización Mundial de la Salud, hay más de 200 millones de individuos infectados por todo el mundo, con al menos 3 a 4 millones de personas que están siendo infectadas cada año. Una vez infectadas, aproximadamente el 20 % de las personas eliminan el virus, pero el resto pueden portar el VHC el resto de sus vidas. Diez al veinte por ciento de los individuos crónicamente infectados desarrollan finalmente cirrosis que destruye el hígado o cáncer. La enfermedad vírica se transmite de manera parenteral mediante sangre y productos sanguíneos contaminados, agujas contaminadas, o sexualmente y verticalmente a partir de madres infectadas o madres portadoras a su descendencia. Los tratamientos actuales para la infección por VHC, los cuales se restringen a inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina, son de beneficio clínico limitado. Además, no hay vacuna establecida para el VHC. Por consiguiente, hay una necesidad urgente de agentes terapéuticos mejorados que combatan eficazmente la infección crónica por VHC.

El virión de VHC es un virus de ARN de cadena positiva encapsulado con una secuencia genómica de oligorribonucleótido sencilla de aproximadamente 9.600 bases que codifica una poliproteína de aproximadamente 3.010 aminoácidos. Los productos proteicos del gen de VHC consiste en las proteínas estructurales C, E1 y E2, y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A y NS4B y NS5A y NS5B. Se cree que las proteínas no estructurales (NS) proporcionan la maquinaria catalítica para la replicación vírica. La proteasa NS3 libera NS5B, la ARN polimerasa dependiente de ARN a partir de la cadena de poliproteína. Se requiere polimerasa NS5B de VHC para la síntesis de un ARN de doble cadena a partir de un ARN vírico de cadena sencilla que sirve como un molde en el ciclo de replicación de VHC. Por lo tanto, se considera que la polimerasa NS5B es un componente esencial en el complejo de replicación de VHC (K. Ishi, y col., *Heptology*, 1999, 29:1.227-1.235; V. Lohmann, y col., *Virology*, 1998, 249:108-118). La inhibición de la polimerasa NS5B de VHC previene la formación del ARN de VHC de doble cadena y, por lo tanto, constituye un planteamiento atractivo al desarrollo de terapias antivíricas específicas a VHC.

VHC pertenece a una familia mucho mayor de virus que comparten muchas características comunes.

Virus de Flaviviridae

La familia *Flaviviridae* de virus comprende al menos tres géneros distintos: los pestivirus, que causan enfermedad en ganado bovino y cerdos; los flavivirus, que son la causa principal de enfermedades tales como la fiebre del dengue y la fiebre amarilla; y los hepacivirus, cuyo único miembro es VHC. El género *Flavivirus* incluye más de 68 miembros separados en grupos basándose en la relación serológica (Calisher y col., *J. Gen. Virol*, 1993, 70, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica ("Fields Virology", Editores: Fields, B.N., Knipe, D.M., y Howley, P.M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Capítulo 31, 931-959). Los flavivirus de global preocupación que están asociados con enfermedad humana incluyen el virus de la Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD), virus de la fiebre amarilla, síndrome de choque y virus de la encefalitis japonesa (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).

El género *Pestivirus* incluye el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), virus de la peste porcina clásica (VPPC, también denominado virus del cólera porcino) y virus de la enfermedad de la frontera (VEF) de oveja (Moennig, V. y col. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Infecciones por *Pestivirus* de ganado domesticado (ganado bovino, cerdos y oveja) causan pérdidas económicas significativas por todo el mundo. VDVB causa enfermedad mucosa en ganado bovino y es de significativa importancia económica para la industria ganadera (Meyers, G. y Thiel, H.J., *Advances in Virus Research*, 1996, 47, 53-118; Moennig V., y col. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Los pestivirus humanos no se han caracterizado exhaustivamente como los pestivirus animales. Sin embargo, los estudios serológicos indican considerable exposición a pestivirus en seres humanos.

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 tipo A, agentes similares al virus GB

tipo A, virus GB tipo B y virus GB tipo C (también denominado virus de la hepatitis G, VHG). El grupo de *hepacivirus* (virus de la hepatitis C, VHC) consiste en un número de virus estrechamente relacionados pero genotípicamente distinguibles que infectan seres humanos. Hay al menos 6 genotipos de VHC y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre los pestivirus y hepacivirus, combinados con la mala capacidad de los hepacivirus de crecer eficazmente en cultivo celular, con frecuencia se usa el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) como sustituto para estudiar el virus VHC.

La organización genética de los pestivirus y hepacivirus es muy similar. Estos virus de ARN de cadena positiva poseen un marco de lectura abierto grande sencillo (ORF) que codifica todas las proteínas víricas necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que se procesa conjuntamente y después de la traducción mediante tanto proteinasas celulares como codificadas por virus para producir las proteínas víricas maduras. Las proteínas víricas responsables de la replicación del ARN del genoma vírico se localizan dentro de aproximadamente el terminal carboxi. Dos tercios del ORF se llaman proteínas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de poliproteína de la porción de proteína no estructural del ORF para pestivirus y hepacivirus es muy similar. Para tanto los pestivirus como los hepacivirus, las proteínas no estructurales (NS) maduras, en orden secuencial a partir del terminal amino de la región codificadora de proteína no estructural al terminal carboxi del ORF, consiste en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B.

Las proteínas NS de los pestivirus y hepacivirus comparten dominios de secuencia que son característicos de funciones proteicas específicas. Por ejemplo, las proteínas NS3 de los virus en ambos grupos poseen motivos de secuencia de aminoácidos característicos de serina proteinasas y de helicasas (Gorbalenya y col., *Nature*, 1988, 333, 22; Bazan y Fletterick, *Virology*, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya y col., *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3.889-3.897). Igualmente, las proteínas NS5B de los pestivirus y hepacivirus tienen los motivos característicos de ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, E.V. y Dolja, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Los papeles y las funciones actuales de las proteínas NS de los pestivirus y hepacivirus en el ciclo vital de los virus son directamente análogos. En ambos casos, la serina proteinasa NS3 es responsable de todo el procesamiento proteolítico de los precursores de poliproteína en dirección 3' de su posición en el ORF (Wiskerchen y Collett, *Virology*, 1991, 184, 341-350; Bartenschlager y col., *J. Virol.* 1993, 67, 3.835-3.844; Eckart y col. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993, 192, 399-406; Grakoui y col., *J. Virol.* 1993, 67, 2.832-2.843; Grakoui y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 10.583-10.587; Hijikata y col., *J. Virol.* 1993, 67, 4.665-4.675; Tome y col., *J. Virol.*, 1993, 67, 4.017-4.026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager y col., *J. Virol.* 1994, 68, 5.045-5.055; Failla y col., *J. Virol.* 1994, 68, 3.753-3.760; Xu y col., *J. Virol.*, 1997, 71:53 12-5.322). La proteína NS3 de ambos virus también funciona como una helicasa (Kim y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, 215, 160-166; Jin y Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 323, 47-53; Warrener y Collett, *J. Virol.* 1995, 69, 1.720-1.726). Finalmente, las proteínas NS5B de los pestivirus y hepacivirus tienen la actividad de ARN polimerasas dirigidas por ARN previstas (Behrens y col., *EMBO*, 1996, 15, 12-22; Lechmann y col., *J. Virol.*, 1997, 71, 8.416-8.428; Yuan y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997, 232, 231-235; Hagedorn, documento PCT WO 97/12033; Zhong y col., *J. Virol.*, 1998, 72, 9.365-9.369).

Actualmente, hay opciones de tratamiento limitado para individuos infectados con el virus de la hepatitis C. La opción terapéutica aprobada actual es el uso de inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina. Esta terapia está limitada en su eficacia clínica y solamente el 50 % de los pacientes tratados responden a la terapia. Por lo tanto, hay una necesidad significativa de terapias más eficaces y novedosas para abordar la necesidad médica insatisfecha planteada por la infección por VHC.

Ya se han identificado un número de dianas moleculares potenciales para el desarrollo de fármaco de antivirales de acción directa como terapéuticos anti-VHC que incluyen, pero no se limitan a, la autoproteasa NS2-NS3, la proteasa NS3, la helicasa NS3 y la polimerasa NS5B. La ARN polimerasa dependiente de ARN es absolutamente esencial para la replicación del genoma de ARN de sentido positivo y de cadena sencilla y esta enzima ha suscitado significativo interés entre los químicos farmacéuticos.

Se han revisado los inhibidores de NS5B de VHC como terapias potenciales para la infección por VHC: Tan, S.L., y col., *Nature Rev. Drug Discov.*, 2002, 1, 867-881; Walker, M.P. y col., *Exp. Opin. Investigational Drugs*, 2003, 12, 1.269-1.280; Ni, Z.-J., y col., *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2004, 7, 446-459; Beaulieu, P.L., y col., *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2004, 5, 838-850; Wu, J., y col., *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2003, 3, 207-219; Griffith, R.C., y col., *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 2004, 39, 223-237; Carrol, S., y col., *Infectious Disorders Drug Targets*, 2006, 6, 17-29. El potencial para la aparición de cepas resistentes de VHC y la necesidad de identificar agentes con amplia cobertura de genotipo soporta la necesidad de esfuerzos continuos para identificar nucleósidos novedosos y más eficaces como inhibidores de NS5B de VHC.

Los inhibidores nucleósidos de la polimerasa NS5B pueden actuar o bien como sustrato no natural que da como resultado la finalización de la cadena o como inhibidor competitivo que compite con el nucleótido que se une a la polimerasa. Para funcionar como un terminator de cadena el análogo de nucleósido debe ser absorbido por la célula y convertido *in vivo* en un trifosfato para competir por el sitio de unión de nucleótido a polimerasa. Esta conversión en trifosfato está comúnmente mediada por quinasas celulares que imparten requerimientos estructurales

adicionales sobre un inhibidor nucleósido de polimerasa potencial. Desafortunadamente, esto limita la evaluación directa de los nucleósidos como inhibidores de la replicación de VHC a ensayos basados en célula capaces de fosforilación *in situ*.

- 5 En algunos casos, la actividad biológica de un nucleósido está entorpecida por sus malas características de sustrato para una o más de las quinasas necesarias para convertirlo en la forma de trifosfato activo. La formación del monofosfato mediante una nucleósido quinasa generalmente se ve como la etapa limitante de la tasa de los tres sucesos de fosforilación. Para eludir la necesidad de la etapa de fosforilación inicial en el metabolismo de un nucleósido al análogo de trifosfato activo, se ha informado de la preparación de profármacos de fosfato estables. Se ha demostrado que los profármacos de fosforamidato de nucleósido son precursores del trifosfato de nucleósido activo e inhiben la replicación vírica cuando se administran a células completamente infectadas por virus (McGuigan, C., y col., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1.748-1.753; Valette, G., y col., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1.981-1.990; Balzarini, J., y col., *Proc. National Acad Sci USA*, 1996, 93, 7.295-7.299; Siddiqui, A.Q., y col., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4.122-4.128; Eisenberg, E.J., y col., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, 20, 1.091-1.098; Lee, W.A., y col., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49, 1898); documento US 2006/0241064; y documento WO 2007/095269.

