

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 287**

51 Int. Cl.:

C07H 19/067 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2014 PCT/US2014/034018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14169278**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2014 E 14722955 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2984097**

54 Título: **Derivado de nucleósido altamente activo para el tratamiento del VHC**

30 Prioridad:

12.04.2013 US 201361811464 P

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

10.07.2017

73 Titular/es:

**ACHILLION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
300 George Street
New Haven, CT 06511-6624, US**

72 Inventor/es:

**DESHPANDE, MILIND;
WILES, JASON ALLAN;
HASHIMOTO, AKIHIRO y
PHADKE, AVINASH**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 623 287 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

Derivado de nucleósido altamente activo para el tratamiento del VHC

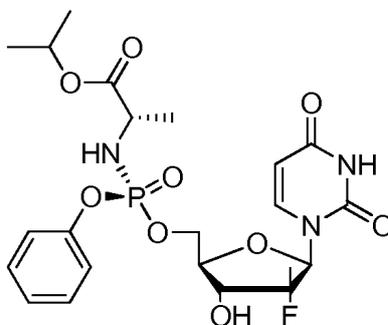
5 **Antecedentes**

Se calcula que un 3% de la población mundial está infectada con el virus de la hepatitis C. La Organización Mundial de la Salud calcula que 150 millones de personas están crónicamente infectadas a nivel mundial. De los que están expuestos al VHC, de un 80% a un 85% se vuelven crónicamente infectados, al menos un 30% desarrollan cirrosis hepática y un 1-4% desarrollan carcinoma hepatocelular. El Virus de la Hepatitis C (VHC) es una de las causas más prevalentes de enfermedad hepática crónica en los Estados Unidos, según consta representando aproximadamente un 15 por ciento de la hepatitis vírica aguda, de un 60 a un 70 por ciento de la hepatitis crónica y hasta un 50 por ciento de la cirrosis, enfermedad hepática en fase terminal, y del cáncer de hígado. La infección crónica con el VHC es la causa más común de trasplante de hígado en los EE.UU., Australia y la mayor parte de Europa. Se calcula que la hepatitis C causa de 10.000 a 12.000 muertes anuales en los Estados Unidos. Aunque la fase aguda de la infección con VHC normalmente se asocia a síntomas leves, alguna evidencia sugiere que sólo aproximadamente de un 15% a un 20% de las personas infectadas eliminarán espontáneamente el VHC.

El VHC es un virus de ARN de una sola hélice envuelto. Se clasifica el VHC como un miembro del género Hepadivirus de la familia Flaviviridae. Se han caracterizado al menos 4 cepas de VHC, GT-1 - GT-4. El ciclo vital del VHC incluye la entrada en células huésped, la traducción del genoma del VHC, el procesamiento de poliproteínas y el ensamblaje del complejo replicasa, la replicación del ARN y el ensamblaje y la liberación de viriones. En el proceso de replicación del ARN, se produce una copia de hélice negativa complementaria del ARN genómico. Se usa la copia de hélice negativa como plantilla para sintetizar ARN genómicos de hélice positiva adicionales que pueden participar en la traducción, replicación, empaquetamiento o cualquier combinación de éstos para producir una progenie de virus.

Existen varias proteínas en la hepatitis C que han sido abordadas para la terapia con fármacos. NS5A es una fosfoproteína hidrofílica rica en prolina que se une a zinc sin actividad enzimática inherente, a la que se puede inhibir con ciertos compuestos no nucleotídicos. NS5B es una enzima clave que desempeña el papel más importante en la replicación del ARN vírico del VHC usando una hélice de ARN positiva vírica como plantilla, a la que se ha inhibido con derivados de nucleósidos sintéticos. La proteasa NS2-3 es una enzima responsable de la escisión proteolítica entre NS2 y NS3, que son proteínas no estructurales. La proteasa NS3 es responsable de la escisión de la proteína no estructural secuencia abajo. La ARN helicasa emplea la hidrólisis de ATP para desenrollar el ARN.

Sofosbuvir (Sovaldi, véase la estructura a continuación) es un fosoramidato de nucleósido inhibidor de NS5B aprobado en diciembre de 2013 para el tratamiento del VHC. Las indicaciones aprobadas recomiendan los siguientes regímenes: (i) para los genotipos 2 y 3, una tableta oral de 400 mg una vez al día en combinación con ribavirina y (ii) para los genotipos 1 y 4, una tableta oral de 400 mg una vez al día (terapia de triple combinación) con ribavirina e interferón pegilado. El tratamiento con sofosbuvir dura 12 semanas para los genotipos 1, 2 y 4 y 24 semanas para el genotipo 3. El sofosbuvir puede ser también utilizado con ribavirina para el tratamiento de pacientes que tienen hepatitis C crónica con carcinoma hepatocelular que esperan un trasplante de hígado durante hasta 48 semanas o hasta el trasplante de hígado para prevenir la infección por VHC postrasplante. La FDA concedió a Sovaldi la Revisión de Prioridad y la designación de Terapia de Avance en base a los datos de varias pruebas clínicas de gran tamaño que indicaban una respuesta vírica mantenida (RVM) de doce semanas en un 50-90 por ciento de los participantes en las pruebas. Los pacientes que alcanzan una "RVM12" son frecuentemente considerados como curados.



sofosbuvir

50

Alios BioPharma, Inc. dio licencia para ALS-2200 a Vertex Pharmaceuticals Inc. para el desarrollo del tratamiento de la hepatitis C en junio de 2011. ALS-2200 es una mezcla de diastereómeros en un estereocentro de fósforo quiral. Vertex está desarrollando un único diastereómero, VX-135, y éste está actualmente en pruebas clínicas de Fase II. Aunque las compañías no han desvelado la estructura química de VX-135, han dicho que es un profármaco análogo del nucleótido de uridina, y un inhibidor de NS5B. En 2013, la FDA puso a VX-135 en una suspensión clínica parcial después de que tres pacientes que habían recibido altas dosificaciones de VX-135 presentaran toxicidad hepática. La reducción de la dosis de un inhibidor nucleotídico para evitar la toxicidad puede a veces también comprometer o disminuir la eficacia. Vertex anunció en enero de 2014 que VX-135 en combinación con daclastavir (inhibidor de NS5A de Bristol-Myers Squibb) había completado una prueba en Fase 2a. En un análisis de intento de tratamiento, el índice de respuesta vírica mantenida cuatro semanas después de completarse el tratamiento (RVM4) era del 83% (10 de 12) en los individuos infectados con el genotipo 1 no tratados previamente con el tratamiento que recibieron 200 mg de VX-135 en combinación con daclatasvir. Un paciente exhibió un serio episodio adverso de vómitos/náuseas. El resto de los once pacientes completaron 12 semanas de tratamiento, para un índice de completación de tratamiento (RVM4) del 91%.

Idenix Pharmaceuticals Inc. está desarrollando IDX21437 para el tratamiento de la hepatitis C, el cual es un profármaco nucleótido de uridina inhibidor de NS5B. No se han publicado los detalles de la estructura química hasta la fecha. En abril de 2014, Idenix anunció que 300 mg de IDX21437 una vez al día durante siete días daba lugar a una reducción máxima media en la carga vírica de 4,2-4,3 log₁₀ UI/ml en 18 pacientes que no habían recibido el tratamiento con genotipo 1, 2 ó 3.

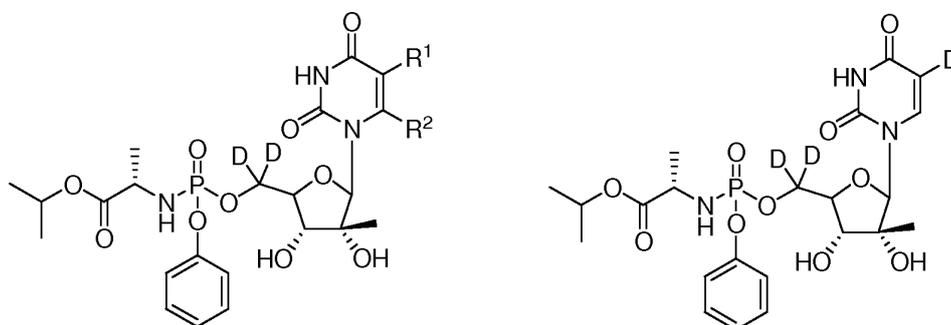
A pesar del progreso en el área del tratamiento de la hepatitis C, también ha habido una serie de difíciles contratiempos. BMS-986094, un fosforamidato basado en guanosina para la hepatitis C, fue excluido de las pruebas clínicas tras la muerte de un paciente debido a insuficiencia cardíaca en agosto de 2012. BMS anunció a continuación en 2013 que se marchaba del área de investigación de la hepatitis C. Tras la retirada del fármaco de BMS, se decretó la suspensión clínica del inhibidor de NS5B similar de Idenix Pharmaceuticals, IDX 19368, que comparte el mismo metabolito activo, BMS-986094, y finalmente se discontinuó. Esto siguió a la suspensión clínica previa y a la discontinuación del desarrollo del profármaco nucleotídico IDX184 para la misma indicación.

Es sabido que el tratamiento eficaz contra la hepatitis C incluye la terapia de combinación, debido a la aparición de resistencia vírica durante la monoterapia. Dados los retos documentados del desarrollo de agentes óptimos para la hepatitis C y el hecho de que se requieran múltiples agentes óptimos para una terapia eficaz, existe una fuerte necesidad de agentes adicionales para la hepatitis C.

Se desvelan varios derivados nucleosídicos antivíricos más en WO2010/135569 A1 y WO2012/142523 A2.

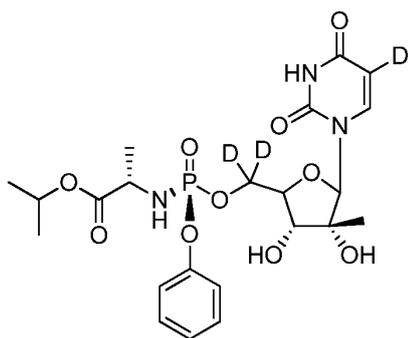
Resumen

Se ha descubierto sorprendentemente que el fosforamidato de uridina 2'-metil-5'-deuterado de Fórmula I, incluyendo la Fórmula II, la Fórmula IIA, la Fórmula IIB, la Fórmula IIIA o la Fórmula IIIB, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el deuterio tiene un enriquecimiento por encima del hidrógeno de al menos un 90%, y donde R¹ y R² son independientemente deuterio o hidrógeno, es un inhibidor superior de NS5B para el tratamiento de la hepatitis C. En una realización, R¹ es deuterio y R² es hidrógeno.

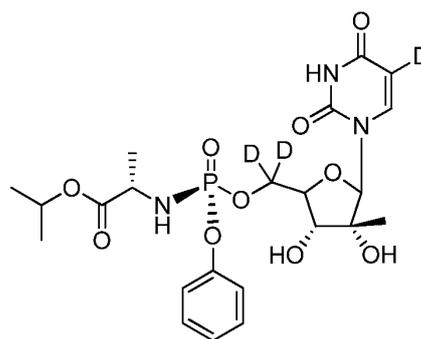


Fórmula I

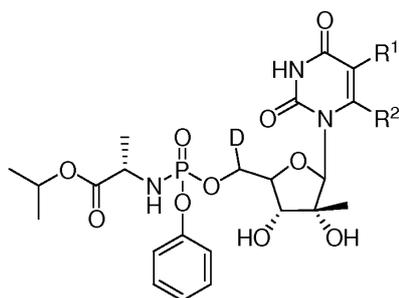
Fórmula II



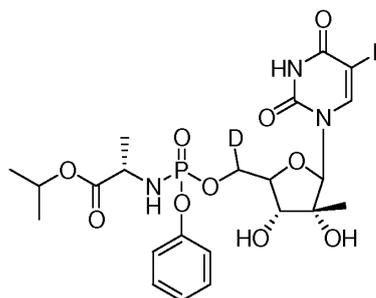
Fórmula IIA



Fórmula IIB



Fórmula IIIA



Fórmula IIIB

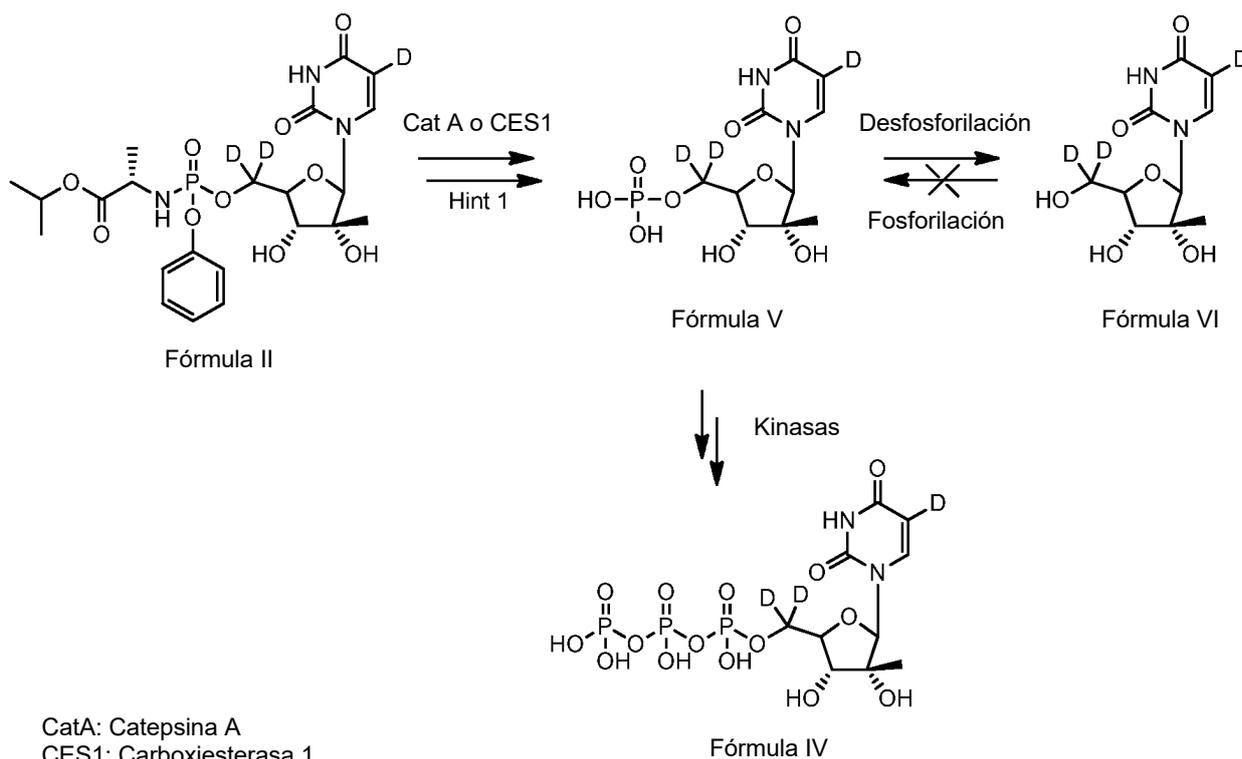
5 Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método para el tratamiento de un hospedador infectado con hepatitis C u otro trastorno aquí descrito que incluye la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I o II, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable.

10 En otra realización, el derivado nucleosídico de Fórmula I, II, IIIA, o IIIB es administrado como un estereoisómero R o S de fósforo, que está en forma al menos un 90% pura, y típicamente en forma un 95, 98 ó 99% pura.