También es limitante de la utilidad de los nucleósidos como agentes terapéuticos viables sus a veces malas propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. Estas propiedades malas pueden limitar la absorción intestinal de un agente y limitar la absorción dentro del tejido o célula diana. Para mejorar sus propiedades se han empleado profármacos de nucleósidos. Se ha demostrado que la preparación de fosforamidatos de nucleósido mejora la absorción sistémica de un nucleósido y, además, el resto de fosforamidato de estos "pronucleótidos" se enmascara con grupos lipófilos neutrales para obtener un coeficiente de partición adecuado para optimizar la absorción y transporte dentro de la célula aumentando drásticamente la concentración intracelular del análogo de monofosfato de nucleósido en relación a la administración de solo el nucleósido original. La hidrólisis mediada por encima del resto de éster fosfato produce un monofosfato de nucleósido en el que la fosforilación inicial limitante de la tasa es innecesaria.

El documento WO 2005/003147 A2 describe composiciones y métodos de tratamiento de infección por *Flaviviridae*.

El documento WO 2008/121634 A2 describe profármacos de fosforamidato de derivados de nucleósido para el tratamiento de infecciones víricas.

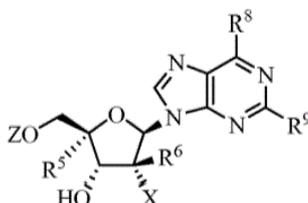
Cahard, D. y col., "Mini Reviews in Medicinal Chemistry", Bentham Science Publishers, Hilversum, NL, vol. 4, nº. 4, páginas 371-381, describe triésteres de ariloxi fosforamidato como prótidos.

Knaggs, M. y col., "Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters", Pergamon, Elsevier Science, GB, vol. 10, nº. 18, páginas 2.075-2.078, describe un estudio QSAR que investiga el efecto de la variación de éster de 1-alanina sobre la actividad anti-VIH de algunos derivados de fosforamidatos de d4T.

40 Compendio de la invención

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier descripción adicional que no parte del alcance reivindicado está solamente destinada a fines ilustrativos.

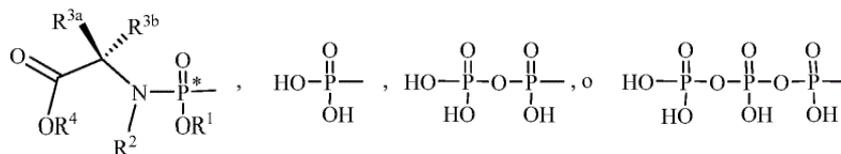
45 La presente descripción está dirigida a un fosforamidato de nucleósido representado por la fórmula II o sus estereoisómeros, sales, sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos, formas cristalinas o metabolito de los mismos:



II

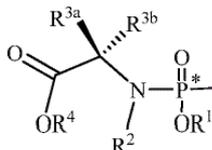
50

Z es



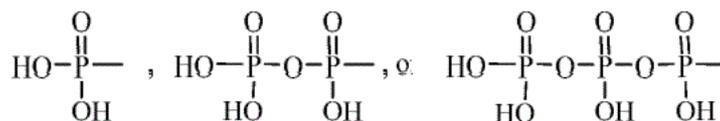
en el que cuando
Z es

5



R¹ es hidrógeno o fenilo; R² es hidrógeno; R^{3a} es hidrógeno; R^{3b} es CH₃; R⁴ es hidrógeno, metilo, ⁱPr o ciclopentilo; R⁵ es hidrógeno; R⁶ es CH₃; X es F; y R⁸ es OMe, -N(-CH₂CH₂CH₂-) (azetidín-1-ilo), OBn, u OH; y R⁹ es NH₂;

10 y en el que cuando
Z es



15 R⁵ es hidrógeno, R⁶ es CH₃; X es F; y R⁸ es OMe, -N(-CH₂CH₂CH₂-) (azetidín-1-ilo), OBn, u OH; y R⁹ es NH₂.

Definiciones

20 La frase “un” o “una” entidad como se usa en el presente documento se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos o al menos uno compuesto. Así, los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “al menos uno” se pueden usar intercambiabilmente en el presente documento.

25 La frase “como se definió anteriormente en el presente documento” o “como se define en el presente documento” se refiere a la primera definición proporcionada en el Compendio de la Invención.

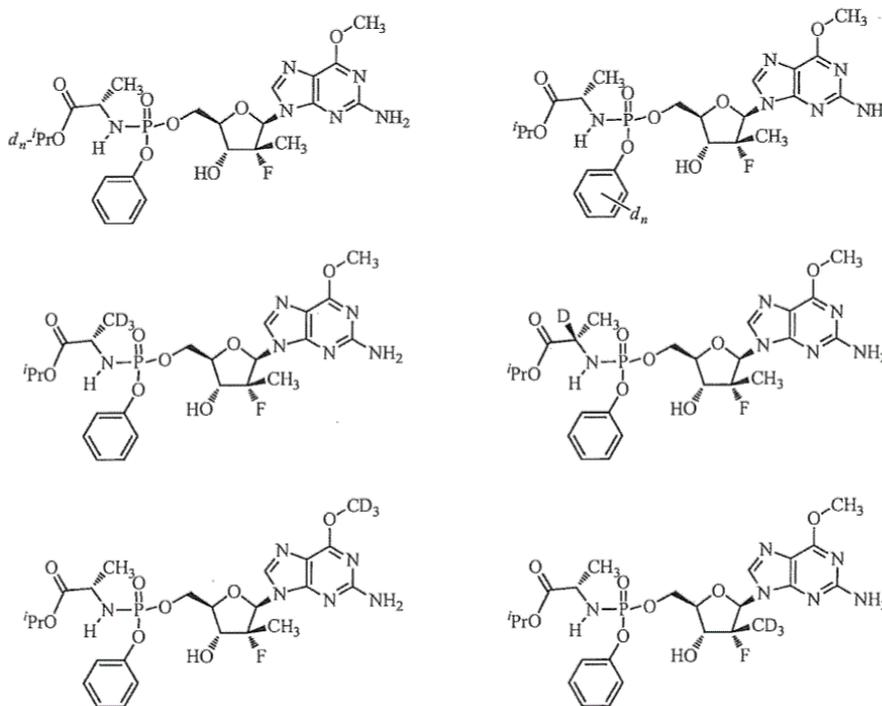
30 Los términos “opcional” u “opcionalmente” como se usan en el presente documento significa que un suceso o circunstancia posteriormente descrita puede, pero no necesariamente, ocurrir, y que la descripción incluye ejemplos en los que ocurre el suceso o circunstancia y ejemplos en los que no ocurre. Por ejemplo, “enlace opcional” significa que el enlace puede o no puede estar presente, y que la descripción incluye enlaces sencillos, dobles o triples.

35 El término “independientemente” se usa en el presente documento para indicar que un variable se aplica a un ejemplo cualquiera sin ninguna consideración hacia la presencia o ausencia de una variable que tiene esa misma o una definición diferente dentro del mismo compuesto. Por tanto, en un compuesto en el que R aparece dos veces y se define como “carbono o nitrógeno independientemente”, ambos R pueden ser carbono, ambos R pueden ser nitrógeno, o un R puede ser carbono y el otro nitrógeno.

40 El término “purificado”, como se describe en el presente documento, se refiere a la pureza de un compuesto dado. Por ejemplo, un compuesto está “purificado” cuando el compuesto dado es un componente principal de la composición, es decir, al menos puro al 50 % p/p. Por tanto, “purificado” abarca al menos 50 % p/p de pureza, al menos 60 % p/p de pureza, al menos 70 % de pureza, al menos 80 % de pureza, al menos 85 % de pureza, al menos 90 % de pureza, al menos 92 % de pureza, al menos 94 % de pureza, al menos 96 % de pureza, al menos 97 % de pureza, al menos 98 % de pureza y al menos 99 % de pureza.

45 También se contempla que el compuesto representado por la fórmula II abarca análogos deuterados. El término “análogos deuterados” significa un compuesto descrito en el presente documento o sus sales, por el cual un ¹H-isótopo, es decir, hidrógeno (H), está sustituido por un ²H-isótopo, es decir, deuterio (D). La sustitución por deuterio puede ser parcial o total. Sustitución por deuterio parcial significa que al menos un hidrógeno está sustituido por al menos un deuterio. Por ejemplo, para un compuesto representado por la fórmula 11, un experto en la técnica puede contemplar al menos los siguientes análogos deuterados parciales (en los que “d_n” representa el número n de átomos de deuterio, por ejemplo, para un grupo isopropilo n=1-7, mientras que para un grupo fenilo, n=1-5). Aunque

se demuestra que los grupos de metilo representados a continuación están completamente deuterados, uno reconocerá que también son posibles variaciones deuteradas parciales, tales como, -CDH₂ y -CD₂H.



5

Hay unos pocos análogos deuterados que son sintéticamente accesibles mediante procedimientos y reactivos que son conocidos por el experto en la técnica.

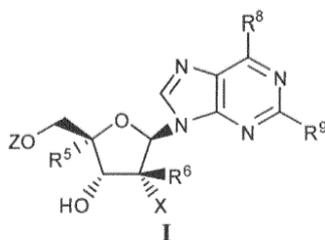
10 El término "metabolito", como se describe en el presente documento, se refiere a un compuesto producido *in vivo* después de la administración a un sujeto en necesidad del mismo.

15 El término "sales", como se describe en el presente documento, se refiere a un compuesto producido por la protonación de un resto aceptor de protones y/o desprotonación de un resto donador de protones. Se debería indicar que la protonación del resto aceptor de protones da como resultado la formación de una especie catiónica en la que la carga está equilibrada por la presencia de un anión fisiológico, mientras que la desprotonación del resto donador de protones da como resultado la formación de una especie aniónica en la que la carga está equilibrada por la presencia de un catión fisiológico.

20 **Descripción detallada de la invención**

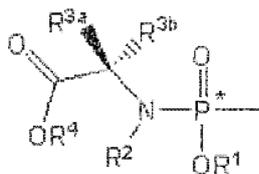
Según un primer aspecto de la presente invención, se ha proporcionado un compuesto representado por la fórmula I, o sus estereoisómeros, sales, o sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos o formas cristalinas de los mismos:

25



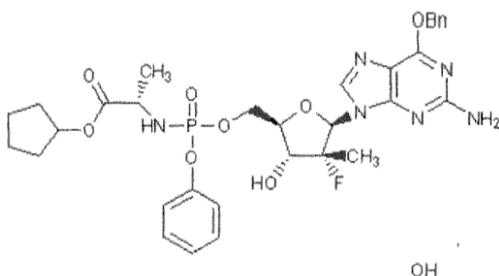
en el que
Z es

30



R¹ es hidrógeno o fenilo; R² es hidrógeno; R^{3a} es hidrógeno; R^{3b} es CH₃; R⁴ es hidrógeno o ciclopentilo; R⁵ es hidrógeno; R⁶ es CH₃; X es F; R⁸ es OMe u OBn; y R⁹ es NH₂.