Una realización también incluye un derivado nucleosídico de Fórmula I, II, IIIA o IIIB, que se administra como una mezcla de estereoisómeros R o S de fósforo, por ejemplo una mezcla 50/50. Por ejemplo, se puede administrar una
15 mezcla, tal como una mezcla 50/50, de Fórmula IIA y IIB.

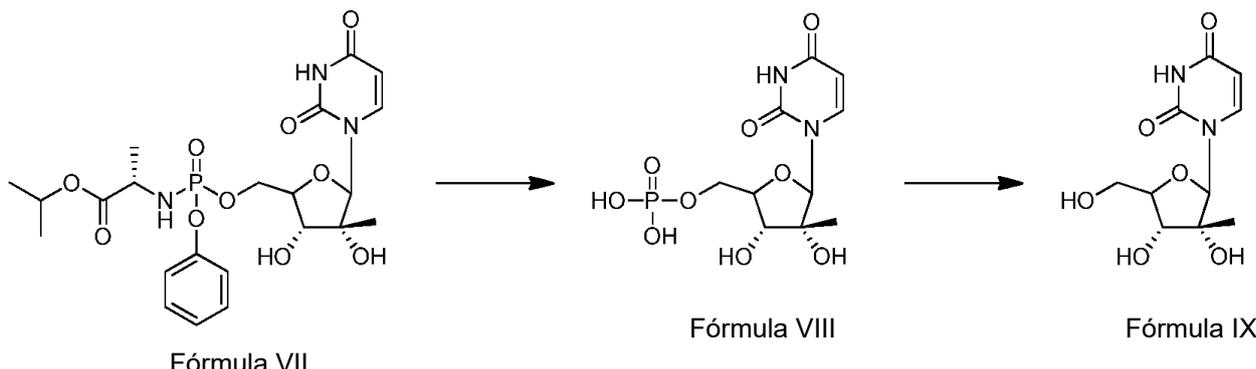
En otra realización, se proporciona una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula IIIA o IIIB o su sal farmacéuticamente aceptable, eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable, a un hospedador que
20 necesite terapia para la hepatitis C.

Al administrárselo al hospedador, por ejemplo, el fosoramidato de Fórmula II se metaboliza al 5'-OH, 5'-D, D-monofosfato (Fórmula V) a través de una serie de etapas enzimáticas.



5 La Fórmula II, por ejemplo, se convierte en su especie activa, el trifosfato de nucleósido (Fórmula IV), a través del monofosfato de nucleósido (Fórmula V). De manera alternativa, el monofosfato de nucleósido (Fórmula V) puede sufrir desfosforilación a 2'-C-metiluridina 5'-deuterada (Fórmula VI). El trifosfato de nucleósido 5'-deuterado (Fórmula IV) es el metabolito farmacológicamente activo que inhibe la replicación del virus de la hepatitis C, mientras que la 2'-C-metiluridina 5'-deuterada (Fórmula VI) muestra poca actividad, ya que es un sustrato pobre para la nucleósido monofosfato kinasa.

10 El monofosfato de nucleósido 5'-deuterado (Fórmula V), si se desfosforila, producirá nucleósido 5'-deuterado (Fórmula VI) y el monofosfato de nucleósido no deuterado (Fórmula VIII) producirá 2'-C-metiluridina no deuterada (Fórmula IX).



15 Sorprendentemente, se ha descubierto que el deuterio en la posición 5' del nucleósido estabiliza el derivado de nucleósido frente a la desfosforilación al nucleósido 5'-OH, 5'-deuterado no deseado. Esto resulta sorprendente porque el/los átomo(s) de deuterio no se escinde(n) durante la desfosforilación y no se unen(n) a un átomo que se escinda durante la desfosforilación. La divulgación incluye el uso de 5'-deuterio para producir un efecto significativo sobre el metabolismo y eficacia a través de un efecto remoto e inesperadamente importante del isótopo de deuterio secundario. Dicho efecto importante del isótopo de deuterio secundario sobre la desmonofosforilación en la posición 5' no ha sido previamente reportado. Aumentando la estabilidad del 5'-monofosfato del nucleósido frente a la desfosforilación, se puede conseguir un aumento en la reserva del 5'-trifosfato activo del nucleósido, lo que puede dar como resultado una mayor eficacia a una dosificación oral dada o igual eficacia usando una dosis más baja del

20

nucleósido en la clínica. También puede tener un efecto significativo sobre la semivida, y, por lo tanto, sobre la farmacocinética, del fármaco.

Por lo tanto, en otra realización, la presente divulgación incluye un método para tratar a un hospedador afectado con un trastorno que puede ser tratado con un nucleósido o nucleótido, consistiendo la mejora en substituir uno o ambos de los hidrógenos en la posición 5' del nucleósido o nucleótido con un deuterio con al menos un 90% de enriquecimiento por encima del protio (es decir, menos de un 10% de hidrógeno ¹H) (y en otras realizaciones un enriquecimiento del 50, 95, 98 ó 99%). El efecto terapéutico de cualquier nucleótido o nucleósido puede verse aumentado si el metabolito activo es el mono-, di- o trifosfato del nucleósido por deuteración 5' del nucleósido, ya que la deuteración 5' aumenta la reserva del monofosfato de nucleósido. El monofosfato de nucleósido se metaboliza al difosfato y/o trifosfato con la correspondiente nucleósido difosfato kinasa y luego nucleósido trifosfato kinasa. Este método es especialmente útil para nucleósidos que no se monofosforilan fácilmente y, por lo tanto, pierden una actividad substancial cuando se desfosforilan, que no pueden ser fácilmente recuperados por la acción de la nucleósido monofosfato kinasa.

En una realización, el trastorno es una enfermedad vírica. En otra realización, el trastorno es la hepatitis B o C. En aún otra realización, el trastorno es el VIH. En otra realización, el trastorno es una proliferación celular anormal. En aún otra realización, el trastorno es un tumor o cáncer. El derivado nucleosídico usado en este método mejorado puede ser, por ejemplo, un fosforamidato u otro profármaco nucleotídico estabilizado que se metabolice al 5'-monofosfato, o puede ser el propio 5'-monofosfato. En una realización, el derivado nucleosídico contiene un 2'- α -metil, 2'- β -hidroxinucleósido. En aún otra realización, el derivado nucleosídico contiene un 2'- α -metil, 2'- β -fluronucleósido. En realizaciones eventuales, el grupo metilo puede tener uno o más halógenos, por ejemplo, flúor(s).

El trifosfato de nucleósido (NTP) es la especie activa que inhibe la replicación vírica en los hepatocitos y sus niveles y potencia intrínseca conducen la eficacia del tratamiento.

Se proporciona una demostración del aumento en los niveles críticos de trifosfato de nucleósido causado por el uso de deuteración 5' en el Ejemplo 13 que se dará más adelante. En este Ejemplo, se incubaron el compuesto de Fórmula II, así como el correspondiente compuesto no deuterado (Fórmula VII), en hepatocitos frescos durante 24 horas. Los datos muestran que hay más nucleósido desfosforilado (es decir, nucleósido 5'-OH no deseado) en las muestras incubadas con el fosforamidato no deuterado que con el fosforamidato 5'-deuterado. Concretamente, usando 20 μ M de Fórmula II o su contrapartida no deuterada, la Fórmula VII, (placa de 12 pocillos (1 ml) con hepatocitos sembrados a razón de 0,67 millones de células por pocillo durante 24 horas) se obtiene una concentración 1,9 veces (medio, es decir, concentración extracelular) y 2,9 veces (extracto celular, es decir, intracelular) mayor de 2'-metiluridina desfosforilada no deuterada (Fórmula IX) en comparación con la resultante de la forma 5'-deuterada (Fórmula VI). Los resultados de la incubación de 20 μ M de Fórmula II o su contrapartida no deuterada (Fórmula VII) (placa de 6 pocillos (2 ml) con hepatocitos sembrados a razón de 1,7 millones de células por pocillo durante 24 horas) indican una concentración 1,5 veces (extracto celular, es decir, intracelular) y 2,8 veces (extracto celular, es decir intracelular) mayor de 2'-metiluridina desfosforilada no deuterada (Fórmula IX) en comparación con la resultante de la forma 5'-deuterada (Fórmula VI). Por lo tanto, como media, la desfosforilación en los hepatocitos lleva a aproximadamente el doble del 5'-OH-nucleósido producido cuando no se deuterla la posición 5'. Esta diferencia en la reserva de 5'-monofosfato (tal como la Fórmula VIII para la versión no deuterada) disponible para la activación al trifosfato cuando se usa fosforamidato 5'-deuterado puede tener un efecto significativo sobre la eficacia, la dosificación, la toxicidad y/o la farmacocinética del fármaco.

Como comparación con un candidato a ensayo clínico, como se describirá además en el Ejemplo 14 y en la Figura 3, un póster presentado por Alios (EASL 2013) indica que el nivel de trifosfato VX-135 medido en hepatocitos humanos tras 24 horas de incubación con 50 μ M de VX-135 era de 1.174 pmol/millón de células. Por el contrario, el nivel de la Fórmula IV tras 25 horas de incubación de hepatocitos humanos con 5 μ M de Fórmula II, es decir, una concentración diez veces inferior, es de 486 pmol/millón de células. Por lo tanto, la cantidad de trifosfato producido por incubación de la Fórmula II es 4 veces mayor (dosis normalizada) que la cantidad de trifosfato producido por VX-135. Aunque actualmente no se conoce la estructura precisa de VX-135, se trata de un profármaco análogo de nucleótido de uridina inhibidor de NS5B.

Además, tras incubación de la Fórmula II a 50 nM en hepatocitos primarios durante 24 h, el nivel de la Fórmula IV variaba de 9,2 a 16,2 pmol/millón de células. Estas concentraciones son de 5 a 8 veces superiores a las obtenidas cuando se incubaron las células Huh-luc/neo a 50 nM. Como la Fórmula IV es la especie activa que inhibe la replicación de los replicones de VHC en células Huh-luc/neo, la CE₅₀ predicha de la Fórmula II en hepatocitos humanos primarios sería de 6,25-10 nM si el replicón de VHC pudiera crecer en hepatocitos primarios, suponiendo que la relación lineal obtenida en la Figura 4 entre la Fórmula II y la Fórmula IV continúa a concentración menor.

Tal como se detalla en el Ejemplo 14 y en la Figura 5, la semivida de la Fórmula IV es mayor que la semivida del

trifosfato de Sovaldi en hepatocitos de cuatro especies. La mayor semivida se dio en hepatocitos humanos, seguidos de los de perro, luego de los de mono y luego de los de rata. Las semividas varían de 10 a 30 horas para la Fórmula IV y de 8 a 23 horas para el trifosfato de Sovaldi.

5 Además, tal como se describe en el Ejemplo 17 y en las Figuras 6 y 7, a lo largo de un período de 48 horas, mientras que la conversión intracelular al correspondiente trifosfato de Sovaldi (GS-7977) medida en hepatocitos humanos es 2 veces mayor que la del trifosfato derivado de la Fórmula II (es decir, la Fórmula IV), la concentración de la Fórmula IV sigue aumentando a las 48 horas, mientras que la concentración del trifosfato metabolito de Sovaldi disminuye de las 24 a las 48 horas. La concentración creciente de la Fórmula IV, combinada con su semivida de >24
10 h, sugiere acumulación de los niveles de Fórmula IV (el trifosfato de Fórmula II) en los hepatocitos tras dosificación repetida. Esta tendencia, tras una rampa de dosificación inicial *in vivo* hasta llegar a la aclimatación, puede llevar a una mayor concentración en estado estacionario de la Fórmula IV *in vivo* para el trifosfato derivado de la Fórmula II que para el trifosfato de Sovaldi. Además, la potencia intrínseca (el efecto inhibitorio sobre la actividad RdRp de NS5B) de la Fórmula IV (el trifosfato de la Fórmula II) es 1,5 veces mejor que la potencia intrínseca del trifosfato de
15 Solvadi.

La divulgación también incluye un método de tratamiento de una infección por VHC o un trastorno relacionado en un paciente, consistente en proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los compuestos activos aquí descritos, eventualmente en combinación o en alternancia con uno o más de otros principios activos anti-VHC u otras terapias médicas que ofrezcan un beneficio aditivo o sinérgico para el paciente.
20

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una Tabla que muestra la concentración de Fórmula IX (la 2'-metiluridina 5'-OH no deuterada) y de
25 Fórmula VI (2'-metiluridina 5'-deuterada-5'-OH) en medio de hepatocitos humanos y en el extracto celular tras incubación con 20 μM de Fórmula VII o Fórmula II, respectivamente. Concretamente, como se describe en el Ejemplo 13, usando 20 μM de Fórmula II o su contrapartida de Fórmula VII no deuterada (placa de 12 pocillos (1 ml) con hepatocitos sembrados a razón de 0,67 millones de células por pocillo durante 24 horas) se obtiene una concentración 1,9 veces (medio, es decir, concentración extracelular) y 2,9 veces (extracto celular, es decir,
30 intracelular) mayor de 2'-metiluridina desfosforilada no deuterada (Fórmula IX) en comparación con la resultante de la forma 5'-deuterada (Fórmula VI).

La Fig. 2 es una Tabla que muestra la concentración de Fórmula IX (la 2'-metiluridina 5'-OH no deuterada) y de
Fórmula VI (2'-metiluridina 5'-deuterada-5'-OH) en medio de hepatocitos humanos y en el extracto celular tras incubación con 20 μM de Fórmula VII o Fórmula II, respectivamente. Como se describe en el Ejemplo 13, los
35 resultados de la incubación de 20 μM de Fórmula II o su contrapartida de Fórmula VII no deuterada (placa de 6 pocillos (2 ml) con hepatocitos sembrados a razón de 1,7 millones de células por pocillo durante 24 horas) indican una concentración 1,5 veces (extracto celular, es decir, intracelular) y 2,8 veces (extracto celular, es decir, intracelular) mayor de 2'-metiluridina desfosforilada no deuterada (Fórmula IX) en comparación con la resultante de la forma 5'-deuterada (Fórmula VI).

La Fig. 3 es una Tabla que muestra las concentraciones de Fórmula IV (el metabolito de trifosfato deuterado
40 activo de Fórmula II) producidas en hepatocitos humanos (pmol de Fórmula IV/millón de células) a 2, 4, 8, 25 ó 48 horas de incubación con 5 μM de Fórmula II. Se muestran los resultados de tres experimentos, junto con la media y la desviación estándar determinadas para cada punto temporal. Los picos de nivel de Fórmula IV fueron obtenidos a > 48 horas en hepatocitos humanos. Se muestra la concentración de VX-135-TP (el metabolito de trifosfato activo) generada a partir de VX-135 a las 24 horas. Tal como se discute en el Ejemplo 14, los niveles de trifosfato (Fórmula IV) generados a partir de la Fórmula II son 4 veces mayores que los niveles de trifosfato (VX-135-TP) generados a partir de VX-135, lo que sugiere que VX-135 será menos potente que la Fórmula II.

La Fig. 4 es un gráfico de la concentración de Fórmula IV (ng/ml) frente a la concentración de Fórmula II (μM) en
45 hepatocitos humanos. Las concentraciones de Fórmula IV en hepatocitos humanos fueron determinadas tras incubaciones de 24 horas con 0,15, 0,45 y 1,35 μM de Fórmula II.