- 5 Preferiblemente, su estereoisómero.
 Más preferiblemente, en el que R⁸ es OMe.
 Preferiblemente, en el que R¹ es fenilo.
 Más preferiblemente, en el que R⁴ es ciclopentilo.
 Ventajosamente, en el que R⁴ es hidrógeno.
- 10 Preferiblemente, en el que R¹ y R⁴ ambos son hidrógeno.
 Más preferiblemente, en el que el compuesto se selecciona entre



- 15 En un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado una composición farmacéutica que comprende un medio farmacéuticamente aceptable seleccionado entre un excipiente, vehículo, diluyente y medio equivalente y un compuesto según uno cualquiera de los anteriores

- 20 En un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado un compuesto o una composición según uno cualquiera de los anteriores para su uso en terapia.

- En un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado un compuesto o una composición según uno cualquiera de los anteriores, para su uso en el tratamiento de cualquier afección resultante de una infección por virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina o virus de la encefalitis japonesa en un sujeto; preferiblemente, en el que el sujeto está infectado con el virus de la hepatitis C.

- En un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado un compuesto o una composición según uno cualquiera de los anteriores, para su uso en el tratamiento del virus de la hepatitis C.

30 **Dosis, administración y uso**

- Un aspecto de la presente descripción está dirigido a una composición para el tratamiento de cualquiera de los agentes víricos descritos en el presente documento comprendiendo dicha composición un medio farmacéuticamente aceptable seleccionado entre un excipiente, vehículo, diluyente o medio equivalente y un compuesto, que se pretende que incluya sus sales (sales de adición ácida o básica), hidratos, solvatos, y formas cristalinas que se pueden obtener, representado por la fórmula I.

- Se contempla que la formulación puede contener cualquiera de los compuestos contemplados en la presente invención o bien solos o en combinación con otro compuesto de la presente invención.

- Los compuestos de la presente invención pueden estar formulados en una amplia diversidad de formas farmacéuticas y vehículos de administración oral. La administración oral puede estar en forma de comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas de gelatina duras y blandas, soluciones, emulsiones, jarabes, o suspensiones. Los compuestos de la presente invención son eficaces cuando se administran por administración por supositorio, entre otras vías de administración. La manera más conveniente de administración generalmente es oral usando una pauta posológica diaria conveniente que se puede ajustar según la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente a la medicación antivírica.

50

Un compuesto o compuestos de la presente invención, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes convencionales, se pueden colocar en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosis unitaria pueden estar comprendidas de ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos activos adicionales y las formas de dosis unitaria pueden contener cualquier cantidad adecuadamente eficaz del principio activo proporcional con el intervalo de dosis diaria prevista a emplear. Se pueden emplear las composiciones farmacéuticas como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o líquidos tales como suspensiones, emulsiones, o cápsulas rellenas para uso oral; o en la forma de supositorios para la administración rectal o vaginal. Una preparación típica contendrá desde aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 % de compuesto o compuestos activos (p/p). El término "preparación" o "forma farmacéutica" se pretende que incluya tanto formulaciones sólidas como líquidas del compuesto activo y un experto en la técnica apreciará que un principio activo puede existir en diferentes preparaciones dependiendo de la dosis y los parámetros farmacocinéticos deseados.

El término "excipiente" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que se usa para preparar una composición farmacéutica, y generalmente es seguro, no tóxico y ni biológica ni de otra manera indeseable, e incluye excipientes que son aceptables para su uso veterinario, así como su uso farmacéutico para humanos. Los compuestos de esta invención se pueden administrar solos pero generalmente se administrarán en mezcla con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticos adecuados seleccionados en relación a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar.

Una forma de "sal farmacéuticamente aceptable" de un principio activo también puede conferir inicialmente una propiedad farmacocinética deseable sobre el principio activo que estaba ausente en la forma de no sal, y puede incluso afectar positivamente las farmacodinámicas del principio activo con respecto a su actividad terapéutica en el cuerpo. La frase "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto como se usa en el presente documento significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Tales sales incluyen: (1) sales de adición ácida, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido 3-(4-hidroxi-benzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido salicílico, ácido mucónico y similares o (2) sales de adición básica formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos inorgánicos anteriormente enumerados, en las que la bases conjugadas comprenden un componente catiónico seleccionado entre Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , R^{g+} , en el que R^g es un alquilo C_{1-3} y g es un número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4. Se debería entender que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolvente (solvatos) o formas cristalinas (polimorfas) como se definen en el presente documento, de la misma sal de adición ácida.

Preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizadores, lubricantes, agentes de suspensión, ligantes, conservantes, agentes desintegrantes de comprimido o un material de encapsulamiento. En los polvos, el vehículo generalmente es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el compuesto activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo generalmente se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseado. Vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de baja fusión, manteca de cacao y similares. Las preparaciones en forma sólida pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromatizantes, estabilizadores, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizadores y similares. Ejemplos de formulaciones sólidas están ilustrados en los documentos EP 0524579; US 6.635.278; US 2007/0099902; US 7.060.294; US 2006/0188570; US 2007/0077295; US 2004/0224917; US 7.462.608; US 2006/0057196; US 6.267.985; US 6.294.192; US 6.569.463; US 6.923.988; US 2006/0034937; US 6.383.471; US 6.395.300; US 6.645.528; US 6.932.983; US 2002/0142050; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2007/0026073; US 2007/0059360; y US 2008/0014228.

Las formulaciones líquidas también son adecuadas para la administración oral, incluyendo la formulación líquida emulsiones, jarabes, elixires y suspensiones acuosas. Estas incluyen preparaciones en forma sólida las cuales tienen la finalidad de convertirse en preparaciones en forma líquida poco antes de usarse. Las emulsiones pueden estar preparadas en soluciones, por ejemplo, en soluciones de propilenglicol acuosas o pueden contener agentes emulsionantes tales como lecitina, monooleato de sorbitano o acacia. Se pueden preparar suspensiones acuosas dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y otros agentes de suspensión bien conocidos.

Los compuestos de la presente invención pueden estar formulados para la administración como supositorios. Una cera de baja fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácido grasos o manteca de cacao se funde primero y el

componente activo se dispersa homogéneamente, por ejemplo, por agitación. A continuación, la mezcla homogénea fundida se vierte en moldes de tamaño conveniente, se dejan enfriar y solidificar.

5 Los compuestos de la presente invención pueden estar formulados para la administración vaginal. Pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen además del principio activo tales vehículos que son conocidos en la técnica por ser apropiados.

10 Formulaciones adecuadas junto con vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticos están descritas en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pennsylvania. Un científico experto en formulación puede modificar las formulaciones dentro de las instrucciones de la memoria para proporcionar numerosas formulaciones para una vía particular de administración sin volver las composiciones de la presente invención inestables o comprometer su actividad terapéutica.

15 La modificación de los presentes compuestos para volverlos más solubles en agua u otro vehículo, por ejemplo, puede estar fácilmente acompañada de modificaciones menores (por ejemplo, formulación de sal), que están bien dentro de la especialidad en la técnica. También está bien dentro de la especialidad en la técnica modificar la vía de administración y la pauta posológica de un compuesto particular para manejar las farmacocinéticas de los presentes compuestos para el efecto beneficioso máximo en pacientes.

20 Además, los compuestos purificados de la presente invención pueden estar formulados junto con liposomas o micelas. Como liposomas, se contempla que los compuestos purificados se pueden formular de una manera como se describe en las Patentes americanas N° 5.013.556; U.S. 5.213.804; 5.225.212; 5.891.468; 6.224.903; 6.180.134; 5.192.549; 5.316.771; 4.797.285; 5.376.380; 6.060.080; 6.132.763; 6.653.455; 6.680.068; 7.060.689; 7.070.801; 5.077.057; 5.277.914; 5.549.910; 5.567.434; 5.077.056; 5.154.930; 5.736.155; 5.827.533; 5.882.679; 6.143.321; 25 6.200.598; 6.296.870; 6.726.925; y 6.214.375.

Como micelas, se contempla que los compuestos purificados se pueden formular de una manera como se describe en las Patentes americanas N° 5.145.684 y 5.091.188.

30 Una realización de la presente invención se dirige a un uso del compuesto representado por la fórmula I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier afección que es el resultado de una infección por uno cualquiera de los siguientes agentes víricos: virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina y el virus de la encefalitis japonesa.

35 El término "medicamento" significa una sustancia usada en un método de tratamiento y/o profilaxis de un sujeto en necesidad del mismo, en el que la sustancia incluye, pero no se limita a, una composición, una formulación, una forma farmacéutica y similares, que comprende el compuesto de fórmula I. Se contempla el uso del compuesto representado por la fórmula I en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de cualquiera de las afecciones antivíricas descritas en el presente documento, o bien solo o en combinación con otro compuesto de la presente invención. Un medicamento incluye, pero no se limita a, una cualquiera de las composiciones contempladas por la séptima realización de la presente invención.

45 Un aspecto de la presente descripción está dirigido a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto en necesidad del mismo, dicho método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto representado por la fórmula I al sujeto.

50 Un primer aspecto está dirigido a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto en necesidad del mismo, dicho método comprende la administración de una terapéuticamente eficaz de al menos dos compuestos que caen dentro del alcance del compuesto representado por la fórmula I al sujeto.

55 Un segundo aspecto está dirigido a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto en necesidad del mismo, dicho método comprende alternativamente o concurrentemente la administración de una terapéuticamente eficaz de al menos dos compuestos que caen dentro del alcance del compuesto representado por la fórmula I al sujeto.

60 Se pretende que un sujeto en necesidad del mismo sea uno que tiene cualquier afección que es el resultado de una infección por cualquiera de los agentes víricos descritos en el presente documento, los cuales incluyen, pero no se limita a, el virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina o virus de la encefalitis japonesa, virus de *flaviviridae* o pestivirus o hepacivirus o un agente vírico que causa síntomas equivalentes o comparables a cualquiera de los virus anteriormente enumerados.

65 El término "sujeto" significa un mamífero, que incluye, pero no se limita a, ganado bovino, cerdos, oveja, pollo, pavo, búfalo, llama, avestruz, perros, gatos y seres humanos, preferiblemente el sujeto es un ser humano. Se contempla que en el método de tratamiento de un sujeto del mismo de la novena realización puede ser cualquiera de los compuestos contemplados en el presente documento, o bien solo o en combinación con otro compuesto de la

presente invención.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento significa una cantidad requerida para reducir los síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requerimientos individuales en cada caso particular. Esa dosis puede variar dentro de amplios límites dependiendo de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y el estado de salud general del paciente, otros medicamentos con los que el paciente se está tratando, la vía y la forma de administración y las preferencias y la experiencia del médico implicado. Para la administración oral, una dosis diaria de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 10 g, incluyendo todos los valores intermedios, tales como 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,050, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,175, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, y 9,5, por día debería ser apropiada en monoterapia y/o en terapia de combinación. Una dosis diaria particular está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 g por día, incluyendo todos los valores incrementales de 0,01 g (es decir, 10 mg) intermedios, una dosis diaria preferida aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,8 g por día, más preferiblemente aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,6 g por día, y lo más preferiblemente aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,25 g por día, incluyendo cada una de las cuales todos los valores incrementales de 0,01 g intermedios. Generalmente, el tratamiento se inicia con una gran "dosis de carga" inicial para reducir o eliminar rápidamente el virus seguido de un descenso de la dosis a un nivel suficiente para prevenir el resurgimiento de la infección. Un experto en el tratamiento de enfermedades descritas en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación y en dependencia del conocimiento personal, la experiencia y las descripciones de esta solicitud, de establecer una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención para una enfermedad y paciente dado.

Se puede establecer la eficacia terapéutica a partir de ensayos de la función del hígado incluyendo, pero no limitándose a, niveles de proteínas tales como proteínas de suero (por ejemplo, albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (por ejemplo, alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, γ -glutamiltranspeptidasa, etc.), síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol y síntesis de ácidos biliares; una función metabólica del hígado, incluyendo, pero no limitándose a, metabolismo de carbohidrato, metabolismo de aminoácidos y amoniaco. Alternativamente, se puede hacer un seguimiento de la eficacia terapéutica midiendo el ARN de VHC. Los resultados de estos ensayos permitirán que se optimice la dosis.

Un aspecto de la presente descripción, se dirige a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto en necesidad del mismo, dicho método comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la fórmula I y una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente antivírico; en el que la administración es concurrente o alternativa. Se entiende que el tiempo entre la administración alternativa puede oscilar entre 1 a 24 horas, lo que incluye cualquier subintervalo intermedio que incluye, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 horas. Ejemplos de "otro agente antivírico" incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de proteasa NS3 de VHC (véase los documentos WO 2008010921, WO 2008010921, EP 1881001, WO 2007015824, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007014921, WO 2007014920, WO 2007014922, US 2005267018, WO 2005095403, WO 2005037214, WO 2004094452, US 2003187018, WO 200364456, WO 2005028502, y WO 2003006490); inhibidores de NS5B de VHC (véase los documentos US 2007275947, US20072759300, WO2007095269, WO 2007092000, WO 2007076034, WO 200702602, US 2005-98125, WO 2006093801, US 2006166964, WO 2006065590, WO 2006065335, US 2006040927, US 2006040890, WO 2006020082, WO 2006012078, WO 2005123087, US 2005154056, US 2004229840, WO 2004065367, WO 2004003138, WO 2004002977, WO 2004002944, WO 2004002940, WO 2004000858, WO 2003105770, WO 2003010141, WO 2002057425, WO 2002057287, WO 2005021568, WO 2004041201, US 20060293306, US 20060194749, US 20060241064, US 6784166, WO 2007088148, WO 2007039142, WO 2005103045, WO 2007039145, WO 2004096210, y WO 2003037895); inhibidores de NS4 de VHC (véase los documentos WO 2007070556 y WO 2005067900); inhibidores de NS5a de VHC (véase los documentos US 2006276511, WO 2006120252, WO 2006120251, WO 2006100310, WO 2006035061); agonistas del receptor tipo Toll (véase el documento WO 2007093901); y otros inhibidores (véase los documentos WO 2004035571, WO 2004014852, WO 2004014313, WO 2004009020, WO 2003101993, WO 2000006529); y compuestos descritos en la Solicitud de Patente americana N° 12/053.015, presentada el 21 de marzo de 2008.

Un aspecto de la presente descripción, está dirigida a un método de tratamiento y/o profilaxis en un sujeto en necesidad del mismo, dicho método comprende alternativamente o concurrentemente la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la fórmula I y otro agente antivírico al sujeto. Se entiende que el tiempo entre la administración alternativa puede oscilar entre 1 a 24 horas, lo cual incluye cualquier subintervalo intermedio que incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, y 23 horas.

Se contempla que el otro agente antivírico tal como interferón- α , interferón- β , interferón- α pegilado, ribavirina, levovirina, viremida, otro inhibidor nucleósido de polimerasa de VHC, un inhibidor no nucleósido de polimerasa de VHC, un inhibidor de proteasa de VHC, un inhibidor de helicasa de VHC o un inhibidor de fusión de VHC. Cuando el compuesto activo o su derivado o sal se administran en combinación con otro agente antivírico la actividad se puede incrementar sobre el compuesto original. Cuando el tratamiento es terapia de combinación, tal administración puede ser concurrente o secuencial con respecto a la de los derivados de nucleósido. Por tanto, la "administración concurrente" como se usa en el presente documento incluye la administración de los agentes en el mismo momento

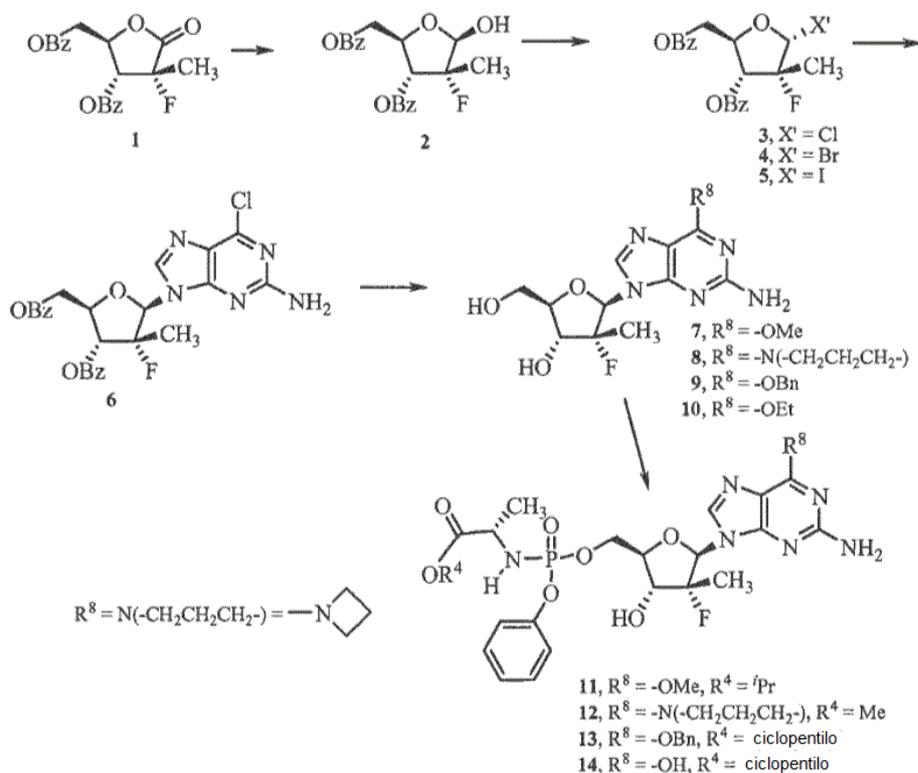
o a diferentes momentos. La administración de dos o más agentes en el mismo momento se puede alcanzar mediante una formulación sencilla que contiene dos o más principios activos o mediante la administración básicamente simultánea de dos o más formas farmacéuticas con un agente activo sencillo.

- 5 Se debería indicar que para los compuestos descritos en el presente documento los metabolitos se pueden producir tras la administración a un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, para un compuesto representado por la fórmula I, se contempla que se puede dar la hidrólisis del éster fosfato (-OR¹) o el éster carbonilo (-OR⁴); y que el producto hidrolizado resultante puede por sí mismo superar la hidrólisis *in vivo* para formar un monofosfato, el cual se puede convertir en un difosfato y/o trifosfato. Se contempla que las reivindicaciones proporcionadas más adelante abarcan tanto compuestos sintéticos como compuestos producidos *in vivo*. Los compuestos metabolito de los compuestos representados por las estructuras 11 a 14 (véase más adelante) se pueden obtener mediante la administración de dichos compuestos a un paciente en necesidad de los mismos. Alternativamente, los compuestos metabolito se pueden preparar mediante hidrólisis selectiva del éster carbonilo (-OR⁴) o el éster fosfato (-OR¹) para compuestos representados por las estructuras 11 a 14 (véase más adelante). Ya que los metabolitos o sales de metabolito están contemplados en el presente documento, también se contempla como una realización alternativa un método de tratamiento en un paciente en necesidad del mismo que pone en contacto al menos un compuesto representado por la fórmula I con al menos una célula infectada por el virus de la hepatitis C.

20 Se entenderá que las referencias en el presente documento a tratamiento se amplían a profilaxis, así como al tratamiento de condiciones existentes. Además, el término "tratamiento" de una infección por VHC, como se usa en el presente documento, también incluye tratamiento o profilaxis de una enfermedad o una afección asociada con o mediada por infección por VHC, o los síntomas clínicos de las mismas.

Ejemplos

- 25 Se apreciará una interpretación adicional de la presente descripción mediante la consideración de los siguientes ejemplos, los cuales se supone que son solamente ilustrativos.



- 30 El uso de la vía de glicosilación convergente para preparar nucleósidos de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil purina y sus correspondientes fosforamidatos de nucleótido sucede con el desarrollo de la síntesis de 3,5-di-O-benzoil-2-deoxi-2-fluoro-2-C-metilribonolactona (Chun, K.; Wang, P. Solicitud de Patente Internacional WO 2006/031725).

- 35 Después de varios intentos usando el acoplamiento mediado por ácido de Lewis tipo Vorbrueggen y el ribonolactol 1-O-acetato de 3,5-di-O-benzoil-2-deoxi-2-fluoro-2-C-metilribonolactona, observamos rendimientos de acoplamiento muy bajos y el α -anómero indeseado era el producto principal. El acoplamiento de Mitsunobu con el ribonolactol (2) dio el producto deseado pero sin estereoselectividad y separación cromatográfica muy difícil dando como resultado

rendimientos aislados de 6 a 10 % para esta etapa sola y el método no era escalable.

El planteamiento preferido llega a ser la reacción tipo S_N2 usando un halo-azúcar y una sal de la base de purina. De nuevo, el reto de este planteamiento era cómo obtener un halo-azúcar α estereoespecíficamente en alto rendimiento para tomar ventaja de la inversión de la configuración esperada con las reacciones tipo S_N2 . Un método típico trata una mezcla anomérica del 1-O-acetato de un azúcar con HCl o HBr en ácido acético. Sin embargo, este método dio como resultado la producción de mezclas anoméricas no favorables. La reducción de la lactona (por ejemplo, con $LiAlH(t-BuO)_3$ o Red-Al) inicialmente genera una relación 2:1 de anómeros β/α pero después la purificación inicial a través de una columna de filtración en gel de sílice, el aceite resultante anomeriza lentamente para formar β -anómero cristalino puro del lactol (2). Esto se puede acelerar a partir de varios días a temperatura ambiente a 5 a 17 h a 50 °C con siembra de β -cristales. Observamos que una vez que el lactol está en solución, lentamente se anomeriza de nuevo hacia el equilibrio 2:1 en disolventes tales como diclorometano o cloroformo a temperatura ambiente. Este proceso se puede frenar considerablemente enfriando la solución (por ejemplo, -20 °C).

La cloración a través de un mecanismo S_N2 con N-clorosuccinimida (NCS) produjo un α -cloroazúcar (3) de una manera estereoespecífica en casi rendimiento cuantitativo.