La Fig. 5 es una Tabla que muestra las semividas del trifosfato activo (Fórmula IV o GS-7977-TP) en hepatocitos
50 humanos, de perro, de mono y de rata. Se añadió Fórmula II o GS-7977 (Sovaldi) a concentraciones seleccionadas a hepatocitos (humanos, de perro, de mono y de rata) y se incubaron a 37°C. Se midieron los extractos celulares del sobrenadante de la Fórmula IV o GS-7977-TP (los metabolitos de trifosfato activos) por cromatografía líquida de alto rendimiento con detección espectrométrica de masas en tándem (LC-MS/MS). Como se discute en el Ejemplo 15, los valores de la semivida del trifosfato variaban entre 8 y 30 horas y la Fórmula IV generalmente tenía una semivida mayor que GS-7977-TP a través de todas las especies estudiadas. (a - Valores entre paréntesis = intervalo de confianza del 95%).

La Fig. 6 es un gráfico de la concentración de Fórmula IV (el metabolito de trifosfato deuterado activo de Fórmula
60 II) producida en hepatocitos humanos (pmol de Fórmula IV/millón de células) durante 48 horas de incubación con 5 μM de Fórmula II. Se midieron las concentraciones en los tiempos indicados y se calculó el ABC con el programa Graphpad Prism 5. Tal como se discute en el Ejemplo 16, se obtuvieron los picos de niveles de la Fórmula IV a > 48 horas en hepatocitos humanos.

La Fig. 7 es un gráfico de la concentración de GS-7977-TP (el metabolito de trifosfato activo de Sovaldi) producida en hepatocitos humanos (pmol de GS-7977-TP/millón de células) durante 48 horas de incubación con 5 μ M de GS-7977 (Sovaldi). Se midieron las concentraciones en los tiempos indicados y se calculó el ABC con el programa Graphpad Prism 5. Tal como se discute en el Ejemplo 16, se obtuvieron los picos de niveles de GS-7977-TP (el metabolito de trifosfato activo de Sovaldi) a las 24 horas en hepatocitos humanos.

Descripción detallada

Descripción química y terminología

Se describen los compuestos usando la nomenclatura estándar. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí empleados tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que esta invención pertenece.

Los términos "un" y "una" no denotan una limitación de cantidad, sino que más bien denotan la presencia de al menos uno de los artículos referenciados. El término "o" significa "y/o". La expresión de conexión no limitada "que comprende" abarca la expresión de conexión intermedia "que consiste esencialmente en" y la expresión limitada "que consiste en". La citación de rangos de valores pretende únicamente servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente que queda dentro del rango, a menos que se indique aquí algo diferente, y cada valor independiente es incorporado a la memoria descriptiva como si fuera citado aquí individualmente. Se incluyen los criterios de valoración de todos los rangos en el rango y son combinables independientemente. Todos los métodos aquí descritos pueden ser llevados a cabo en un orden adecuado, a menos que se indique aquí algo diferente o que el contexto lo contradiga claramente de otro modo. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o el lenguaje ejemplar (v.g., "tal como"), está únicamente destinado a ilustrar y no impone una limitación al alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. No se debe considerar ningún lenguaje en la memoria descriptiva como indicador de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

Los compuestos de Fórmula I incluyen otras fórmulas aquí desveladas dentro del alcance de la Fórmula I. Éstos incluyen, por ejemplo, los compuestos de Fórmula II, IIA, IIB y el compuesto 22.

Los compuestos de Fórmula I incluyen compuestos de la fórmula que tienen sustituciones isotópicas en cualquier posición. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico, pero diferentes números de masa. A modo de ejemplo general, y sin limitación, los isótopos del hidrógeno incluyen tritio y deuterio y los isótopos del carbono incluyen ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C . Los compuestos de Fórmula I también requieren enriquecimiento de deuteración (sustitución de un átomo de hidrógeno con deuterio) en posiciones identificadas.

Un "principio activo" es un compuesto (incluyendo un compuesto aquí desvelado), elemento o mezcla que, cuando se administra a un paciente, solo o en combinación con otro compuesto, elemento o mezcla, confiere, directa o indirectamente, un efecto fisiológico al paciente. El efecto fisiológico indirecto puede producirse a través de un metabolito u otro mecanismo indirecto.

El término "sustituido", tal como se usa aquí, significa que uno cualquiera o más de los hidrógenos sobre el átomo o grupo designado está sustituido con una selección entre el grupo indicado, con la condición de que no se sobrepase la valencia normal del átomo designado.

"Deuteración" y "deuterado" significan que un hidrógeno en la posición especificada está sustituido por deuterio. En cualquier muestra de un compuesto de Fórmula I en el que una posición esté deuterada, es probable que algunas moléculas discretas del compuesto de Fórmula I tengan hidrógeno, más que deuterio, en la posición especificada. Sin embargo, el porcentaje de moléculas del compuesto de Fórmula I en la muestra que tienen deuterio en la posición especificada será mucho mayor de lo que aparecería de manera natural. El deuterio en la posición deuterada se encuentra enriquecido. El término "enriquecido", tal como se usa aquí, se refiere al porcentaje de deuterio frente a otras especies de hidrógeno en esa localización. Como ejemplo, si se dice que una posición en el compuesto de Fórmula I contiene un 50% de enriquecimiento en deuterio, ello significa que más que hidrógeno en la posición especificada el contenido en deuterio es del 50%. Por razones de claridad, se confirma que el término "enriquecido", tal como se utiliza aquí, no significa porcentaje enriquecido por encima de la abundancia natural. En una realización, los compuestos deuterados de Fórmula I tendrán al menos un 10% de enriquecimiento en deuterio en cualquier posición deuterada. En otras realizaciones, habrá al menos un 50%, al menos un 90% o al menos un 95% de enriquecimiento en deuterio en la posición o posiciones deuteradas especificadas. Un "sustituyente deuterado" es un sustituyente en el que al menos un hidrógeno está reemplazado por deuterio en el porcentaje de enriquecimiento especificado. "Eventualmente deuterado" significa que la posición o bien puede ser hidrógeno y la cantidad de deuterio en la posición es sólo el nivel natural de deuterio, o bien la posición está enriquecida con deuterio por encima del nivel natural de deuterio.

Una "forma de dosificación" significa una unidad de administración de un principio activo. Como ejemplos no limitativos de formas de dosificación, se incluyen tabletas, cápsulas, inyecciones, suspensiones, líquidos, fluidos intravenosos, emulsiones, cremas, ungüentos, supositorios, formas inhalables, formas transdérmicas y similares.

5 "Ariolo" indica grupos aromáticos que contienen sólo carbono en el anillo o anillos aromáticos. Los grupos ariolo incluyen, por ejemplo, fenilo y naftilo, incluyendo 1-naftilo y 2-naftilo.

10 "Heteroarilo" indica un anillo aromático monocíclico estable que tiene el número indicado de átomos de anillo y que contiene de 1 a 3, o en algunas realizaciones de 1 a 2, heteroátomos seleccionados entre N, O y S, siendo el resto de los átomos del anillo carbono, o un sistema bicíclico o tricíclico estable que contiene al menos un anillo aromático de 5 a 7 miembros que contiene de 1 a 3, o en algunas realizaciones de 1 a 2, heteroátomos seleccionados entre N, O y S, siendo el resto de los átomos del anillo carbono. Los grupos heteroarilo monocíclicos tienen típicamente de 5 a 7 átomos de anillo. En algunas realizaciones, los grupos heteroarilo bicíclicos son grupos heteroarilo de 9 a 10 miembros. Se prefiere que el número total de átomos de S y O en el grupo heteroarilo no sea mayor de 2. Como ejemplos de grupos heteroarilo, se incluyen tienilo, piridilo, pirimidinilo y pirrolilo.

15 "Heterocicloalquilo" es un grupo de anillo saturado, que tiene 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre N, S y O, siendo el resto de los átomos del anillo carbono. Los grupos heterocicloalquilo monocíclicos tienen típicamente de 4 a 6 átomos de anillo. Como ejemplos de grupos heterocicloalquilo, se incluyen morfolinilo, piperazinilo, piperidinilo y pirrolinilo.

20 Las "composiciones farmacéuticas" son composiciones que incluyen al menos un principio activo, tal como un compuesto o una sal de uno de los compuestos activos aquí desvelados, y al menos otra substancia, tal como un soporte. Las composiciones farmacéuticas eventualmente contienen uno o más principios activos adicionales. 25 "Combinaciones farmacéuticas" o "terapia de combinación" se refiere a la administración de al menos dos principios activos, que pueden ser combinados en una única forma de dosificación o ser proporcionados juntos en formas de dosificación independientes, eventualmente con instrucciones de que los principios activos han de ser usados conjuntamente para tratar un trastorno, tal como la hepatitis C, o un trastorno asociado a la hepatitis C, u otra infección vírica, tal como aquí se describe

30 Las "sales farmacéuticamente aceptables" incluyen derivados de los compuestos desvelados en los que el compuesto parental es modificado haciendo sales de adición de ácido o de base no tóxicas, inorgánicas y orgánicas, del mismo. Las sales de los presentes compuestos pueden ser sintetizadas a partir de un compuesto parental que contenga un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales. En general, dichas sales pueden ser 35 preparadas por reacción de formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, bicarbonato o similar de Na, Ca, Mg o K), o por reacción de formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Dichas reacciones son típicamente llevadas a cabo en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. La sal farmacéuticamente aceptable puede estar en forma de un cristal puro, o en forma polimórfica simple, o puede ser 40 usada en forma no cristalina o amorfa, vidriosa o vítrea, o una mezcla de éstas. En una realización alternativa, el principio activo puede ser aportado en forma de solvato.

45 Como ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables, se incluyen, aunque sin limitación, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos, tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales y las sales de amonio cuaternario del compuesto parental formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, como sales de ácidos no tóxicos convencionales, se incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos, tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y 50 similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos, tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, mesílico, esílico, besílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, HOOC-(CH₂)_n-COOH, donde n es 0-4, y similares. Se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales, v.g., en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., p. 1418 (1985).

55 El término "soporte" aplicado a composiciones/combinaciones farmacéuticas significa un diluyente, excipiente o vehículo con el que se proporciona un compuesto activo.

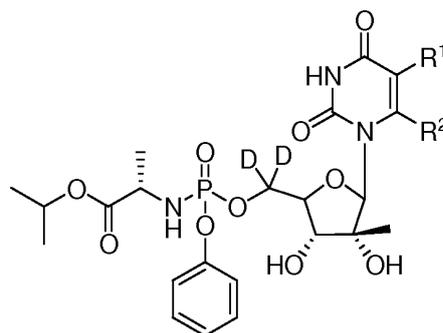
60 Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición/combinación farmacéutica, que es generalmente seguro, que es suficientemente no tóxico y que no es indeseable ni biológicamente ni en ningún otro sentido. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en la presente solicitud, incluye tanto uno como más de uno de dichos excipientes.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una composición/combinación farmacéutica de esta invención significa una cantidad efectiva, cuando se administra a un paciente, para proporcionar un beneficio terapéutico, tal como una mejora de los síntomas, v.g., una cantidad efectiva para reducir los síntomas de una infección con la hepatitis C. Por ejemplo, un paciente infectado con un virus de la hepatitis C puede presentar niveles elevados de ciertas enzimas hepáticas, incluyendo la AST y la ALT. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva es, por lo tanto, una cantidad suficiente para proporcionar una reducción significativa en los niveles elevados de AST y ALT o una cantidad suficiente para proporcionar un retorno de los niveles de AST y ALT al rango normal. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también de manera alternativa una cantidad suficiente para prevenir un aumento significativo o reducir significativamente el nivel detectable de virus o de anticuerpos para el virus en la sangre, el suero o los tejidos del paciente. Un método de determinación de la eficacia de tratamiento incluye la medición de los niveles de ARN del VHC mediante un método convencional para determinar niveles de ARN vírico, tal como el ensayo TaqMan de Roche. En ciertas realizaciones preferidas, el tratamiento reduce los niveles de ARN del VHC por debajo del límite de cuantificación (30 UI/ml, según se mide mediante el ensayo TaqMan(R) de Roche) o más preferiblemente por debajo del límite de detección (10 UI/ml, TaqMan de Roche).

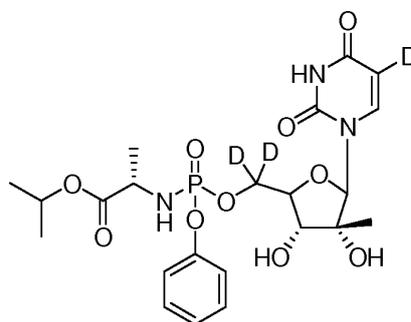
Un "paciente" u "hospedador" es un animal humano o no humano que necesita tratamiento médico. El tratamiento médico puede incluir el tratamiento de una afección existente, tal como una enfermedad o trastorno, el tratamiento profiláctico o preventivo o el tratamiento diagnóstico. A menos que se indique lo contrario, el paciente u hospedador es un paciente humano.

Derivados nucleosídicos altamente activos

Se ha descubierto sorprendentemente que el fosforamidato de uridina 2'-metil-5'-deuterado de Fórmula I, incluyendo la Fórmula II, o la Fórmula IIIA o IIIB, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, donde el deuterio tiene un enriquecimiento por encima del protio de al menos el 90% (es decir, menos de un 10% de hidrógeno ^1H), y donde R^1 y R^2 son independientemente deuterio o hidrógeno, es un inhibidor de NS5B superior para el tratamiento de la hepatitis C, o cualquier otro trastorno aquí desvelado. En una realización, R^1 es deuterio y R^2 es hidrógeno.

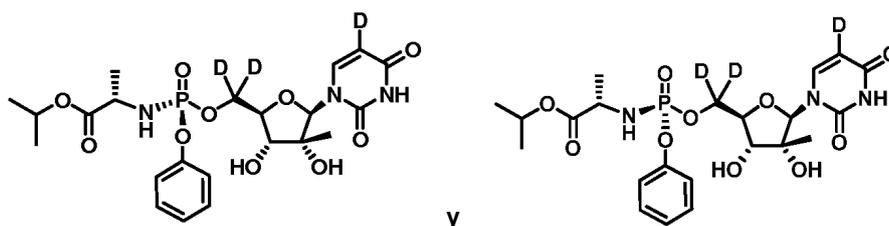


Fórmula I



Fórmula II

La Fórmula II comprende mezclas de estereoisómeros. Por ejemplo, la Fórmula II incluye una mezcla 50/ 50 de estereoisómeros de Fórmula II, donde la mezcla comprende



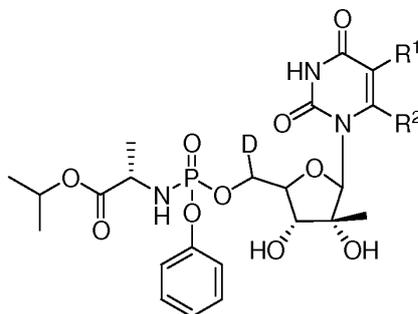
y

Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método para el tratamiento de un hospedador infectado con hepatitis C o un trastorno relacionado tal como se describe aquí, que incluye la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I o II, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable.

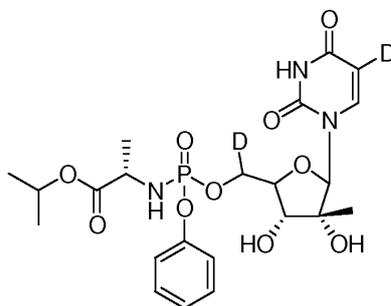
En una realización alternativa, uno o ambos de los 5'-deuterio(s) representan independientemente al menos un 50% de enriquecimiento. En otra realización, el enriquecimiento es independientemente al menos un 75% o 80%. En otra realización, uno o ambos de los 5'-deuterio(s) representan independientemente al menos un 90%, 95% o 98% de enriquecimiento.

En otra realización, el derivado nucleosídico de Fórmula I o II es administrado como un estereoisómero R o S de fósforo, que está al menos en forma 90% pura, y típicamente en forma 95, 98 o 99% pura, o que se administra como una mezcla de estereoisómeros de centros quirales de fósforo, tal como una mezcla 50/50 de estereoisómeros de centros quirales de fósforo, o una mezcla en la que la razón de estereoisómeros R a S en el centro quiral de fósforo es de 10:90 a 90:10 o de 30:70 a 70:30.

En otra realización, se proporciona una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula IIIA o IIIB o de su sal farmacéuticamente aceptable, eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable, a un hospedador que necesite terapia para la hepatitis C, u otra terapia como aquí se desvela.



Fórmula IIIA

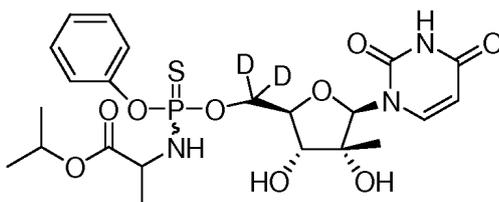


Fórmula IIIB

Sorprendentemente, se ha descubierto que el deuterio en la posición 5' del nucleósido estabiliza el derivado nucleosídico frente a la desfosforilación al nucleósido 5'-OH, 5'-deuterado no deseado. Esto es sorprendente, ya que el/los átomo/s de deuterio no se escinde/n durante la desfosforilación y no se une/n a un átomo que se escinde durante la desfosforilación. Por lo tanto, el 5'-deuterio puede producir un efecto significativo sobre el metabolismo y la eficacia a través de un efecto remoto e inesperadamente importante del isótopo de deuterio secundario. No se ha reportado con anterioridad en la literatura tal efecto importante del isótopo de deuterio secundario sobre la

desmonofosforilación en la posición 5'. Aumentando la estabilidad del 5'-monofosfato del nucleósido frente a la desfosforilación, se consigue un aumento en la reserva de 5'-trifosfato activo del nucleósido, lo que puede dar como resultado una mayor eficacia a una dosificación oral dada o igual eficacia usando una dosis menor del nucleósido. También puede tener un efecto significativo sobre la semivida, y por lo tanto sobre la farmacocinética, del fármaco.

La presente divulgación proporciona una mejora significativa sobre los compuestos desvelados en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense US 2012/0071434; U.S.S.N. 13/36.435), publicada el 22 de marzo de 2012 y concedida a Alios BioPharma, Inc., que describe nucleósidos de fosfortioamido para el tratamiento de enfermedades víricas. Es sabido que la sustitución de oxígeno con azufre en un 5'-fosfato de nucleósido estabiliza el fosfato frente a la nucleotidasa u otra acción hidrolizante, lo que forma la base para el uso de fosfortioatos y otros derivados de tiofosfatos en la química antisentido y de estabilización de aptámeros, que fue desarrollada en los años 80. Véase, en general, entre otras referencias, Pearson, "Characterization of ectonucleotidases on vascular smooth-muscle cells", *Biochem J.* (1985), 230, 503-507. Uno de los compuestos desvelados por Alios es:



Alios 6037

El metabolito de monotiofosfato que resultaría de la escisión del fosfortioamido 6037 *in vivo* se estabilizaría frente a una mayor destrucción enzimática hacia el 5'-hidroxilnucleósido libre debido a la presencia del átomo de azufre no natural estabilizador. Por lo tanto, el efecto estabilizador de la deuteración en la posición 5' queda enmascarado por el azufre. Además, también se sabe que los monotiofosfatos de nucleósido se hidrolizan a monofosfatos de nucleósido mediante la enzima Hint1 (la enzima que también es responsable de la producción de monofosfato de Fórmula V, así como de monotiofosfatos, a partir de sus respectivos profármacos), liberando H₂S, que puede causar efectos fisiológicos y patogénicos (véase Ozga *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 40809).

Una mejora significativa proporcionada por la presente invención es el sorprendente descubrimiento de que la 5'-deuteración usando un fosforamido más natural, es decir, sin azufre, protege al monofosfato de una mayor destrucción al grupo hidroxilo libre de un modo que minimiza la toxicidad e imita más estrechamente a los compuestos naturales. El hecho de que ésta no sea una invención obvia queda dramáticamente resaltado con una revisión de la Publicación Estadounidense 2011/0251152 (U.S.S.N. 13/076.552), concedida a Pharmasset, Inc., la compañía que desarrolló Sovaldi. En la página 16 de la publicación, esta compañía experimentada en nucleósidos describía el uso de deuteración en seis especies diferentes de Sovaldi, pero nunca consideró poner el deuterio en la posición 5', que ahora se determina que es la posición más importante.

Métodos de tratamiento

La divulgación proporciona un método para tratar a un hospedador, típicamente un humano, infectado con hepatitis C, u otro trastorno aquí descrito, con una cantidad efectiva de uno de los derivados nucleosídicos altamente activos de Fórmula I, eventualmente como una sal farmacéuticamente aceptable y eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, se puede usar una cantidad efectiva de uno de los derivados nucleosídicos altamente activos aquí descritos, eventualmente como una sal farmacéuticamente aceptable y eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable para tratar a un hospedador, típicamente un humano, con una afección secundaria asociada a la hepatitis C, incluyendo, aunque sin limitación, los trastornos descritos más adelante en (i) a (viii).

Esta divulgación proporciona métodos de tratamiento de una infección vírica en un paciente, incluyendo una infección por hepatitis C, aportando una cantidad efectiva de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de Fórmula I al paciente infectado con un virus de la hepatitis C. Se puede proporcionar un compuesto o una sal de Fórmula I como único principio activo, o se puede proporcionar junto con uno o más principios activos adicionales.

En ciertas realizaciones, el compuesto o sal de Fórmula I es administrado junto con un inhibidor de proteasa NS3, un inhibidor de NS5A, un inhibidor de NS5B o una combinación de los anteriores.

Una cantidad efectiva de una composición/combinación farmacéutica de la divulgación puede ser una cantidad suficiente para (a) inhibir la progresión de la hepatitis C; (b) causar una regresión de la infección por hepatitis C; o (c) causar una cura de una infección por hepatitis C, de tal forma que ya no se puedan detectar el virus VHC o

anticuerpos para el VHC en la sangre o el plasma de un paciente previamente infectado. Una cantidad de una composición/combinación farmacéutica efectiva para inhibir la progresión o causar una regresión de la hepatitis C incluye una cantidad efectiva para detener el empeoramiento de los síntomas de la hepatitis C o reducir los síntomas experimentados por un paciente infectado con el virus de la hepatitis C. De manera alternativa, una detención de la progresión o regresión de la hepatitis C puede estar indicada por cualquiera de varios marcadores para la enfermedad. Por ejemplo, una falta de aumento o reducción en la carga vírica de la hepatitis C o una falta de aumento o reducción en el número de anticuerpos circulantes para el VHC en la sangre de un paciente son marcadores de una detención de la progresión o regresión de la infección por hepatitis C. Otros marcadores para la enfermedad de la hepatitis C incluyen los niveles de aminotransferasa, en particular los niveles de las enzimas hepáticas AST y ALT. Los niveles normales de AST son de 5 a 40 unidades por litro de suero (la parte líquida de la sangre) y los niveles normales de ALT son de 7 a 56 unidades por litro de suero. Estos niveles estarán típicamente elevados en un paciente infectado con VHC. La regresión de la enfermedad viene normalmente marcada por el retorno de los niveles de AST y ALT al rango normal.

En aún otra realización, se puede usar una cantidad efectiva de uno de los derivados nucleosídicos altamente activos aquí descritos, eventualmente como una sal farmacéuticamente aceptable y eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable, como profilaxis para proteger o prevenir a un hospedador, típicamente un humano, que tiene una infección por hepatitis C, para que no evolucione a una afección secundaria asociada a la hepatitis C. En una realización alternativa, se puede usar una cantidad efectiva de uno de los derivados nucleosídicos altamente activos aquí descritos, eventualmente como una sal farmacéuticamente aceptable, y eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable, para tratar una afección secundaria asociada a la hepatitis C, incluyendo, aunque sin limitación, los trastornos que se describen más adelante en (i) a (viii).

(i) Crioglobulinemia, que es la producción de anticuerpos anormales (llamados crioglobulinas) debido a estimulación de los linfocitos por el virus de la hepatitis C. Estos anticuerpos pueden depositarse en pequeños vasos sanguíneos, causando así inflamación de los vasos (vasculitis) en los tejidos de todo el cuerpo, incluyendo la piel, las articulaciones y los riñones (glomerulonefritis).

(ii) Linfoma no Hodgkin de células B asociado a hepatitis C, que se considera que está causado por una estimulación excesiva de los linfocitos B por el virus de la hepatitis C, que da como resultado una reproducción anormal de los linfocitos.

(iii) Afecciones cutáneas, tales como el liquen plano y la porfiria cutánea tarda, han sido asociadas a la infección por hepatitis C.

(iv) La cirrosis, que es una enfermedad en la cual las células normales del hígado son reemplazadas con tejido cicatricial o anormal. La hepatitis C es una de las causas más comunes de cirrosis hepática.

(v) Ascitis, que es la acumulación de líquido en la cavidad abdominal, comúnmente causada por cirrosis hepática, que puede estar causada por infección por hepatitis C.

(vi) Carcinoma hepatocelular, un 50% de cuyos casos en los EE.UU. están actualmente causados por infección crónica por hepatitis C.

(vii) Ictericia relacionada con la hepatitis C, que es una pigmentación amarillenta causada por un aumento en la bilirrubina.

(viii) A menudo se encuentra trombocitopenia en pacientes con hepatitis C y puede ser el resultado de una inhibición de la médula ósea, una disminución de la producción de trombopoyetina en el hígado y/o un mecanismo autoinmune. En muchos pacientes, a medida que la hepatitis C avanza, el recuento de plaquetas disminuye y aumentan tanto la inhibición vírica de la médula ósea como los anticuerpos antiplaquetas. Otros síntomas y trastornos asociados a la hepatitis C que pueden ser tratados con una cantidad efectiva de una composición/combinación farmacéutica de la divulgación incluyen una función hepática disminuida, fatiga, síntomas de tipo gripe: fiebre, escalofríos, dolores musculares, dolor articular y dolores de cabeza, náusea, aversión a ciertos alimentos, pérdida de peso inexplicable, trastornos psicológicos, incluyendo depresión, y sensibilidad en el abdomen.

Los compuestos activos aquí presentados pueden ser también usados para aumentar la función hepática generalmente asociada a la infección por hepatitis C, por ejemplo, la función de síntesis, incluyendo la síntesis de proteínas, tales como las proteínas del suero (v.g., albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (v.g., alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, glutamil transpeptidasa, etc.), la síntesis de bilirrubina, la síntesis de colesterol y la síntesis de ácidos biliares; una función metabólica hepática, incluyendo el metabolismo de carbohidratos, el metabolismo de aminoácidos y del amoníaco, el metabolismo de hormonas y el metabolismo de lípidos; la detoxificación de fármacos exógenos; y una función hemodinámica, incluyendo la hemodinámica esplácnica y portal.

Las composiciones/combinaciones farmacéuticas aquí desveladas son también útiles para tratar infecciones víricas en pacientes distintas de una infección por hepatitis C. En una realización alternativa, la infección puede ser una infección por virus ARN, tal como una infección por virus Togaviridae, Picornaviridae, Coronaviridae o Flaviviridae. La divulgación incluye un método de tratamiento de una infección por un virus Togaviridae, Picornaviridae,

Coronaviridae o Flaviviridae mediante la administración de una cantidad efectiva de uno de los compuestos activos aquí desvelados a un sujeto infectado con un togavirus, picornavirus, coronavirus o flavivirus. Las infecciones por virus Flaviviridae incluyen infecciones con virus de los géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Las infecciones por *Flavivirus* incluyen la fiebre amarilla, la fiebre del Dengue, el virus del Nilo Occidental, encefalitis, incluyendo la encefalitis de St. Louis, la encefalitis B japonesa, la encefalitis de California, la encefalitis de Europa Central, la encefalitis primaveral-estival rusa y la encefalitis de Murray Valley, la enfermedad de Wesselsbron y la enfermedad de Powassan. Las infecciones por *Pestivirus* incluyen enfermedades primariamente del ganado, incluyendo la fiebre porcina en cerdos, el VDVB (virus de la diarrea vírica bovina) en vacuno e infecciones por el virus de la Enfermedad de la Frontera. Las infecciones por *Hepacivirus* incluyen la Hepatitis C y el *Hepacivirus* canino. Las infecciones por *Togavirus* incluyen el virus de *Sindbis*, el virus de la encefalitis equina oriental, el virus de la encefalitis equina occidental, el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus de Ross River, el virus de O'nyong'nyong, el virus de Chikungunya, el virus del Semliki Forest y el virus *Rubella*. Las infecciones por *Picornavirus* incluyen infecciones con virus de los géneros *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Parechovirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* y *Tremovirus*. Las infecciones por *Coronavirus* incluyen infecciones con virus de los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* (que incluye el coronavirus respiratorio agudo severo (SARS)), *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. La divulgación incluye en particular composiciones que contienen un compuesto de la presente divulgación útiles para tratar la fiebre del Dengue, la fiebre del Nilo occidental, la fiebre amarilla o el VDVB (virus de la diarrea vírica bovina), y métodos de tratamiento de estas infecciones mediante administración del compuesto a un paciente infectado con el virus.

La divulgación también incluye los siguientes métodos de tratamiento: (i) Un método para tratar a un hospedador afectado de hepatitis C, consistente en administrar una cantidad de tratamiento efectiva de un nucleósido o nucleótido que tiene deuterio con un enriquecimiento de al menos el 50% en la posición 5' del nucleósido o nucleótido. (ii) Un método de tratamiento como en el método (i), donde el nucleótido no es un profármaco de tiofosfato o tiosfato. (iii) Un método para el tratamiento de un hospedador afectado de un trastorno que puede ser tratado con una cantidad efectiva de un nucleósido o nucleótido, consistiendo la mejora en administrar el nucleósido o nucleótido como un nucleósido o nucleótido 5'-deuterado. (iv) Un método de tratamiento como en (i), donde el nucleótido no es un profármaco de tiofosfato o tiosfato. (v) Un método de tratamiento como en (i), donde el enriquecimiento es de al menos el 90%. (vi) Un método de tratamiento como en (i), donde hay dos deuterios en la posición 5'. (vii) Un método de tratamiento como en (iii), donde el nucleótido no es un profármaco de tiofosfato o tiosfato. (viii) Un método de tratamiento como en (iii), donde el enriquecimiento es de al menos el 90%. (viii) El método de la reivindicación 23, donde hay dos deuterios en la posición 5'.

35 Terapia de combinación

La presente divulgación también incluye composiciones y combinaciones farmacéuticas que contienen un compuesto activo aquí descrito y al menos un principio activo adicional, así como métodos de tratamiento consistentes en administrar dichas composiciones a un paciente infectado con hepatitis C, u otro trastorno aquí descrito. En ciertas realizaciones, el principio activo adicional es un inhibidor de proteasa NS3 del VHC o un inhibidor de NS5A del VHC u otro inhibidor de NS5B.