Para obtener un α -bromoazúcar (4), se probaron muchas condiciones de bromación incluyendo N-bromosuccinimida (NBS) y HBr en ácido acético. Entre ellas, seguimos una reacción de bromación general usando una combinación de trifenilfosfina (PPh_3) y tetrabromuro de carbono (CBr_4) (por ejemplo, Hooz y col, *Can. J. Chem.*, 1968, 46, 86-87). Bajo las condiciones de uso de cloruro de metileno como disolvente y mantenimiento de una baja temperatura (-10 °C a -20 °C) obtuvimos el mejor resultado en el que la relación de isómero α/β deseada era mayor que 10:1, en un rendimiento de más del 80 %. Los solicitantes creen que no hay precedentes bibliográficos que describan este nivel de estereoselectividad para este tipo de reacción. Otra observación práctica era que conducir la bromación bajo condiciones por debajo de la temperatura ambiente, tal como, lo más preferiblemente aproximadamente -20 °C y exponer la solución de reacción fría a gel de sílice tan pronto como sea posible después de la finalización de la reacción minimiza la anomerización del bromoazúcar. El bromoazúcar se puede purificar a través de una columna de filtración en gel de sílice. Una vez tratado con gel de sílice, el bromoazúcar es prácticamente estable incluso a temperaturas elevadas.

El yodoazúcar (5) se preparó de una manera similar, el cual se puede acoplar con la purina para producir el intermediario clave (6).

Después del método de acoplamiento de purina general de Bauta y col (Solicitud de Patente Internacional WO 2003/011877), acoplamos el α -bromoazúcar (4) con la sal de potasio de 6-cloro-2-amino-purina en t-butanol en acetónitrilo. La reacción se tomó durante una semana a temperaturas ambiente. La reacción se optimizó para conseguir la finalización en 24 h a 50 °C. Después de la purificación parcial a través de una columna de filtración en gel de sílice, se aisló la mezcla anomérica en rendimiento al 63 % en una relación 14:1 de β/α de. El β -anómero (6) se podría cristalizar selectivamente a partir de una solución metanólica para dar el β -anómero deseado puro (6) en rendimiento al 55 % a partir del bromoazúcar (4).

Con el intermediario clave 6 en mano, se consigue la conversión en 2-amino purinas 6-sustituídas no protegidas (por ejemplo, 7 a 10). La conversión adicional en los derivados de fosforamidato (por ejemplo, 11 a 14) procedió mediante una adaptación del método de Lehsten y col., *Org. Proc. Res. Dev.*, 2002, 6, 819-822 o como se describe en la solicitud de patente americana No. 12/053,015, presentada el 21 de marzo de 2008, pp. 651-675. Ya que el grupo de fosforamidato también se puede hacer reaccionar un grado menor sobre el 3' hidroxilo secundario, el potencial existe para impurezas de 3' monofosforamidato y 3',5' bis-fosforamidato. Se esperará que el isómero 3' tenga propiedades físicas similares al isómero 5' deseado haciendo difícil la purificación por cromatografía. Esto se mejora mediante la reacción adicional de la mezcla de producto bruto con cantidades subestequiométricas de grupos protectores que son selectivos para hidroxilos primarios sobre hidroxilos secundarios tales como cloruro de t-butildimetilsililo, cloruro de t-butildifenilsililo o cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo en presencia de piridina o base similar para generar 3' fosforamidato 5' protegido. El producto resultante y el fosforamidato bis sustituido son menos polares que el 5' fosforamidato deseado y se puede separar fácilmente por cromatografía.

El compuesto (1) se puede obtener mediante un proceso descrito en la página 5 en la Solicitud Publicada americana N° 2008/0139802 (que corresponde a WO 2008/045419), en las páginas 11 a 13 en el documento WO 2006/012440, y en las páginas 20 a 22 y 30 a 31 en el documento WO 2006/031725.

Síntesis de benzoato de ((2R,3R,4R,5R)-3-(benzoiloxi)-4-fluoro-5-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metilo (2)

Se cargó la lactona (benzoato de (2R,3R,4R)-3-(benzoiloxi)-4-fluoro-4-metil-5-oxotetrahidrofuran-2-il)metilo (1, 379 g, 1,018 mol) a un matraz de fondo redondo de tres cuellos seco de 5 l equipado con un agitador mecánico, embudo de adición y termómetro. El sólido se disolvió en THF anhidro (1,75 l) y se enfrió hasta -30 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió una solución hidruro de tri-terc-butoxialuminio y litio (1,0 M en THF, 1,527 l) a la solución de lactona mientras se agitaba durante 1 h y se mantenía la temperatura a -30 °C. Después de terminar la adición, la temperatura se incrementó lentamente y la reacción se siguió por TLC (R_f de lactol 0,4, EtOAc al 30 % en hexanos).

La reacción era completa después de 1 h 15 min (temperatura alcanzada -10 °C). La reacción se paró mediante la adición de acetato de etilo (900 ml) por el embudo de adición. Se añadió NH₄Cl saturado (40 ml) a 0 °C. La mezcla turbia se decantó en un matraz de fondo redondo de 10 l. El residuo sólido que quedaba se filtró y se lavó con acetato de etilo (2x200 ml). El filtrado se combinó con la solución decantada y la solución combinada se concentró bajo presión reducida. El residuo aceitoso se disolvió en acetato de etilo (2 l) y se lavó con HCl 3 N (600 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (3x400 ml). La capa orgánica combinada se lavó con agua (3x800 ml), NaHCO₃ saturado (400 ml) y salmuera (400 ml). La solución orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un residuo aceitoso marrón claro. El residuo se purificó por columna con tampón (2,2 kg de gel de sílice de 40 a 63 micras, empaquetado en un embudo de vidrio sinterizado de 6 l, 22 cm de longitud de gel de sílice, diámetro 15 cm) usando la succión y un gradiente en etapas de 5 %, 10 %, 20 % y 30 % de acetato de etilo en hexanos – alrededor de 5 l de cada una). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y concentraron bajo presión reducida hasta un líquido muy espeso incoloro (310,4 g).

El líquido lentamente se solidificó después de añadir el producto beta cristalino como semillas (alrededor de 100 mg dispersados) bajo vacío (0,2 mmHg) a 50 °C. El proceso de solidificación era completo en 20 horas a 50 °C con o sin vacío. El sólido blanco así recogido (293,8 g, 77 %) tiene un mp de 79 a 80 °C y la relación de β/α es 20:1 basado en la NMR.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) β-isómero, δ = 5,20 (dd, 1 H, OH); α-isómero, δ = 5,40 (dd, 1 H, OH). (β-lactol). (DMSO-*d*₆): δ 7,99 (m, 2 H, arom.), 7,93 (m, 2 H, arom.), 7,70 (m, 1 H, arom.), 7,61 (m, 1 H, arom.), 7,55 (m, 2 H, arom.), 7,42 (m, 2 H, arom.), 7,32 (dd, 1 H, C1-H), 5,54 (dd, 1 H, C3-H), 5,20 (dd, 1 H, OH), 4,55-4,50 (m, 1 H, C5-Ha), 4,46-4,40 (m, 2 H, C5-Hb y C4-H), 1,42 (d, 3 H, CH₃).

Síntesis de benzoato de ((2R,3R,4R,5R)-3-(benzoiloxi)-5-cloro-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metilo (3)

Se añadió NCS (1,07 g, 8,01 mmol) poco a poco a 0 °C a una solución de mezcla del compuesto 2 (1,0 g, 2,67 mmol) y PPh₃ (1,4 g, 5,34 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml). A continuación, se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 h y se vertió en una columna de gel de sílice y se eluyó con EtOAc-hexanos (1:4) usando presión. Se combinaron las fracciones correctas recogidas, se concentraron y se evaporaron conjuntamente con CH₂Cl₂ varias veces y se usaron en la próxima etapa (1,0 g, 95 %).

¹H-NMR (CDCl₃) δ = 8,13-8,02 (m, 4H, aromático), 7,78-7,50 (m, aromático, 2H), 7,53-7,43 (m, 4H, aromático), 6,01 (s, 1H, H-1), 5,28 (dd, 1H, *J* = 3,2, 5,6 Hz, H-3), 4,88 (m, 1H, H-H-4), 4,77 (dd, 1H, *J* = 3,2, 12,4 Hz, H-5), 4,61 (dd, 1H, *J* = 4,0, 12,4 Hz, H-5'), 1,73 (d, 3H, *J* = 21,6 Hz, CH₃).

Síntesis de benzoato de ((2R,3R,4R,5R)-3-(benzoiloxi)-5-bromo-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metilo (4)

Se cargó diclorometano anhidro (5,6 l) en un reactor y se enfrió a -22 °C o por debajo. Se añadió trifenilfosfina (205,4 g, 0,783 mol) al disolvente frío y la suspensión se agitó para formar una solución. El lactol (2, 209,4 g, 0,559 mol) en forma sólida se añadió a la solución fría y se agitó durante 15 min. Se añadió tetrabromuro de carbono (278,2 g, 0,839 mol) poco a poco mientras se mantenía la temperatura de la solución entre -22 °C a -20 °C bajo un flujo de gas de nitrógeno (aproximadamente 30 min). Después de finalizar la adición de CBr₄, la temperatura se elevó lentamente a -17 °C durante 20 min. La reacción se consideró que era completa al >95 % por TLC (R_f 0,61 (α), 0,72 (β), 0,36 lactol; EtOAc al 20 % en hexanos). La solución de reacción se transfirió inmediatamente a un recipiente que contenía 230 g de gel de sílice de grado de cromatografía rápida (*flash*) (40 a 63 micras). La mezcla agitada se pasó inmediatamente a través de una almohadilla de gel de sílice (680 g) en un embudo Buchner de vidrio sinterizado de 2,5 l. El filtrado se concentró bajo presión reducida a aproximadamente 800 ml y la relación de isómeros α/β del producto bruto era de 10:1 determinada por ¹H-NMR. (CDCl₃) δ = 6,35, (s, α C1-H), 6,43, (d, β C1-H). Se purificó el residuo por cromatografía en columna con tapón usando 2,1 kg de gel de sílice en un embudo Buchner de vidrio sinterizado de 6 l y se eluyó (por succión) con una elución en gradiente en etapas de 1 %, 5 %, 8 %, 12 % de EtOAc en hexano (alrededor de 4 l cada una) para separar impurezas no polares seguido de 12 %, 25 % de EtOAc en hexano (total 6 l) para eludir el producto. Las fracciones que contenían el producto se combinaron en dos fracciones, se concentraron bajo presión reducida, se secaron bajo vacío (0,1 mmHg, temperatura ambiente, 20 h) hasta aceites incoloros. Fracción principal (197 g, 89 % α/β=20:1). El isómero alfa se cristalizó a partir de una pequeña porción del aceite tras estar en reposo a 0 °C durante varias semanas para dar grandes placas finas, mp 59 a 61 °C. El isómero beta puro cristalizó a partir de una mezcla de aceite de producto alfa y beta a partir de una corrida menos selectiva temprana para dar agujas, mp 77 a 79 °C.

¹H-NMR (β-bromuro) (CDCl₃): δ = 8,08 (m, 2 H, arom.), 8,04 (m, 2 H, arom.), 7,62 (m, 1 H, arom.), 7,54-7,45 (m, 3 H, arom.), 7,35 (m, 2 H, arom.), 6,43 (d, 1 H, C1-H), 6,04 (dd, 1 H, C3-H), 4,78-4,73 (m, 2 H, C4-H y C5-Ha), 4,63-4,58 (m, 1 H, C5-Hb), 1,76 (d, 3 H, CH₃). α-bromuro, α/β = 20:1 (CDCl₃): δ 8,13 (m, 2 H, arom.), 8,02 (m, 2 H, arom.), 7,63-7,56 (m, 2 H, arom.), 7,50-7,42 (m, 4 H, arom.), 6,34 (s, 1 H, C1-H), 5,29 (dd, 1 H, C3-H), 4,88 (m, 1 H, C4-H), 4,78 (dd, 1 H, C5-Ha), 4,63 (dd, 1 H, C5-Hb), 1,72 (d, 3 H, CH₃).

Síntesis de benzoato de ((2R,3R,4R,5R)-3-(benzoiloxi)-4-fluoro-5-iodo-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metilo (5)

Se añadió yoduro (680 mg, 2,68 mmol) a una solución del compuesto 2 (1 g, 2,67 mmol), trifenilfosfina (700 mg, 2,67 mmol) e imidazol (180 mg, 2,67 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml). La mezcla resultante se agitó durante 30 min y se

vertió en una columna de gel de sílice y se eluyó con EtOAc-hexanos (1:4) para dar un producto parecido al jarabe (1,3 g, cuantitativo) y su uso en la próxima reacción sin caracterización adicional.

Síntesis de benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-ilo (6)

A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 12 l se cargó 6-cloro-2-aminopurina (225,4 g, 1,329 mol). Se añadió un terc-BuOH anhidro (4,5 l) y la solución se agitó con un agitador mecánico a temperatura ambiente. Se añadió terc-butóxido de potasio (sólido, 151,6 g, 1,35 mol) poco a poco bajo un flujo de gas de nitrógeno mientras se agitaba. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min adicionales. Se cargó el α -bromuro (4, 197 g, 0,451 mol) y 3 l de acetonitrilo anhidro a temperatura ambiente a un matraz de fondo redondo de 5 l. Se añadió la solución de bromuro a la suspensión de base de purina durante 1 min a temperatura ambiente. El matraz de 5 l se aclaró con acetonitrilo (2x1 l) para transferir bromuro completamente a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó gradualmente a 50 °C durante 2 h con una manta de calentamiento y controlador, y se agitó durante 20 h. La reacción casi era completa como se muestra por TLC beta (R_f 0,28, EtOAc al 30 % en hexanos). La reacción se paró mediante la adición de NH_4Cl saturado (200 ml) para formar una suspensión. El sólido suspendido¹ se separó por filtración a través de una almohadilla de 3 cm de Celite en un embudo Buchner de porcelana de 2,5 l. El sólido se lavó con tolueno (3x100 ml). El filtrado combinado se neutralizó añadiendo solución de HCl 6 N hasta pH 7 (aproximadamente 220 ml). La mezcla se concentró bajo presión reducida. Cuando se redujo el volumen de la mezcla a aproximadamente un tercio del volumen, se separó el sólido precipitado adicional por filtración de una manera similar. El filtrado se concentró más a un volumen de aproximadamente 800 ml. El residuo se cargó en una columna con tapón (1,6 kg de gel de sílice de grado rápido en un embudo Buchner de vidrio sinterizado de 6 l) y se eluyó (vía succión) con un gradiente de acetato de etilo al 10 % en hexanos (6 l) para separar las impurezas no polares, acetato de etilo al 30 % en hexanos para proporcionar una cantidad pequeña de lactol (6 l) y, a continuación, acetato de etilo al 40 % a aproximadamente 45 % en hexanos (4 l) para eluir la cantidad principal de producto. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se secaron bajo vacío (0,2 mmHg, 24 h, temperatura ambiente) hasta un sólido en espuma blanco (150,7 g, $\beta/\alpha=14:1$ por NMR.

¹H-NMR. (CDCl_3) beta: δ = 1,33 (d, 22,4 Hz, 2'-C- CH_3), alfa: 1,55 (d, 22 Hz, 2'-C- CH_3).

La espuma de la mezcla de producto se disolvió en metanol (700 ml) a temperatura ambiente. Al estar en reposo, se formó lentamente un sólido durante 2 h. La suspensión se enfrió en un congelador a -5 °C durante 17 h. El sólido blanco resultante se recogió por filtración y se lavó con MeOH frío (-5 °C, 3x60 ml) y éter etílico (3x100 ml). El sólido se secó bajo vacío (0,2 mmHg, 24 h, temperatura ambiente) para proporcionar 110,5 g de β -producto con excelente de (β/α 99,8:1 por HPLC). El filtrado se concentró parcialmente (alrededor de 400 ml) y, a continuación, se diluyó con más MeOH (400 ml) mientras se calentaba a 60 °C. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente, se sembró y se enfrió a -5 °C. Se recogió el segundo cultivo, se lavó y se secó de una manera similar para dar más producto como sólido blanco (12,26 g) con pureza diastereomérica similar. Las aguas madre se concentraron hasta sequedad bajo presión reducida (alrededor de 25 g). El residuo era una mezcla de isómeros β y α . Se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice automatizada (Analogix, cartucho de 240 g, 40 % a 50 % de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar 14,52 g de la espuma producto que se recristalizó a partir de MeOH, se lavó y se secó de una manera similar para proporcionar unos 8,46 g adicionales de producto en alta pureza.

Los tres sólidos se consideraron que eran de pureza similar y se combinaron para dar 131,2 g de producto cristalino blanco 6, (55 % a partir del bromoazúcar, 49 % a partir del lactol). Mp 160,5 a 162,0°C. Pureza de HPLC 99,5% incluyendo 0,20 % de alfa.

¹H-NMR (β -anómero puro, CDCl_3): δ = 8,03 (m, 2 H, arom.), 7,93 (m, 2 H, arom.), 7,88 (s, 1 H, C8-H), 7,60 (m, 1 H, arom.), 7,50 (m, 1 H, arom.), 7,44 (m, 2 H, arom.), 7,33 (m, 2 H, arom.), 6,44 (dd, 1 H, C1'-H), 6,12 (d, 1 H, C3'-H), 5,35 (s, 2 H, NH_2), 5,00 (dd, 1 H, C5'-Ha), 4,76 (m, 1 H, C4'-H), 4,59 (dd, 1 H, C5'-Hb), 1,33 (d, 3 H, CH_3).

¹H-NMR (α -isómero, CDCl_3): δ = 8,11-8,09 (m, 3 H, arom. y C8-H), 8,01 (m, 2 H, arom.), 7,63 (m, 1 H, arom.), 7,55 (m, 1 H, arom.), 7,48 (m, 2 H, arom.), 7,39 (m, 2 H, arom.), 6,35 (d, 1 H, C1'-H), 5,76 (dd, 1 H, C3'-H), 5,18 (s, 2 H, NH_2), 4,93-4,89 (m, 1 H, C4'-H), 4,75-4,71 (m, 1 H, C5'-Ha), 4,58-4,54 (m, 1 H, C5'-Hb), 1,55 (d, 3 H, CH_3).

Síntesis de benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-ilo (6) a partir del compuesto 3

Se añadieron sal de potasio de la base (1,37 g, 8,05 mmol) en t-butanol (5 ml) a una solución del compuesto 3 (450 mg, 2,68 mmol) en clorobenceno (1,5 ml) y posteriormente acetonitrilo anhidro (5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a 80 a 140 °C en un tubo sellado durante 7 días y se concentraron en vacío después de la neutralización con HCl. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos: EtOAc=2:1) para dar el compuesto 6 (90 mg, 15 %) como espuma blanca.

Síntesis de benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-ilo (6) a partir del compuesto 5

5 Se añadió sal de sodio de la base (1,37 g, 8,05 mmol) en DMF (10 ml) a temperatura ambiente a una solución del compuesto 5 (1,3 g, 2,68 mmol) en t-butanol (10 ml). La mezcla resultante se agitó durante 15 h y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos:EtOAc=2:1) para dar el compuesto 6 (220 mg, 16 %) como una espuma blanca.

Síntesis de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-metoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahidrofuran-3-ol (7)

15 Se cargó benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-ilo (6, 7,50 g, 14,26 mmol) a un matraz de fondo redondo seco de 250 ml. Se añadió metanol anhidro (30 ml) y se formó una suspensión blanca. A 50 °C, se añadió una solución de metóxido de sodio en metanol (25 %, 19,7 ml, 64,17 mmol) por una jeringa seca bajo una atmósfera de nitrógeno. Se formó una mezcla de reacción turbia blanca. Después de 3,5 h a 50 °C, la reacción era completa sin resto de material de partida como se muestra por el ensayo por TLC. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se neutralizó por adición del ácido acético glacial (3 ml). Se separó por filtración un sólido blanco y se lavó con metanol (3x5 ml). El filtrado se mezcló con 20 g de gel de sílice y se concentró hasta sequedad. La mezcla se cargó en línea con un cartucho de gel de sílice y se separó por cromatografía en columna usando un gradiente de metanol en diclorometano, 0 a 15 % de MeOH. El producto eluyó en metanol al 12 % en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, concentraron bajo presión reducida y se secaron bajo vacío (0,2 mmHg, 50 °C, 24 h) hasta un sólido en polvo blanco (4,45 g, rendimiento al 98 %), mp 199 a 202 °C.

25 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 8,18 (1 H, s, C8-H), 6,61 (2 H, s, NH₂), 6,05 (1 H, d, C1'-H), 5,68 (1 H, d, 3'-OH), 5,26 (1 H, m, 5'-OH), 4,23-4,13 (1 H, m, C3'-H), 3,96 (3 H, s, OCH₃), 3,92-3,83 (2 H, m, C4'-H y C5'-H_a), 3,70-3,67 (1 H, m, C5'-H_b), 1,06 (3 H, d, C2'-CH₃).

Síntesis de 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-metoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-isopropilo (11)

35 Se cargaron diclorofosfato de fenilo (2,66 g, 12,61 mmol) y diclorometano anhidro (40 ml) a un matraz de fondo redondo seco de 250 ml. Se añadió sal de aminoéster (2,60 g, 15,53 mmol) a la solución y la mezcla se enfrió a -5 °C. A continuación, se añadió rápidamente N-metilimidazol (7,7 ml, 97 mmol) por una jeringa seca a -5 °C y la solución se agitó a -5 °C durante 1 h. Se añadió el nucleósido (7, 3,04 g, 9,7 mmol) a partir de un vial en una porción a -5 °C y el sólido se disolvió lentamente en 20 minutos. Se dejó que la temperatura de reacción subiera hasta la temperatura ambiente durante 2 h. Después de 17 h, la reacción no era completa. Se produjeron más reactivos (como se describió anteriormente a partir del fosfato (2,66 g), aminoéster (2,60 g) y NMI (3,8 ml, 48 mmol)) y se añadió a la mezcla de reacción a -5 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas más. La reacción era casi completa como se muestra por el resultado de TLC y se diluyó con 70 ml de diclorometano. Se añadió la solución de HCl (1 N, 70 ml). Se separó la capa acuosa y se extrajo con diclorometano. Se lavó la capa orgánica con NaHCO₃ saturado, agua, salmuera y se secó sobre MgSO₄. Después de la separación del disolvente bajo presión reducida, el residuo pegajoso se purificó a través de cromatografía en columna automatizada usando un cartucho de 240 g y un gradiente de 0 a 8 % de 2-PrOH en diclorometano para proporcionar un sólido en espuma (4,16 g, 7,14 mmol, rendimiento al 73 %). Pureza de HPLC al 97,4 %. Los espectros de NMR del producto mostraron que es una mezcla de dos diastereoisómeros con una relación de 1,2:1.