En realizaciones no limitativas, el compuesto activo para el VHC de la presente divulgación puede ser administrado en combinación o alternándolo con uno o más de los compuestos activos que son un inhibidor de caspasa, un inhibidor de ciclofilina, un inhibidor de la citocromo P450 monooxigenasa, un inhibidor de la entrada, un glucocorticoide, un inhibidor de las proteasas del VHC, una hematopoyetina, una terapia homeopática, un compuesto inmunomodulador, un inmunosupresor, una interleucina, un interferón o un potenciador de interferón, un inhibidor de IRES, un anticuerpo monoclonal o policlonal, un análogo o profármaco de nucleósido o nucleótido, un inhibidor no nucleosídico, un inhibidor de NS4B, un inhibidor de NS5A, un inhibidor de NS5B, un inhibidor de la proteína P7, un inhibidor de polimerasa, un compuesto ARNi, una vacuna terapéutica, un agonista de TNF, un inhibidor de tubulina, un modulador del receptor de esfingosina-1-fosfato o un agonista de TLR.

Son ejemplos no limitativos de principios activos en estas categorías:

55 Inhibidores de la caspasa: IDN-6556 (Idun Pharmaceuticals).
 Inhibidores de la ciclofilina: por ejemplo, NIM811 (Novartis), SCY-635 (Scynexis) y DEBIO-025 (Debiopharm).
 Inhibidores de la citocromo P450 monooxigenasa: ritonavir, ketoconazol, troleandomicina, 4-metilpirazol, ciclosporina, clometiazol, cimetidina, itraconazol, fluconazol, miconazol, fluvoxamina, fluoxetina, nefazodona, sertralina, indinavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, saquinavir, lopinavir, delavirdina, eritromicina y VX-497 (Merimebodib). Como inhibidores preferidos de CYP, se incluyen ritonavir, ketoconazol, troleandomicina, 4-
 60 metilpirazol, ciclosporina y clometiazol.
 Inhibidores de la entrada: ITX-5061 (iTherX).
 Glucocorticoides: hidrocortisona, cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona,

parametasona, betametasona y dexametasona.

Inhibidores de las proteasas del VHC: por ejemplo, Sovaprevir y ACH-2684. ABT-450 (Abbott), ACL-181 y AVL-192 (Avila), BMS-032 (Bristol Myers Squibb), Boceprevir (Merck), danoprevir (Hoffman-La Roche y Genentech), GS-9256 (Gilead), GS-9451 (Gilead), Telaprevir (VX-950, Vertex), VX-985 (Vertex), Simeprevir (TMC435, Tibotec), Fosamprenavir (profármaco de Amprenavir, Glaxo/Vertex), indinavir (CRXIVAN, Merck), TMC435350 (Tibotec/Medivir), Faldaprevir (BI 201335. Boehringer Ingelheim), PHX-1766 (Phenomix), Vaniprevir (MK-7009, Merck), narlaprevir (SCH900518, Schering), MK-5172 (Merck).

Hematopoyetinas: hematopoyetina-1 y hematopoyetina-2. Otros miembros de la superfamilia de las hematopoyetinas, tales como los diversos factores estimulantes de colonias (v.g.. G-CSF, GM-CSF, M-CSF), Epo y SCF (factor de células madre).

Terapias homeopáticas: Cardo mariano, silimarina, ginseng, glicirrizina, raíz de regaliz, esquisandra, vitamina C, vitamina E, beta caroteno y selenio.

Compuestos inmunomoduladores: talidomida, IL-2, hematopoyetinas, inhibidores de IMPDH, por ejemplo Merimepodib (Vertex Pharmaceuticals Inc.), interferón, incluyendo el interferón natural (tal como OMNIFERON, Viragen y SUMIFERON, Sumitomo, una mezcla de interferones naturales), interferón alfa natural (ALFERON, Hemispherx Biopharma, Inc.), interferón alfa-n1 de células linfoblastoides (WELLFERON, Glaxo Wellcome), alfa interferón oral, Peg-interferón, Peg-interferón alfa 2a (PEGASYS, Roche), interferón alfa 2a recombinante (ROFERON, Roche), interferón alfa 2b inhalado (AERX, Aradigm), Peg-interferón alfa 2b (ALBUFERON, Human Genome Sciences/Novartis, PEGINTRON, Schering), interferón alfa 2b recombinante (INTRON A, Schering), interferón alfa 2b pegilado (PEGINTRON, Schering, VIRAFERONPEG, Schering), interferón beta-1a (REBIF, Ares-Serono, Inc. y Pfizer), interferón alfa consenso (INFERGEN, Intermune), interferón gamma-1b (ACTIMMUNE, Intermune, Inc.), interferón alfa no pegilado, alfa interferón, y sus análogos, y timosina alfa 1 sintética (ZADAXIN, SciClone Pharmaceuticals Inc.), y lambda interferón (BMS).

Inmunosupresores: sirolimus (RAPAMUNE, Wyeth).

Interleucinas: (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12), LIF, TGF-beta, TNF-alfa) y otros factores de bajo peso molecular (v.g., AcSDKP, pEEDCK, hormonas del timo y minicitoquinas).

Potenciadores del interferón: EMZ702 (Transition Therapeutics).

Inhibidores de IRES: VGX-410C (VGX Pharma).

Anticuerpos monoclonales y policlonales: XTL-6865 (HEPX-C, XTL), HuMax-HepC (Genmab), Inmunoglobina para la Hepatitis C (humana) (CIVACIR, Nabi Biopharmceuticals), XTL-002 (XTL), Rituximab (RITUXAN, Genentech/ IDEC), GS-6624 (Gilead).

Análogos de nucleósidos: Sofosbuvir (PSI-7977, Pharmasset y Gilead), PSI-7851 (Pharmasset), PSI-7977 (Pharmasset), R7128 (mericitabina, Roche), R7348 (Roche), NM283 (valopicitabina, Idenix), GS-6620 (Gilead), TMC- 649 (Tibotec), VX-135 (Vertex, Alios), ALS-2200 (Alios), IDX184 (Idenix), IDX21437 (Idenix), IDX21459 (Idenix), Lamivudina (EPIVIR, 3TC, GlaxoSmithKline), MK-0608 (Merck), zalcitabina (HIVID, Roche US Pharmaceuticals), ribavirina (incluyendo COPEGUS (Roche), REBETOL (Schering), VILONA (ICN Pharmaceuticals) y VIRAZOLE (ICN Pharmaceuticals), isatoribina (Anadys Pharmaceuticals), ANA245 (Anadys Pharmaceuticals) y viramidina (ICN), un profármaco de amidina de ribavirina. También se pueden emplear combinaciones de análogos de nucleósidos.

Inhibidores no nucleosídicos: PSI-6130 (Roche/Pharmasset), ABT-333 y ABT-072 (Abbott), delaviridina (RESCRIPTOR, Pfizer), PF-868554 (Pfizer), GSK-852 (GlaxoSmithKline), Setrobuvir (ANA-598, Anadys), VX-222 (Vertex), BI-127 (Boehringer Ingelheim) y BMS-325 (Bristol Meyers).

Inhibidores de NS4B: clemizol (Eiger BioPharmaceuticals, Inc.).

Inhibidores de NS5A: Daclatasvir (BMS-790052, BMS), AZD-729 (Astra Zeneca); PPI-461 (Presidio), PPI-688 (Presidio), samatasvir (IDX719, Idenix), ledipasvir (GS-5885, Gilead), GS-5816 (Gilead), ombitasvir (ABT-267, AbbVie), GSK2336805 (GlaxoSmithKline) y elbasvir (MK-8742, Merck).

Inhibidores de NS5B: MBX-700 (Microbotix/ Merck), RG-9190, VX-222 (Vertex) y BMS-791325 (Bristol Meyers Squibb).

Inhibidor de la proteína P7: amantadina (SYMMETREL, Endo Pharmaceuticals, Inc.).

Inhibidores de polimerasa: ANA598 (Anadys), Tegobuvir (GS 9190, Gilead).

Interferencia con el ARN: SIRNA-034 RNAi (Sima Therapeutics).

Vacunas terapéuticas: IC41 (Intercell), GI 5005 (Globeimmune), Chronvac-C (Tripep/Inovio).

Agonistas del TNF: adalimumab (HUMIRA, Abbott), entanercept (ENBREL, Amgen and Wyeth), infliximab (REMICADE, Centocor, Inc.).

Inhibidores de la tubulina: Colchicina.

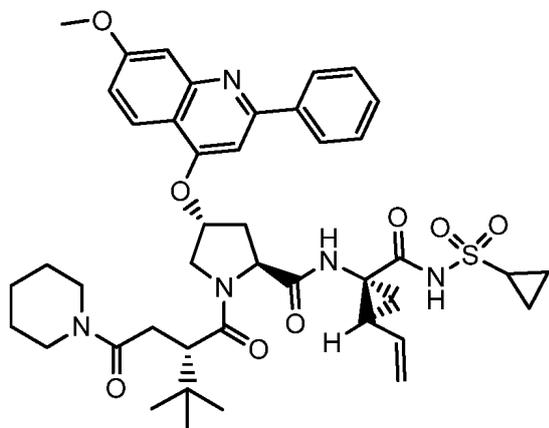
Moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato: FTY720 (Novartis).

Agonistas de TLR: agonista de TLR7 (Anadys Pharmaceuticals), CPG10101 (Coley) y agonistas de TLR9, incluyendo CPG 7909 (Coley).

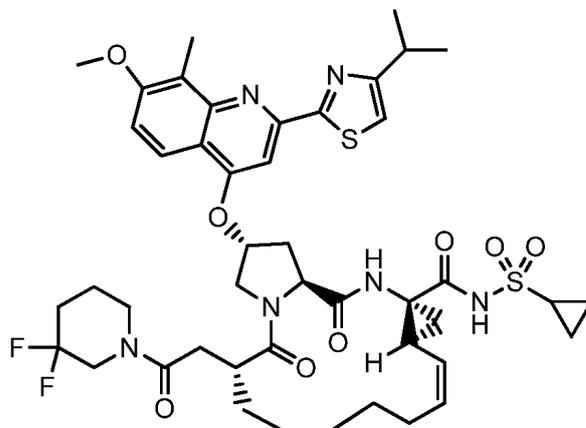
Vacunas: HCV/MF59 (Chiron), IC41 (Intercell).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el principio activo adicional es sovaprevir o ACH-2684 (inhibidores de la proteasa NS3 del VHC) y/o un inhibidor de NS5a.

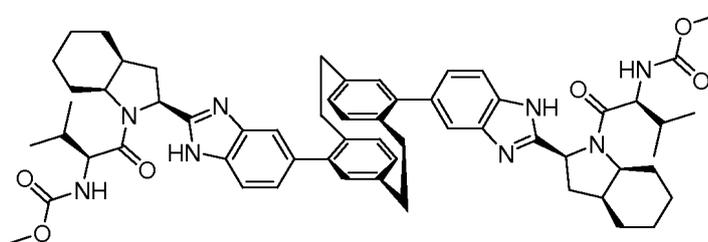
La divulgación incluye composiciones en las cuales el principio activo adicional es



Sovaprevir



ACH-2684



Inhibidor de NS5A

5

10

Se han desvelado previamente inhibidores de la proteasa NS3, útiles en las composiciones y combinaciones farmacéuticas aquí descritas, por ejemplo en la Patente Estadounidense N° 7.906.619, concedida el 15 de marzo de 2011, aquí incorporada como referencia en su totalidad por sus enseñanzas en cuanto a péptidos 4-amino-4-oxobutanoílicos. La patente '619 es particularmente incorporada como referencia en la sección de Ejemplos comenzando en la columna 50 y extendiéndose hasta la columna 85, que desvela compuestos útiles en composiciones/combinaciones con los Compuestos de Fórmula I aquí descritos.

15

La Solicitud de Patente Estadounidense N° 2010-0216725, publicada el 26 de agosto de 2010, es aquí incorporada como referencia en su totalidad por sus enseñanzas en cuanto a péptidos 4-amino-4-oxobutanoílicos. La solicitud '725 es particularmente incorporada como referencia en la sección de Ejemplos comenzando en la página 22 y extendiéndose hasta la página 100, que desvela compuestos útiles en composiciones/combinaciones con los Compuestos de Fórmula I aquí descritos.

20

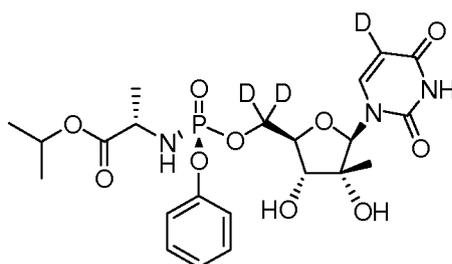
La Solicitud de Patente Estadounidense Publicada N° 2010-0152103, publicada el 17 de junio de 2010, es aquí incorporada como referencia en su totalidad por sus enseñanzas en cuanto a análogos cíclicos de péptidos 4-amino-4-oxobutanoílicos. La solicitud '103 es particularmente incorporada como referencia en la sección de Ejemplos comenzando en la página 19 y extendiéndose hasta la página 60, que desvela compuestos útiles en composiciones/combinaciones con los Compuestos de Fórmula I y II aquí descritos. En particular, los compuestos de Fórmula I y II aquí desvelados pueden ser usados en combinación con un inhibidor de proteasa NS3 de las fórmulas que se muestran a continuación.

25

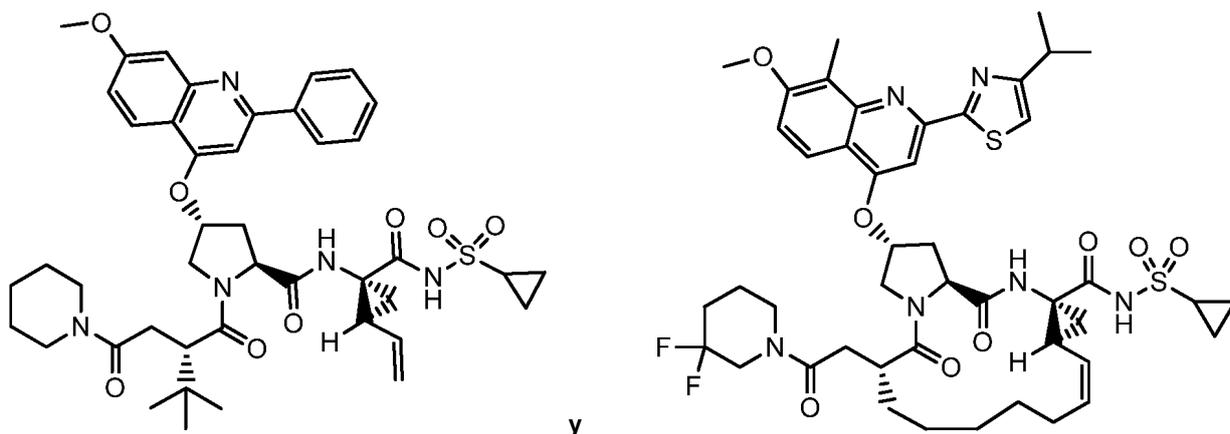
30

Se han desvelado previamente inhibidores de NS5A, útiles en las composiciones y combinaciones farmacéuticas aquí descritas. La Publicación de Patente Estadounidense N° US-2012-0302528, publicada el 29 de noviembre de 2012, es aquí incorporada como referencia en su totalidad por sus enseñanzas en cuanto a inhibidores de NS5A.