45 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7,98 (1 H, s, 8-H de un isómero), 7,95 (1 H, s, 8-H de otro isómero), 7,37-7,32 (2 H, m, arom-H), 7,22-7,15 (3 H, m, arom-H), 6,6 (2 H, s, NH₂), 6,11 (1 H, d, C1'-H de un isómero), 6,09 (1 H, d, C1'-H de otro isómero), 6,09-5,98 (1 H, m, NH amida), 5,88 (1 H, d, 3'-OH de un isómero), 5,81 (1 H, d, 3'-H de otro isómero), 4,85-4,75 (1 H, hepta, metina H de *iso*-propilo), 4,46-4,27 (2 H, m, C4'-H, α-H de aminoéster), 4,15-4,07 (1 H, m, C3'-H), 3,96 (3 H, s, OCH₃), 3,82-3,72 (2 H, m, C5'-H_a y C5'-H_b), 1,23-1,06 (9 H, m, CH₃ de aminoéster), 1,03 (3 H, d, C2'-CH₃).

50 ³¹P-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 4,91 (un isómero), 4,72 (otro isómero).

55 Un método de purificación alternativo es alterar químicamente el subproducto de 3' fosforamidato menor para simplificar la separación cromatográfica. El producto de fosforamidato bruto se disuelve en piridina anhidra (5 ml/g), y se trata con 0,5 equivalentes molares de cloruro de t-butildimetilsililo a temperatura ambiente para reaccionar selectivamente con el hidroxilo primario 5' libre de la impureza del isómero 3'. Se puede hacer un seguimiento del progreso de la reacción por LC/MS. Una vez que el isómero 3' se convierte en un derivado de 5'-tBDMS-3'-fosforamidato, la reacción se para con metanol (3 eq.), se concentra bajo presión reducida, se divide entre acetato de etilo y ácido cítrico al 5 % y, a continuación, se concentra la capa orgánica. A continuación, el residuo se somete a cromatografía que ya se puede hacer con una mayor carga y un gradiente más rápido y puede alcanzar una pureza mayor.

Síntesis de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(azetidín-1-il)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahidrofuran-3-ol (8)

Se añadieron benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benziloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-ilo (6, 3,6 g, 6,85 mmol) y 150 ml de etanol absoluto a un matraz de presión sellado seco de 350 ml (Chemglass). Se añadió clorhidrato de azetidina (2,56 g, 27,4 mmol) y, a continuación, seguido de trietilamina (4,16 g, 41,1 mmol). La suspensión se agitó y se calentó a 70 °C mientras se sellaba durante 5 horas. Todo el material de partida se consumió pero los grupos benzoilo se mantuvieron como se muestra por TLC. Se añadió metóxido de sodio (7,8 ml, 34,3 mmol, solución al 25 % en metanol) a la mezcla y se calentó a 50 °C. La reacción era completa después de 3,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se neutralizó por adición de ácido acético glacial (0,41 g, 6,85 mmol). La mezcla se concentró bajo presión reducida y, a continuación, el residuo se trituró con acetato de etilo. El sólido resultante se separó por filtración y el sólido se lavó con EtOAc (2x15 ml). El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (Analogix, cartucho de 120 g, gradiente de 0 a 15 % de MeOH en DCM). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se secaron (50 °C, 0,2 mmHg, 17 h) hasta un sólido de espuma coloreado rosa claro (2,15 g, 6,35 mmol, 93 %).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ = 8,00 (s, 1 H, C8-H), 6,03 (s, 2 H, NH₂), 6,00 (d, 1 H, C1'-H), 5,64 (d, 1 H, 3'-OH), 5,24 (t, 1 H, 5'-OH), 4,24-4,10 (m, 5 H, N-CH₂ de azetidina, C3'-H), 3,90-3,81 (m, 2 H, C4'-H y C5'-H_a), 3,69-3,64 (m, 1 H, C5'-H_b), 2,37 (penta, 2 H, CH₂ centro de azetidina), 1,05 (d, 3 H, C2'-CH₃).

Síntesis de 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(azetidín-1-il)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-metilo (12)

Se añadieron diclorofosfato de fenilo (1,72 g, 8,15 mmol) y diclorometano anhidro (17 ml) a un matraz de fondo redondo seco de 100 ml. Se añadió el aminoéster (1,42 g, 10,2 mmol) y la suspensión se enfrió a -5 °C. Se añadió N-metilimidazol (3,34 g, 40,7 mmol) por una jeringa en una porción y la solución se agitó a -5 °C durante 1 h bajo una atmósfera de nitrógeno. A continuación, se añadió el nucleósido (8, 1,38 g, 4,07 mmol) (sólido en espuma) en una porción y la solución se dejó calentar durante 1 h hasta temperatura ambiente. Después de 4 h a temperatura ambiente, TLC (MeOH al 5 % en DCM) indicó una reacción incompleta (se quedó aproximadamente el 30 % del material de partida) pero también una impureza menos polar creciente. La reacción se paró por la adición de NH₄Cl saturado (20 ml) y se diluyó con diclorometano (20 ml). La capa orgánica se separó y lavó con agua (5x30 ml), salmuera (20 ml) y se secó con Na₂SO₄. La solución que contenía el producto se filtró y se concentró bajo presión reducida hasta un residuo aceitoso bruto, 3,26 g. Esto se purificó por cromatografía en columna (Analogix, cartucho de 40 g, gradiente de MeOH en DCM desde 0 % a 10 %). El producto se eluyó en MeOH al 4 % en DCM. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se secaron (50 °C, 0,2 mmHg, 17 h) hasta un sólido en espuma blanca (1,322 g, 2,28 mmol, 56 %). Pureza de HPLC al 99,25 %. Los espectros de NMR del producto mostraron que es una mezcla de dos diastereoisómeros con una relación de 55:45.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ = 7,80 (s, 1 H, 8-H de un isómero), 7,80 (s, 1 H, 8-H de otro isómero), 7,38-7,33 (m, 2 H, arom-H), 7,22-7,14 (m, 3 H, arom-H), 6,09 (s, 2 H, NH₂), 6,12-6,02 (m, 2 H, C1'-H y NH), 5,83 (d, 1 H, 3'-OH de un isómero), 5,77 (d, 1 H, 3'-OH de otro isómero), 4,46-4,05 (m, 8 H, NCH₂ de azetidina, α-H de aminoéster, C3'-H, C4'-H, C5'-H_a), 3,89-3,79 (m, 1 H, C5'-H_b), 3,56 (s, 3 H, OCH₃ de aminoéster en un isómero), 3,54 (s, 3 H, OCH₃ de aminoéster en otro isómero), 2,37 (penta, 2 H, CH₂ centro de azetidina), 1,21 (d, 3 H, α-CH₃ de aminoéster en un isómero), 1,19 (d, 3 H, α-CH₃ de aminoéster en otro isómero), 1,08 (d, 3 H, C2'-CH₃).

³¹P NMR (DMSO-*d*₆): δ 4,85 (un isómero), 4,77 (otro isómero).

Síntesis de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(benziloxi)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahidrofuran-3-ol (9)

Se añadieron benzoato de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benziloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-ilo (6, 8,0 g, 15,2 mmol) y alcohol bencílico anhidro (128 ml) a un matraz de fondo redondo seco de 500 ml. Se cargaron NaH (60 % en aceite mineral, 2,44 g, 60,8 mmol) y DMF anhidro (40 ml) a otro matraz de fondo redondo seco de 250 ml. La suspensión se agitó a 0 °C en un baño de agua con hielo. Se añadió alcohol bencílico (27 ml) gota a gota por una jeringa. Se formó lentamente una solución y se transfirió a la suspensión de nucleósido rápidamente bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla se calentó hasta 50 °C y se agitó. La reacción era completa después de 3 h y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se neutralizó por la adición de HCl 4N hasta alrededor de pH=7 (12 ml). La solución se concentró bajo presión reducida (4 mbar, baño a 90 °C). El residuo turbio se diluyó con diclorometano (100 ml) y se lavó con agua (3x30 ml), salmuera (30 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. La suspensión se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida hasta un residuo aceitoso. Esto se purificó por cromatografía en columna (Analogix, gradiente de 0 a 8 % de MeOH en DCM). El producto eluyó en MeOH al 4 % en DCM. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se secaron (50 °C, 0,2 mmHg, 17 h) hasta un sólido en espuma blanco (4,57 g, 11,7 mmol, 77,2 %).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ = 8,18 (s, 1 H, 8-H), 7,53-7,51 (m, 2 H, arom-H), 7,43-7,34 (m, 3 H, arom-H), 6,66 (s, 2 H, NH₂), 6,05 (d, 1 H, C1'-H), 5,67 (d, 1 H, 3'-OH), 5,48 (dd, 2 H, CH₂ de bencilo), 5,25 (t, 1 H, 5'-OH), 4,18 (dt, 1 H, C3'-H), 3,92-3,82 (m, 2 H, C4'-H y C5'-H_a), 3,71-3,66 (m, 1 H, C5'-H_b), 1,07 (d, 3 H, C2'-CH₃).

Síntesis de 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(benziloxi)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-ciclopentilo (13)

Se cargaron diclorofosfato de fenilo (3,29 g, 15,58 mmol) y diclorometano anhidro (24 ml) a un matraz de fondo redondo de 100 ml. El tosilato de aminoéster (polvo blanco) se añadió y la solución se enfrió a -5 °C bajo nitrógeno. Se añadió N-metilimidazol (4,92 g, 59,94 mmol) por una jeringa seca en una porción y la solución clara incolora resultante se agitó a -5 °C durante una hora. A continuación, se añadió el sólido de nucleósido (9) (2,334 g, 5,99 mmol) a la solución bajo nitrógeno en una porción y la mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente para dar una solución incolora. Se hizo un seguimiento del progreso de reacción por TLC (metanol al 5 % en diclorometano). TLC indicó una reacción incompleta después de 20 h (aproximadamente quedó el 30 % del material de partida). La reacción aún se paró por la adición de diclorometano (30 ml) y HCl 1 N (60 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (2x20 ml). La capa orgánica combinada se lavó con agua (2x40 ml), NaHCO₃ saturado (30 ml), agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄. Después de la separación del sólido mediante filtración, el filtrado se concentró bajo presión reducida hasta un residuo gomoso (7,28 g). El residuo se purificó por cromatografía en columna (Analogix, cartucho de 80 g, gradiente de 0 a 10 % de MeOH en DCM). El producto eluyó en MeOH al 2 % en DCM. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se secaron (50 °C, 0,2 mmHg, 17 h) hasta un sólido en espuma blanco (2,249 g, una mezcla de dos isómeros, 60:40). También se recuperó una porción del nucleósido de partida (0,257 g). El rendimiento es de 62 % basado en el material de partida consumido.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7,98 (s, 1 H, 8-H de un isómero), 7,96 (s, 1 H, 8-H de otro isómero), 7,52-7,50 (m, 2 H, arom-H), 7,42-7,31 (m, 5 H, arom-H), 7,21-7,12 (m, 3 H, arom-H), 6,68 (s, 2 H, NH₂), 6,12 (d, 1 H, C1'-H de un isómero), 6,10 (d, 1 H, C1'-H de otro isómero), 6,04-5,96 (m, 1 H, NH), 5,87 (d, 1 H, 3'-OH de un isómero), 5,81 (d, 1 H, 3'-OH de otro isómero), 5,48 (dd, 2 H, CH₂ de bencilo), 4,99-4,93 (m, 1 H, α-H de aminoéster), 4,46-4,27 (m, 3 H, C3'-H, C4'-H, OCH de aminoéster), 4,15-4,06 (m, 1 H, C5'-H_a), 3,81-3,71 (m, 1 H, C5'-H_b), 1,74-1,43 (m, 8 H, metileno CH₂ de c-pentilo), 1,18 (d, 3 H, α-CH₃ de aminoéster), 1,09 (d, 3 H, C2'-CH₃ de un isómero), 1,08 (d, 3 H, C2'-CH₃ de otro isómero).

³¹P NMR (DMSO-*d*₆): δ = 4,91 (un isómero), 4,73 (otro isómero).

Síntesis de 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-hidroxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilamino)propanoato de (2S)-ciclopentilo (14)

Se añadió etanol absoluto anhidro (50 ml) a un matraz de fondo redondo seco de 250 ml con material de partida (13, 1,92 g, 2,8 mmol). Se añadió paladio sobre carbón (10 %, 120 mg). La atmósfera en el matraz se intercambió con hidrógeno y la mezcla se agitó bajo 1 atm de gas de hidrógeno durante 3,5 h a temperatura ambiente. La reacción se consideró completa por TLC y el Pd sobre carbón se separó mediante filtración y se lavó con etanol (2x10 ml). El filtrado se concentró bajo presión reducida hasta un residuo sólido. El sólido se mezcló con gel de sílice (10 g) y se purificó por cromatografía en columna (Analogix, cartucho de 40 g, gradiente de 1 % a 16 % de MeOH en DCM). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se secaron (50 °C, 0,2 mmHg, 17 h) hasta un polvo blanco (1,43 g, 86 %). La pureza de HPLC al 99,55 %. Los espectros de NMR del producto mostraron que es una mezcla de dos diastereoisómeros con una relación de 60:40. Mp=133 a aproximadamente 150 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 10,70 (s, 1 H, NH de imida), 7,81 (s, 1 H, 8-H de un isómero), 7,79 (s, 1 H, 8-H de otro isómero), 7,38-7,33 (m, 2 H, arom-H), 7,22-7,14 (m, 3 H, arom-H), 6,62 (s, 2 H, NH₂), 6,08-5,97 (m, 2 H, C1'-H y NH de aminoéster), 5,88 (b, 1 H, 3'-OH de un isómero), 5,82 (b, 1 H, 3'-OH de otro isómero), 5,01-4,94 (m, 1 H, α-H de aminoéster), 4,44-4,25 (m, 3 H, C3'-H, C4'-H, OCH de aminoéster), 4,12-4,04 (m, 1 H, C5'-H_a), 3,82-3,72 (m, 1 H, C5'-H_b), 1,77-1,46 (m, 8 H, metileno CH₂ de c-pentilo), 1,21-1,19 (m, 3 H, α-CH₃ de aminoéster), 1,09 (d, 3 H, C2'-CH₃ de un isómero), 1,08 (d, 3 H, C2'-CH₃ de otro isómero).

³¹P-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 4,95 (un isómero), 4,72 (otro isómero).

Síntesis de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-etoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahidrofuran-3-ol (10)

Se cargó (6, 11 g, 20,92 mmol) a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadió etanol absoluto anhidro (210 ml) y seguido por K₂CO₃ anhidro (28,91 g, 209,2 mmol). La suspensión se agitó y se calentó a 75 °C bajo nitrógeno durante 5,5 h. Se consumió todo el material de partida en ese momento por el ensayo por TLC. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y el sólido se separó por filtración. El filtrado se neutralizó mediante la adición de ácido acético glacial (2,52 g) hasta pH aproximadamente 7 y se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en metanol y se mezcló con gel de sílice (15 g). La mezcla secada de producto bruto y el gel de sílice se transfirió a un cartucho vacío y se separó a través de cromatografía en columna (Analogix 220 g; gradiente de 0 a 15 % de MeOH en DCM) para proporcionar producto (MeOH al 5 % en DCM) como sólido en espuma blanco (3,73 g, 54,5 %). Se aisló un segundo sólido blanco de la columna (MeOH al 10 % en DCM, 1,44 g) y es una mezcla de dos dímeros de nucleósido. Se recogió de la columna un tercer sólido blanco más polar (MeOH al 15 % en DCM, 0,47 g) y es una mezcla de trímeros de nucleósido. La pureza de HPLC del producto de 99,94 %.

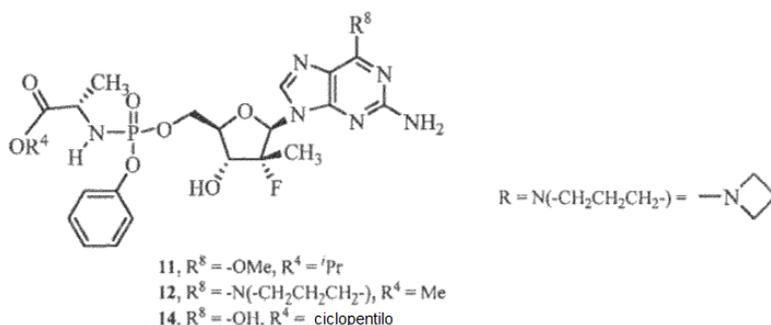
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 8,16 (s, 1 H, 8-H), 6,55 (s, 2 H, NH₂), 6,04 (d, 1 H, C1'-H), 5,66 (d, 1 H, 3'-OH), 5,24 (m, 1 H, 5'-OH), 4,44 (q, 2 H, 6-OCH₂), 4,23-4,08 (m, 1 H, C3'-H), 3,91-3,82 (m, 2 H, C4'-H y C5'-H_a), 3,71-3,66 (m, 1 H, C5'-H_b), 1,36 (t, 3 H, CH₃ de etilo), 1,06 (d, 3 H, C2'-CH₃).

Datos biológicos

Ensayo de replicón de VHC. Células Huh7 que contenían el ARN del replicón de VHC (células clon A; Apath, LLC, St. Louis, Mo.) se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio de Eagle modificado de Dulbecco (alta glucosa) que contenía suero bovino fetal al 10 %, L-glutamina 4 mM y piruvato de sodio 1 mM, 1 x aminoácidos no esenciales y G418 (1.000 µg/ml). Se realizaron ensayos antivíricos en el mismo medio sin G418. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 1.500 células por pocillo, y se añadieron los compuestos de ensayo inmediatamente después de la siembra. Tiempo de incubación 4 días. Al final de la etapa de incubación, se aisló el ARN celular (RNeasy 96 kit; Qiagen). El ARN del replicón y un control interno (reactivos control de ARNr TaqMan; Applied Biosystems) se amplificaron en un protocolo de RT-PCR multiplex de una etapa como se recomienda por el fabricante. Los cebadores (*primers*) de VHC y la sonda se diseñaron con el programa informático Primer Express (Applied Biosystems) y cubrieron secuencias de región 5'-no traducida (UTR) altamente conservadas (sentido, 5'-AGCCATGGCGTTAGTA(T)GAGTGT-3', y antisentido, 5'-TTCCGCAGACCACTATGG-3'; sonda, 5'-FAM-CCTCCAGGACCCCCCTCC-TAMRA-3').

Para expresar la eficacia antivírica de un compuesto, el ciclo umbral de RT-PCR del compuesto de ensayo se sustrajo a partir del ciclo de RT-PCR umbral promedio del control no fármaco (ΔCt_{VHC}). Un ΔCt de 3,3 es igual a una reducción de 1-log 10 (igual a la concentración efectiva al 90 % [CE_{90}]) en niveles de ARN de replicón. La citotoxicidad del compuesto de ensayo también se podría expresar calculando los valores de ΔCt_{ARNr} . El parámetro de especificidad $\Delta\Delta Ct$, a continuación, se podría introducir ($\Delta Ct_{VHC} - \Delta Ct_{ARNr}$), en el cual los niveles de ARN de VHC se normalizan para los niveles de ARNr y se calibran frente al control no fármaco.

El compuesto 11 y los compuestos de referencia 12 y 14 están representados por la(s) siguiente(s) estructura(s),



se ensayaron sus propiedades biológicas basándose en el ensayo precedente. Los resultados de estos ensayos están descritos en la Tabla 1.

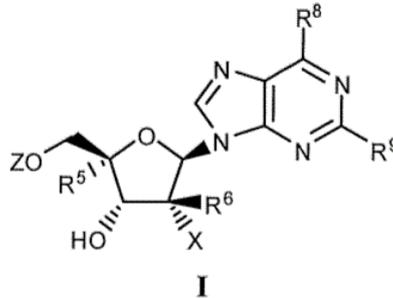
Tabla 1. Actividad de los compuestos seleccionados

Nº de compuesto	CE ₉₀ del ClonA (µM)
11	0,02
12	0,07
14	0,13

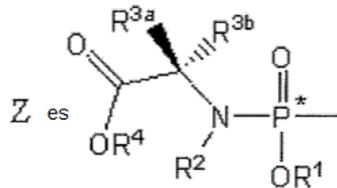
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula I, o sus estereoisómeros, sales, o sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos o formas cristalinas de los mismos:

5



en la que



10

R¹ es hidrógeno o fenilo; R² es hidrógeno; R^{3a} es hidrógeno; R^{3b} es CH₃; R⁴ es hidrógeno o ciclopentilo; R⁵ es hidrógeno; R⁶ es CH₃; X es F; R⁸ es OMe u OBn; y R⁹ es NH₂.

15

2. El compuesto de la reivindicación 1 o su estereoisómero.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que R⁸ es OMe.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ es fenilo.

20

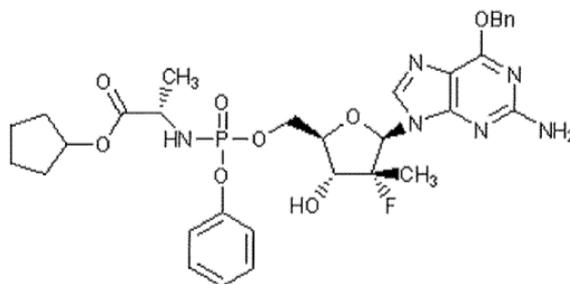
5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R⁴ es ciclopentilo.

6. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R⁴ es hidrógeno.

25

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ y R⁴ ambos son hidrógeno.

8. El compuesto de la reivindicación 1 o su estereoisómero el cual es



30

9. Una composición farmacéutica que comprende un medio farmacéuticamente aceptable seleccionado entre un excipiente, un vehículo, un diluyente y un medio equivalente y un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

35

10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición según la reivindicación 9, para su uso en la terapia.

11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de cualquier afección resultante de una infección por el virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, rinovirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la diarrea viral bovina o virus de la encefalitis japonesa en un sujeto; preferiblemente en donde el sujeto está infectado con el virus de la hepatitis C.

5

12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento del virus de la hepatitis C.