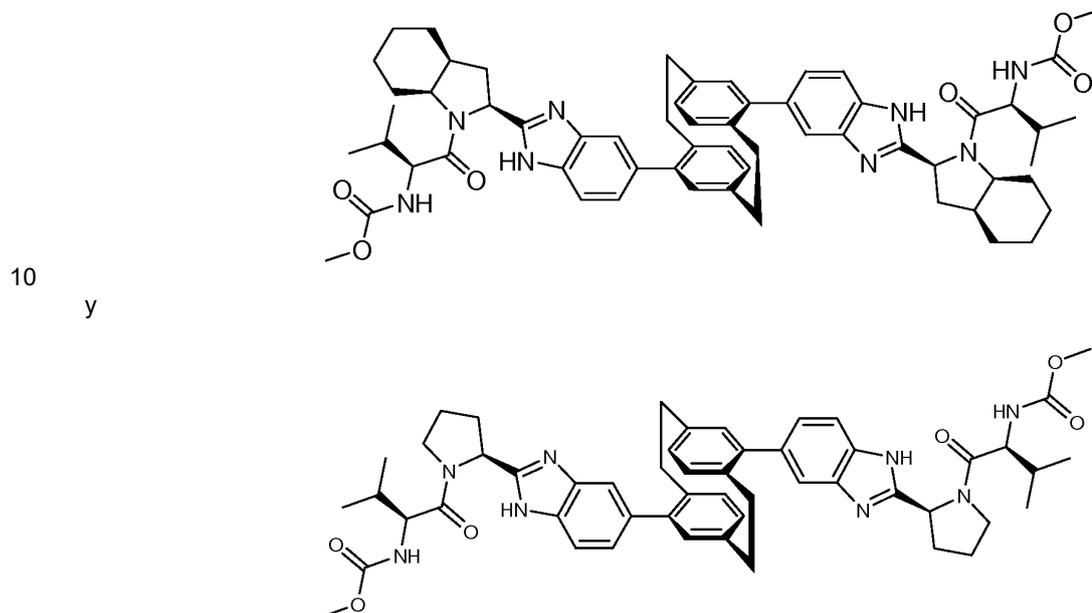
En ciertas realizaciones, el profármaco de nucleósido deuterado es



El inhibidor de proteasa NS3 es seleccionado entre



El inhibidor de NS5A es seleccionado entre



15 Composiciones farmacéuticas

Los compuestos aquí desvelados pueden ser administrados como el compuesto químico neto, pero son preferiblemente administrados como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los compuestos activos aquí descritos, junto con al menos un soporte farmacéuticamente aceptable. La composición/combinación farmacéutica puede contener un compuesto o una sal de cualquiera de los compuestos activos aquí descritos como único principio activo, pero, en otra realización, puede también contener al menos un

principio activo adicional. En ciertas realizaciones, se prefiere que el principio activo adicional sea un inhibidor de proteasa NS3 o un inhibidor de NS5A o NS5B. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación que contiene de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 800 mg, o de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 600 mg de un compuesto de Fórmula I y eventualmente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 800 mg, o de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 600 mg de un principio activo adicional en una forma de dosificación unitaria. En ciertas realizaciones, el compuesto activo es administrado en una forma de dosificación oral, tal como una píldora, tableta o cápsula, en una cantidad efectiva, que puede, en algunas realizaciones, ser de al menos 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ó 400 mg. La composición farmacéutica puede también incluir una razón molar de un compuesto de Fórmula I y un principio activo adicional. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener una razón molar de aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1 o de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 4:1, y el otro principio activo puede ser, por ejemplo, un inhibidor de proteasa NS3, un inhibidor de NS5A u otro inhibidor de NS5B.

Los compuestos aquí desvelados pueden ser administrados por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración oral, tópica, parenteral, por inhalación o spray, sublingual, transdérmica, bucal o transmucosal, por vía rectal, como una solución oftálmica, como una inyección o por otro medio, en formulaciones de unidades de dosificación que contienen soportes farmacéuticamente aceptables convencionales. La composición farmacéutica puede ser formulada como cualquier forma farmacéuticamente útil, v.g., como un aerosol, una crema, un gel, una píldora, una cápsula, una tableta, un jarabe, un parche transdérmico o una solución oftálmica. Algunas formas de dosificación, tales como tabletas y cápsulas, se subdividen en dosis unitarias de un tamaño adecuado que contienen cantidades apropiadas de los componentes activos, v.g., una cantidad efectiva para conseguir el objetivo deseado.

Los soportes incluyen excipientes y diluyentes y deben ser de una pureza suficientemente elevada y de una toxicidad suficientemente baja como para que resulten adecuados para administración al paciente en tratamiento. El soporte puede ser inerte o puede poseer beneficios farmacéuticos por sí mismo. La cantidad de soporte empleada junto con el compuesto es suficiente para proporcionar una cantidad práctica de material para administración por dosis unitaria del compuesto.

Como clases de soportes, se incluyen, aunque sin limitación, ligantes, agentes tamponantes, agentes colorantes, diluyentes, desintegrantes, emulsores, saborizantes, deslizantes, lubricantes, conservantes, estabilizadores, surfactantes, agentes para la formación de tabletas y agentes hidratantes. Algunos soportes pueden ser incluidos en más de una clase; por ejemplo, el aceite vegetal puede ser usado como lubricante en algunas formulaciones y como diluyente en otras. Como ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables, se incluyen azúcares, almidones, celulosas, tragacanto en polvo, malta, gelatina, talco y aceites vegetales. Se pueden incluir principios activos eventuales en una composición farmacéutica, los cuales no interfieran substancialmente con la actividad del compuesto de la presente divulgación.

Las composiciones/combinaciones farmacéuticas pueden ser formuladas para administración oral. Estas composiciones contienen entre un 0,1 y un 99% en peso (% p) de un compuesto de Fórmula I y normalmente al menos aproximadamente un 5% p de un compuesto de fórmula. Algunas realizaciones contienen de aproximadamente un 25% p a aproximadamente un 50% p, o de aproximadamente un 5% p a aproximadamente un 75% p del compuesto de fórmula.

Una cantidad efectiva de una composición/combinación farmacéutica de la divulgación puede ser una cantidad suficiente, por ejemplo, para (a) inhibir la progresión de la hepatitis C; (b) causar una regresión de la infección por hepatitis C; (c) causar una cura de una infección por hepatitis C, de tal forma que ya no se pueden detectar el virus VHC o los anticuerpos para el VHC en la sangre o el plasma de un paciente previamente infectado; o (d) tratar un trastorno asociado al VHC. Una cantidad de una composición/combinación farmacéutica efectiva para inhibir el progreso o causar una regresión de la hepatitis C incluye una cantidad efectiva para detener el empeoramiento de los síntomas de la hepatitis C o reducir los síntomas experimentados por un paciente infectado con el virus de la hepatitis C. De manera alternativa, una detención de la progresión o regresión de la hepatitis C puede venir indicada por cualquiera de varios marcadores para la enfermedad. Por ejemplo, una falta de aumento o reducción en la carga vírica de la hepatitis C o una falta de aumento o reducción en el número de anticuerpos circulantes para el VHC en la sangre de un paciente pueden ser marcadores de una detención en la progresión o regresión de la infección por hepatitis C. Otros marcadores para la enfermedad de la hepatitis C incluyen los niveles de aminotransferasas, en particular los niveles de las enzimas hepáticas AST y ALT. Estos niveles estarán típicamente elevados en un paciente infectado por el VHC. La regresión de la enfermedad está normalmente marcada por el retorno de los niveles de AST y ALT al rango normal.

El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de Fórmula I y al menos un principio activo adicional pueden

ser: (1) coformulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación combinada; (2) administrados alternándolos o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por cualquier otro régimen de terapia de combinación conocido en la técnica. Cuando se administran en terapia de alternancia, los métodos de la divulgación pueden incluir la administración o el suministro del compuesto o la sal de cualquiera de los compuestos activos aquí descritos y un principio activo adicional secuencialmente, *v.g.*, en solución, emulsión, suspensión, tabletas, píldoras o cápsulas separadas, o mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosificación efectiva de cada principio activo secuencialmente, es decir, de manera seriada, mientras que, en la terapia simultánea, se administran dosificaciones efectivas de dos o más principios activos conjuntamente. También se pueden usar diversas secuencias de terapia de combinación intermitente.

La frecuencia de dosificación puede también variar dependiendo del compuesto usado y de la enfermedad particular tratada. Sin embargo, para el tratamiento de la mayoría de los trastornos infecciosos, se prefiere un régimen de dosificación de 4 veces al día o menos, y se prefiere en particular un régimen de dosificación de 1 ó 2 veces al día.

Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la severidad de la enfermedad particular en el paciente sometido a terapia.

El envase farmacéutico puede incluir un compuesto activo o una sal como aquí se describe en un recipiente, junto con instrucciones para usar el compuesto para tratar a un paciente que sufre de infección por hepatitis C.

También se incluyen aquí composiciones/combinaciones farmacéuticas envasadas. Dichas combinaciones envasadas incluyen cualquiera de los compuestos activos aquí descritos en un recipiente junto con instrucciones para usar la combinación para el tratamiento o la prevención de una infección vírica, tal como una infección por hepatitis C, en un paciente.

La composición/combinación farmacéutica envasada puede incluir uno o más principios activos adicionales. En ciertas realizaciones, el principio activo adicional es un inhibidor de proteasa NS3, un inhibidor de NS5A u otro inhibidor de NS5B.

La combinación farmacéutica envasada puede incluir un compuesto activo aquí descrito o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto activo aquí descrito y el principio activo adicional proporcionado simultáneamente en una única forma de dosificación, concomitantemente en formas de dosificación separadas o provistos en formas de dosificación separadas para administración separada por alguna cantidad de tiempo que está dentro del tiempo en el que tanto el compuesto activo aquí descrito como el principio activo adicional están en el torrente sanguíneo del paciente.

La combinación farmacéutica envasada puede incluir un compuesto activo aquí descrito o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto activo aquí descrito provistos en un recipiente con un agente activo adicional provisto en el mismo recipiente o en uno separado, con instrucciones para usar la combinación para tratar una infección por VHC en un paciente.

45 **Abreviaturas**

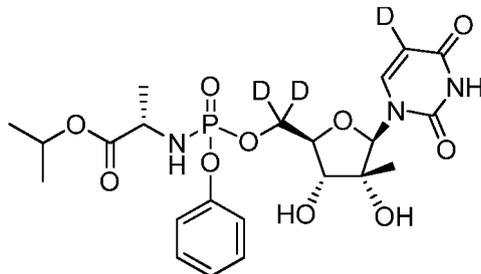
Se usan las siguientes abreviaturas en el proceso químico y en los ejemplos.

50	Ac ₂ O	Anhídrido acético
	AcOD	Ácido acético, deuterado
	Ac.	acuoso
	BuOH	Butanol
	DCM	Diclorometano
	EtOAc	Acetato de etilo
55	IBX	ácido 2-yodoxibenzoico
	MeOH	Metanol
	MTBE	Metil terc-butil éter
	PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
	PDC	Dicromato de piridinio
60	TEA	Trietilamina
	THF	Tetrahidrofurano
	^t BuMgCl	Cloruro de terc-butilmagnesio

Preparación de derivados de nucleósido altamente activos

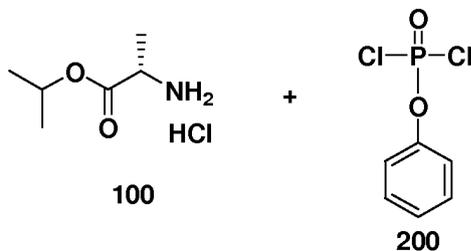
Se facilitan procedimientos para la preparación de los compuestos activos aquí desvelados. Como ejemplo, se puede preparar el compuesto de Fórmula II mediante las etapas

5

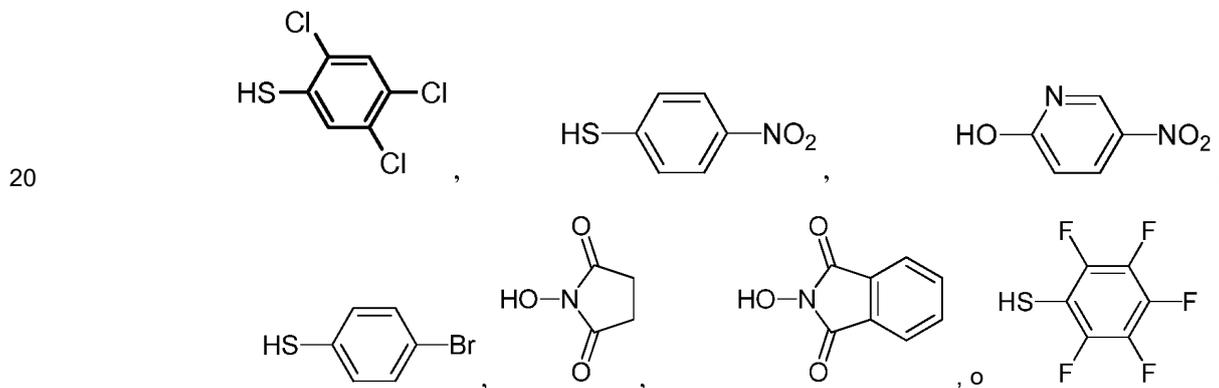


consistentes en:

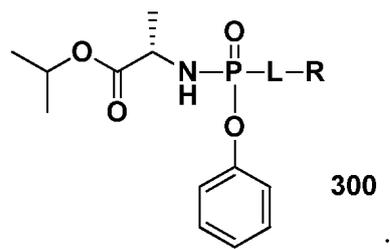
- 10 (i) la reacción de un aminoéster (100), donde el aminoéster es éster isopropílico de L-alanina, con un diclorofosfato (200), donde el diclorofosfato es fenoxidiclorofosfato, para formar una mezcla de reacción;



- 15 (ii) la adición a la mezcla de reacción de (i) un arilhidroxilo o arilsulfhidrilo, R-LH, donde L es S u O, y R es un grupo arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo eventualmente sustituido, tal como fenilo, pirrol, piridilo, piridinilo o indol, o de manera alternativa R-LH puede ser una N-hidroxiimida, tal como N-hidroxisuccinimida o N-hidroxi-ftalimida, y en ciertas realizaciones R-LH es

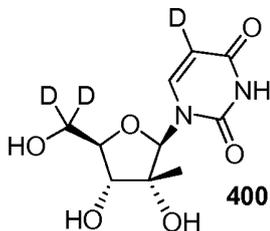


25 para formar un intermediario (300)



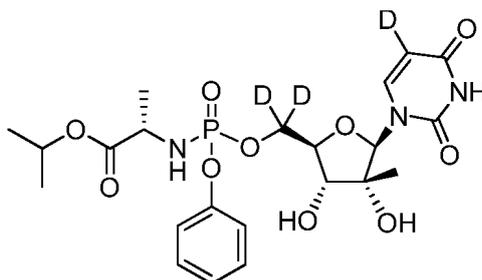
y

(iii) reacción del intermediario (300) con un nucleósido (400)



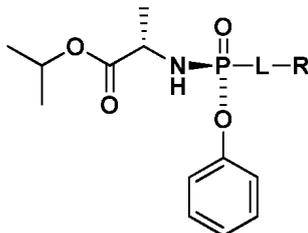
5

para formar



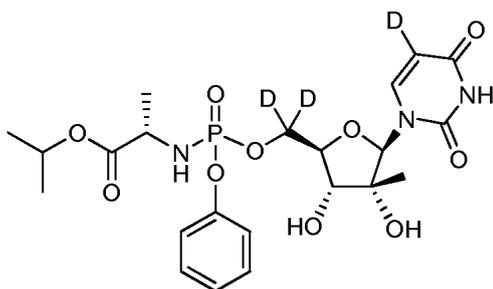
10

En ciertas realizaciones, el intermediario (300) tiene la siguiente estereoquímica



15

y se produce un producto de Fórmula IIA.



(Fórmula IIA)

20

En ciertas realizaciones, el aminoéster (100) y el diclorofosfato (200) se combinan a una temperatura inferior a -20°C, más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente -40°C a aproximadamente -60°C.

25

En ciertas realizaciones, se añade trietilamina u otra base a la mezcla del aminoéster (100) y el diclorofosfato (200). En ciertas realizaciones, la adición se produce en un solvente orgánico, tal como diclorometano, u otro solvente orgánico, tal como 2-metiltetrahidrofurano o tetrahidrofurano.

Se añade arilhidroxilo o arilsulfhidrido a la mezcla de reacción formada por la combinación de aminoéster (100) y diclorofosfato (200). En ciertas realizaciones, el arilhidroxilo o arilsulfhidrido es triclorotiofenol, pero también puede ser substituido por otros grupos, tales como nitrotiofenol, bromotiofenol, N-hidroxisuccinamida, N-hidroxiftalimida y nitrohidroxipiridina. En ciertas realizaciones, el arilhidroxilo o arilsulfhidrido es añadido como una solución en

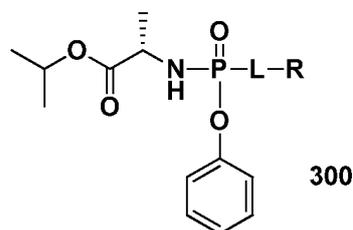
diclorometano u otro solvente orgánico, tal como 1-propanol, 2-metiltetrahidrofurano o tetrahidrofurano. En ciertas realizaciones, la solución que contiene el arilhidroxilo o arilsulfhidrilo también contiene trietilamina u otra base. Después de añadir el arilhidroxilo o arilsulfhidrilo a la mezcla de reacción formada por la combinación de aminoéster (100) y diclorofosfato (200), se puede calentar la solución resultante hasta una temperatura superior a 0°C, superior a 15°C y preferiblemente hasta de aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C, y se puede agitar a esta temperatura durante un período de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 30 horas y más preferiblemente de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 20 horas o aproximadamente 15 horas.

La mezcla de reacción formada por la adición de arilhidroxilo o arilsulfhidrilo a aminoéster (100) y diclorofosfato (200) puede ser extraída con agua, que está eventualmente saturada con sal, tal como bicarbonato de sodio o sulfato de amonio. Se puede purificar el intermediario bruto (300) obtenido secando la fracción orgánica por cromatografía en columna, recristalización u otro método de purificación adecuado. Se puede obtener el isómero deseado del intermediario (300) disolviendo el intermediario, preferiblemente tras purificación, en acetato de etilo/heptano u otra mezcla de otros solventes no polares/apróticos polares, tal como una mezcla de heptano, ciclohexano, benceno (solventes no polares) y THF, DMF o DCM (solventes apróticos polares), y sembrando la solución con una pequeña cantidad del isómero deseado del intermediario (300). (Esta cantidad de semilla de (300) puede haber sido obtenida por otro método).

Se puede suspender el nucleósido (400) en un solvente, preferiblemente un solvente aprótico no polar, tal como THF, DCM o DMF. Se puede enfriar la suspensión de nucleósido (400) en solvente por debajo de 0°C, preferiblemente por debajo de -10°C a aproximadamente -40°C y preferiblemente hasta aproximadamente -20°C. Obsérvese que el nucleósido 400 está marcado como Fórmula VI o como compuesto 9 en algún otro lugar en la memoria descriptiva. Por razones de conveniencia, se usan de 100 a 400 en esta discusión del método sintético.

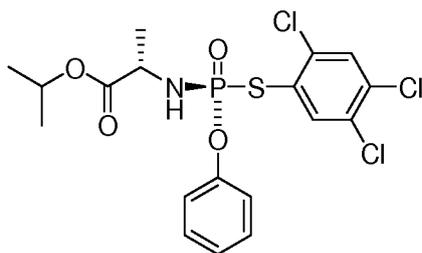
Se puede añadir la suspensión de nucleósido (400) en solvente a una base, tal como un reactivo de Grignard, por ejemplo terc-butil MgCl, u otro haluro alquilmetálico, a una temperatura inferior a 0°C, preferiblemente inferior a -10°C a aproximadamente -40°C y preferiblemente hasta aproximadamente -20°C. Se calienta la mezcla de reacción de nucleósido (400) en solvente y base hasta por encima de 0°C, y preferiblemente hasta de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, y se agita durante aproximadamente 1 a aproximadamente 5 horas, o durante preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 horas. La mezcla de reacción puede ser entonces enfriada de nuevo a menos de 0°C, preferiblemente a menos de -5°C hasta aproximadamente -20°C y preferiblemente hasta aproximadamente -10°C. Se añade el intermediario (300), que puede eventualmente ser ópticamente puro, a la mezcla de reacción que contiene el nucleósido (400). Se calienta la mezcla de reacción de intermediario (300) y nucleósido (400) hasta más de 0°C, y preferiblemente hasta de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, y se agita durante al menos 5 horas, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 horas, o preferiblemente durante aproximadamente 15 horas. Se puede enfriar la reacción hasta aproximadamente 0°C y detenerla con cloruro de amonio o un ácido, tal como HCl u otro ácido capaz de procurar un pH de aproximadamente 1 a 3 o preferiblemente de aproximadamente 2. Se puede purificar luego el producto resultante, un compuesto de Fórmula I, por extracción de la fase orgánica, cromatografía en columna, HPLC, cristalización o cualquier otro método de purificación adecuado.

Además de un método de preparación de un compuesto de la presente divulgación, la divulgación también proporciona intermediarios (300) útiles para preparar un compuesto de Fórmula I:

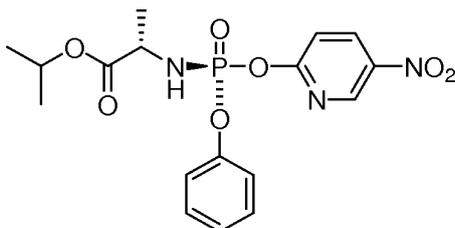


donde -L-R ha sido definido anteriormente.

En ciertas realizaciones, el intermediario es



En otras realizaciones, el intermediario es

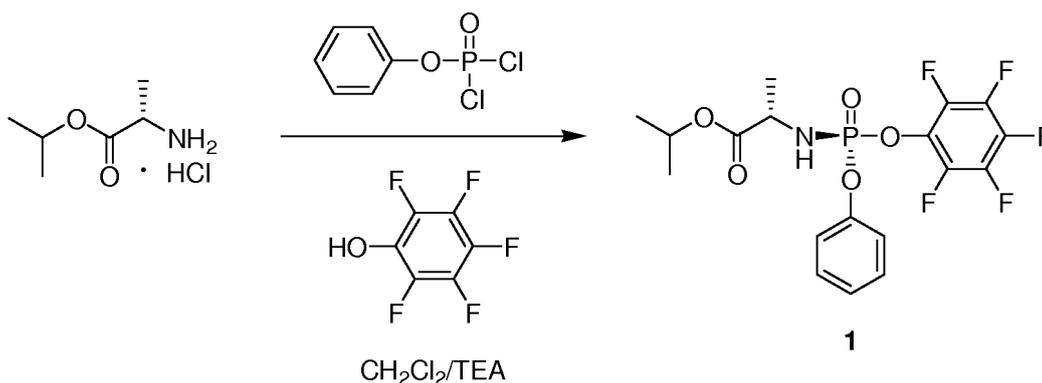


5

Ejemplos

Ejemplo 1. 2-(((S)-(Perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Compuesto 1).

10



15

20

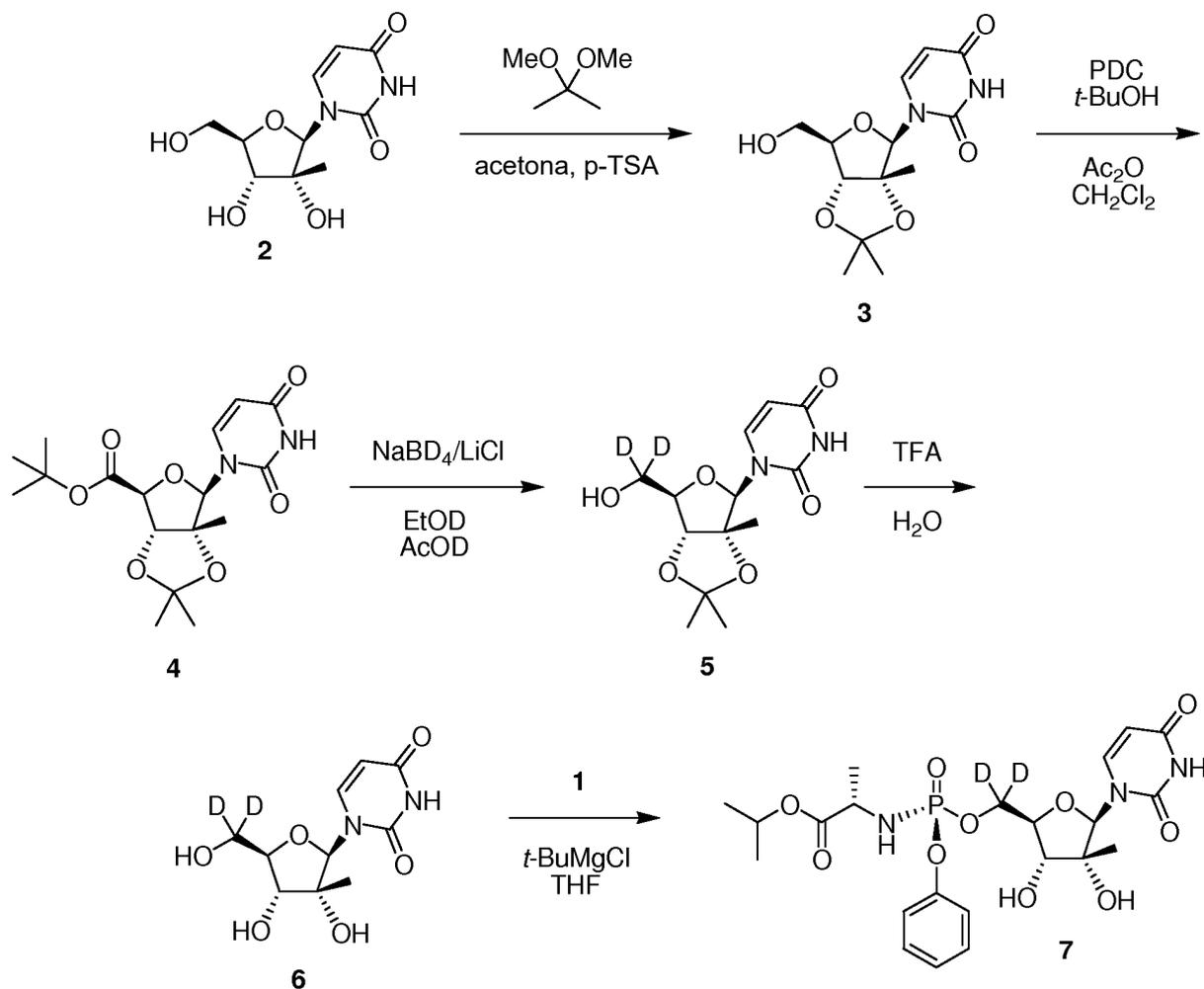
25

Se carga la sal HCl del éster isopropílico de L-alanina (160 g) en un matraz de cuatro bocas de 5 l equipado con agitador mecánico, termómetro y embudo de adición. Se añade al matraz diclorometano (1 l) y se enfría la suspensión hasta -70°C , seguido de adición de trietilamina (200 g, 276 ml) a lo largo de 45 min. Se añade a la mezcla una solución de diclorofosfato de fenilo (200 g) en diclorometano (1 l) a lo largo de 2,5 h. Se agita la mezcla de reacción a esta temperatura durante 90 min. más y se deja luego calentar hasta 0°C a lo largo de un período de 2 h y se agita durante 2 h a 0°C . Se añaden a la mezcla una solución de 2,3,4,5,6-pentafluorofenol (174,4 g) en 400 ml de diclorometano y una solución de trietilamina (105,4 g) en 200 ml de diclorometano gota a gota simultáneamente a lo largo de un período de 1,2 h. Se calienta la mezcla hasta la temperatura ambiente y se agita durante la noche. Se filtra la sal HCl sólida de trietilamina y se lava la torta con diclorometano (3×150 ml). Se concentra el filtrado a presión reducida y se tritura el residuo con MTBE (3,0 l). Se retira el sólido blanco por filtración. Se lava la torta con MTBE (3×150 ml). Se concentra el filtrado y se tritura el sólido bruto resultante con acetato de etilo al 20% en hexano (2,0 l). Se recoge el sólido por filtración y se lava con NaHCO_3 al 10% hasta que la fase acuosa alcanza un pH de 7, se lava entonces el sólido con agua y se seca en un horno de vacío (55°C) durante 28 h. Se mezcla el sólido seco con 500 ml de heptano-EtOAc (5:1) y se agita durante 1 h. Se recoge el sólido por filtración y se lava con heptano-EtOAc (5:1, 2×80 ml), para dar $>99\%$ de un único isómero. Se seca el sólido para obtener el compuesto 1.

30

En un procedimiento alternativo de trabajo, se filtra la mezcla de reacción y se lava la capa de DCM con una solución ac. 0,1 N de NaOH, seguido de agua, se seca y se evapora a sequedad. Se suspende el residuo en heptano/EtOAc (5:1) y se filtra el sólido. Se resuspende el sólido en heptano/tolueno (85:15), para aislar el isómero único puro.

Ejemplo 2. Preparación de 2-(((R)-(((2S,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)dideuterometoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Compuesto 7)



5 Se añade 2,2-dimetilpropano (140 ml) a 2'-C-metiluridina 2 (100 g) en acetona (700 ml). Se enfría la mezcla
 10 resultante en un baño de hielo durante 30 min., se añade luego ácido *p*-toluensulfónico (11 g) y se agita la mezcla de
 15 reacción a temperatura ambiente durante 24 h. Tras completarse la reacción (monitoreada por HPLC), se enfría la
 mezcla de reacción en un baño de hielo durante 30 min. y se neutraliza usando carbonato de potasio frío (12 g en 13
 ml de agua, pH 7-8). Se elimina el solvente a presión reducida a sequedad. Se añade THF (~500 ml) al residuo y se
 eliminan los sólidos por filtración. Se coevapora el filtrado con gel de sílice y se purifica por cromatografía en gel de
 sílice (5-15% de MeOH en CHCl₃), para obtener el compuesto 3. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ 1,22 (s,
 3H), 1,34 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 3,63 (dd, *J* = 12,0 Hz, 2,8 Hz, 1H), 3,69 (dd, *J* = 12,0 Hz, 3,1 Hz, 1H), 4,15 (m, 1H),
 4,47 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 5,25 (s ancho, 1H), 5,63 (dd, *J* = 8,2 Hz, 2,3 Hz), 6,01 (s, 1H), 7,85 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H),
 11,37 (s, 1H); LC-MS: 299 amu (*M* + 1).

Se prepara el compuesto 4 siguiendo el procedimiento descrito por Corey *et al.* (J. Org. Chem. 1984, 49, 4735) con
 las modificaciones que se describen a continuación. Se añade a acetónido 3 (50 g) en CH₂Cl₂ (1 l) PDC (126,1 g) a
 20 temperatura ambiente, seguido de Ac₂O (171 g) y *t*-BuOH (248 g). Se mantiene la temperatura de la reacción por
 debajo de 35°C durante la adición de los reactivos y se agita después a temperatura ambiente durante 5 h. Se vierte
 la mezcla de reacción en K₂CO₃ ac. (250 g en 600 ml de H₂O) y se lava la capa orgánica con CuSO₄ (100 g en 1 l de
 H₂O). Se añaden carbón activado (10 g) y gel de sílice (100 g) a la capa orgánica y se agita durante 30 min. y se
 filtra. Se evapora el filtrado y se purifica el residuo por cromatografía en gel de sílice (0-50% de EtOAc en CHCl₃),
 25 para obtener 4. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ 1,25 (s, 3H), 1,41 (s, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,48 (s, 3H), 3,31 (s,
 1H), 4,61 (s, 1H), 4,79 (s, 1H), 5,70 (dd, *J* = 8,1 Hz, 2,0 Hz, 1H), 5,93 (s ancho, 1H), 7,97 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 11,41
 (s, 1H); LC-MS: 369 amu (*M* + 1).

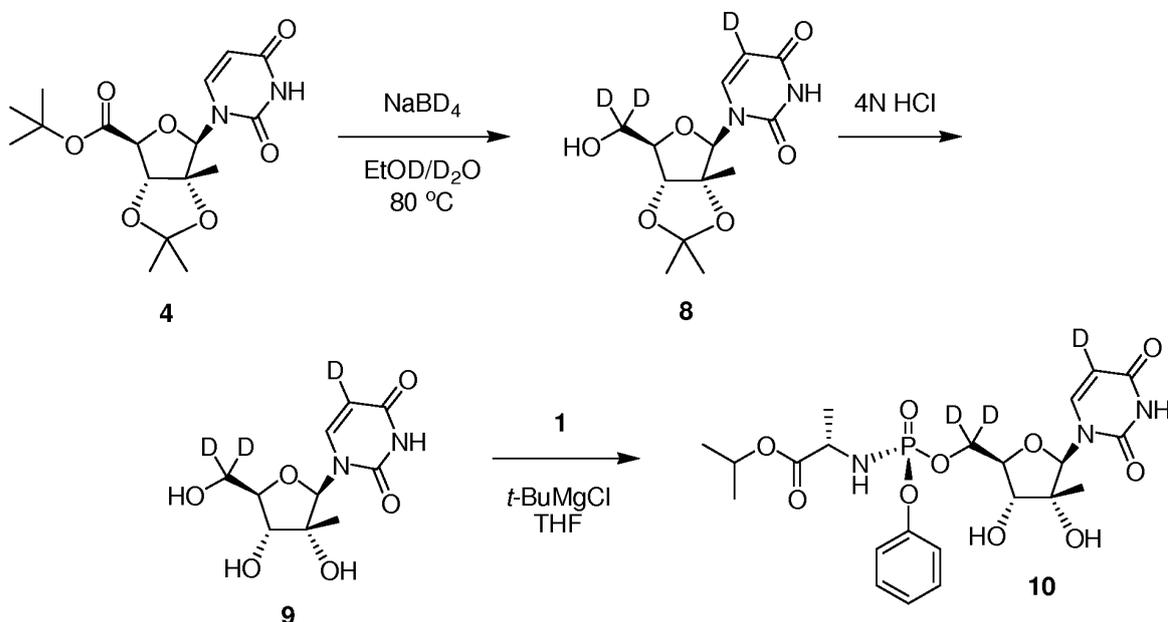
Se agitó cloruro de litio (1,76 g) con NaBD₄ (1,58 g) en EtOD durante 1 h. Se añadió el compuesto 4 (2,97 g) a esta

solución y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se detuvo con ácido acético-*d*, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con solución salina acuosa saturada y se evaporó a sequedad. Se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice, para obtener el compuesto 5 5'-dideuterado.

5 Se trató el compuesto 5 (2,1 g) con ácido trifluoroacético en presencia de agua, para obtener el nucleósido 6 5'-dideuterado. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,16 (s, 3H), 3,84 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 5,67 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 8,14 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 20,2, 73,4, 80,0, 83,8, 93,2, 102,3, 142,5, 152,5, 166,0 (C-5' de la ribosa no observado).

10 Se convirtió el compuesto 6 (1,0 g) en el derivado fosforamido 7 siguiendo el procedimiento descrito por Ross *et al.* (J. Org. Chem. 2011, 76, 8311). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 1,21 (2 \times d, $J = 6,3$ Hz, 6H), 1,35 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 0,9$ Hz, 3H), 3,79 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (dc, $J_{\text{H,P}} = 10,0$ Hz, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 9,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 2,2$ Hz, 1H), 4,96 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 5,60 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,37 (m, 2H), 7,67 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 3,8; LC-MS: 530 amu ($M + 1$).

15 **Ejemplo 3. Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(5-deutero-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)dideuterometoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Fórmula IIA, Compuesto 10).**



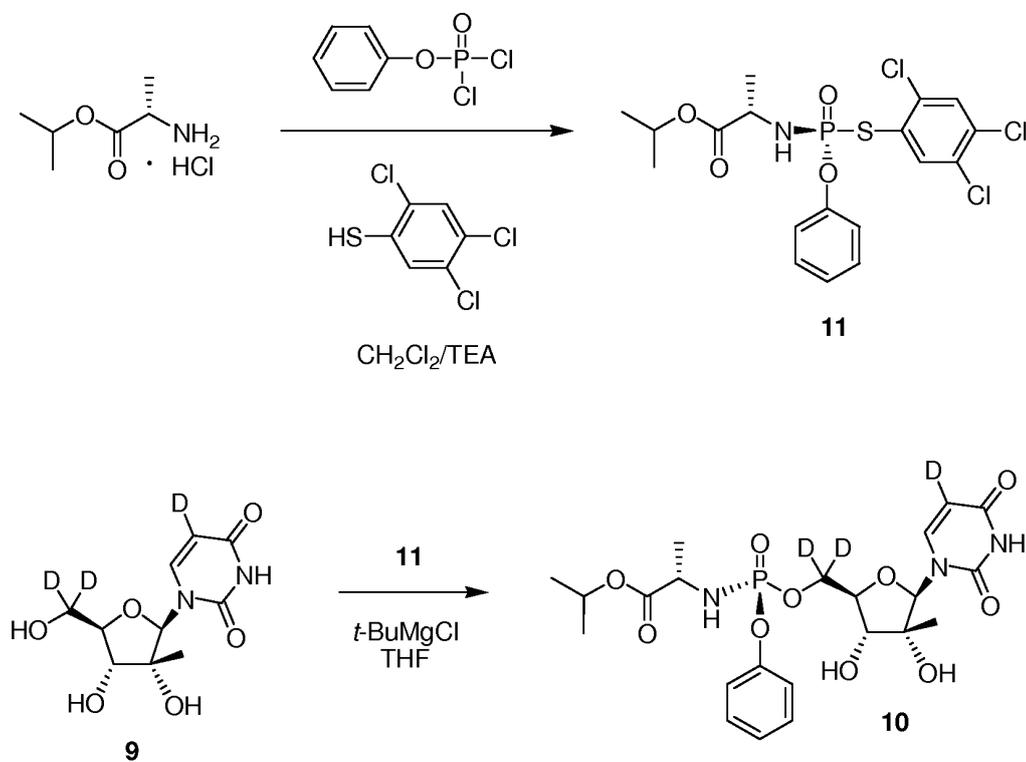
20 Se añade NaBD_4 (7,96 g) en porciones a una mezcla 70:30 v/v enfriada (5°C) de EtOD/ D_2O (350 ml, 99% D) en un matraz de 1 l, seguido de adición de éster de acetónido 4 (35 g) en porciones (burbujea lentamente). Se agita la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 3 h y se calienta luego a 80°C durante 1 d (el análisis espectroscópico de ^1H RMN indica >85% de incorporación de deuterio en la posición 5-uracilo). Se filtra la mezcla de reacción para eliminar los sólidos y se concentra a presión reducida para eliminar el EtOD. Se añade D_2O adicional y se recalienta la mezcla resultante a 95°C para aumentar la incorporación de deuterio en la posición 5 hasta >98% (incorporación de D monitorizada por espectroscopia de ^1H RMN). Tras completarse la reacción, se elimina la mitad del solvente a presión reducida, se enfría la mezcla en un baño de hielo, se añade AcOD (59 g) y se agita la mezcla resultante durante 15-20 min. Se añaden EtOAc (300 ml) y solución salina acuosa saturada (100 ml), se separa la capa orgánica y se vuelve a extraer la capa ac. con EtOAc (150 ml), seguido de THF (150 ml). Se concentran las capas orgánicas combinadas, se disuelve el residuo resultante en MeOH al 10% y CHCl_3 (300 ml), se filtra, se concentra y se purifica por cromatografía en gel de sílice (ISCO, eluyente DCM/MeOH), para obtener el acetónido 8 deuterado. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 300 K): δ 1,22 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 3,31 (s, 2H), 4,14 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 5,21 (s, 1H), 6,01 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 11,36 (s, 1H); LC-MS: 302 amu ($M + 1$).

40 Se añade el acetónido 8 deuterado (50 g) a una solución enfriada (5°C) de HCl 4 N (250 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 3 h, tiempo durante el cual se forma un precipitado blanco. Se evapora el solvente a sequedad y se añade agua (100 ml) al residuo y se agita. Se enfría la suspensión hasta 5°C , se agita durante 1 h y se recoge el precipitado blanco por filtración. Se lava el sólido con agua fría (75 ml) y se seca, para obtener el nucleósido 9 deuterado. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 3,84 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 5,96

(s, 1H), 8,14 (s, 1H); ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 20,2, 73,4, 80,0, 83,8, 93,2, 142,4, 152,5, 166,0 (C-5' de la ribosa y C-5 del uracilo no observados); LC-MS: 262 amu ($M + 1$).

5 Se enfría el nucleósido 9 (37,3 g) en THF (750 ml) hasta -5°C . Se añade *t*-BuMgCl (1 M en THF, 430 ml) y se agita la mezcla durante 30 min. a la misma temperatura. Se agita la mezcla de reacción durante otros 30 minutos a temperatura ambiente, se enfría luego de nuevo hasta -5°C y se añade una solución de 1 (129,5 g) en THF (650 ml) lentamente. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, se enfría hasta -5°C y se le añade HCl 2 N frío (200 ml), seguido de agitación durante 10 min. y de la adición de una solución ac. saturada de NaHCO_3 (~250 ml, pH ~8) y NaCl sólido (50 g). Se agita la mezcla resultante durante 1 h y se separa la capa orgánica. Se extrae la capa ac. con THF (2×150 ml). Se combinan todas las capas orgánicas y se evaporan a sequedad. Se purifica el residuo parcialmente sobre una columna corta de gel de sílice (500 ml) (10-20% de MeOH en CHCl_3) y se purifica después adicionalmente por cromatografía en gel de sílice (ISCO, 4 x cartucho 300 g, eluyendo con 0-10% de MeOH en CH_2Cl_2), para obtener el compuesto del título 10. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 1,21 (2 x d, $J = 6,3$ Hz, 6H), 1,35 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 0,9$ Hz, 3H), 3,79 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (dc, $J_{\text{H,P}} = 10,0$ Hz, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 9,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 2,3$ Hz, 1H), 4,96 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,37 (m, 2H), 7,67 (s, 1H); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 3,8; LC-MS: 531 amu ($M + 1$).

Ejemplo 4. Preparación alternativa de la Fórmula IIA (Compuesto 10)



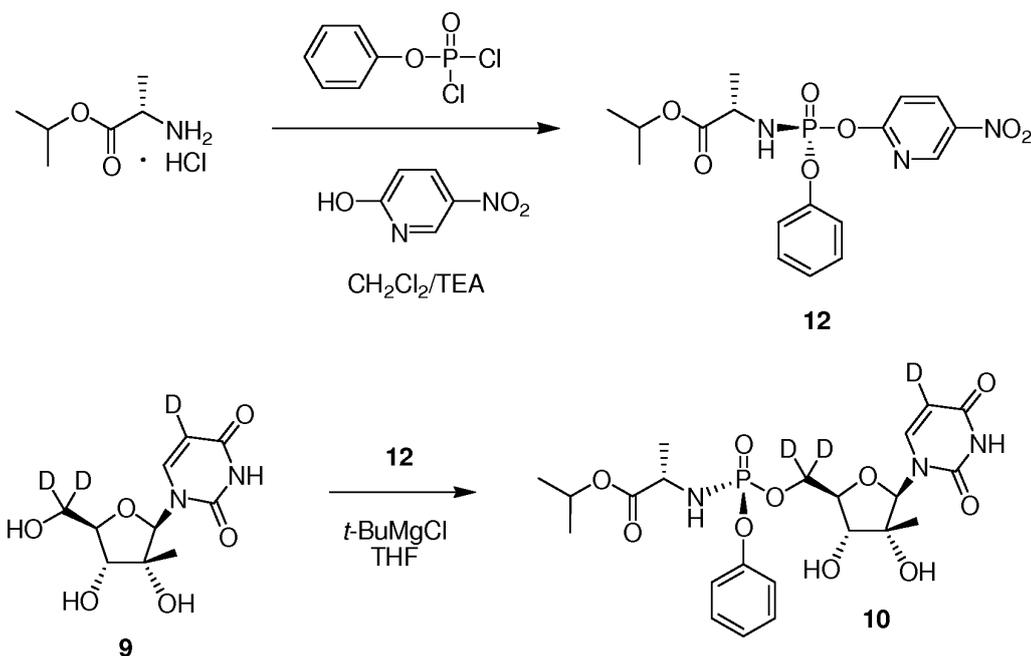
20 Se añade fenoxiclorofosfato (12,58 g) a una solución fría (-50°C) de éster isopropílico de L-alanina en CH_2Cl_2 (100 ml), seguido de adición de trietilamina (18,3 ml) en CH_2Cl_2 (36 ml) mantenida a una temperatura inferior a -40°C . Se calienta la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente lentamente y se agita durante 2 h y se enfría de nuevo hasta -50°C . Se añade una solución de 2,4,5-triclorotiofenol (12,74 g) en CH_2Cl_2 (20 ml) que contiene trietilamina (9,1 ml). Se calienta la reacción hasta la temperatura ambiente y se agita durante 15 h. Se lava la mezcla de reacción con agua (~300 ml), seguido de NaHCO_3 ac. saturado (~300 ml). Se separa la capa orgánica, se seca sobre Na_2SO_4 y se evapora a sequedad a presión reducida. Se pasa el material bruto a través de una columna corta de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ de 0:1 v/v a ~1:4 v/v) y se recoge el producto tras evaporación del solvente. Se disuelve el producto en 100 ml de EtOAc al 2,5% en heptano y se siembra la solución con compuesto 11 (~10 mg) y se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Se recoge el precipitado por filtración, se lava con una pequeña cantidad de la anterior mezcla solvente de EtOAc/heptano y se seca, para obtener 11 como un único isómero. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 1,24 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,26 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,41 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 3,99-4,21 (m, 2H), 5,02 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 7,17-7,24 (m, 3H), 7,34 (m, 2H), 7,52 (s, 1H), 7,73 (d, $J_{\text{H,P}} = 2,2$ Hz, 1H); ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 21,1.

Se enfría una suspensión de 9 (1,0 g) en THF hasta -20°C y se añade *t*-BuMgCl (11,6 ml, 1 M en THF) lentamente, manteniendo la temperatura de la mezcla por debajo de -20°C . Se calienta la mezcla de reacción lentamente hasta la temperatura ambiente (~ 2 h), se agita durante 2 h y se enfría después hasta -10°C . Se añade el compuesto 11 (3,74 g) y se calienta la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agita. Después de 15 h, se enfría la mezcla de reacción hasta 0°C , se añade HCl ac. 2 N (hasta pH ~ 2) y se agita la solución durante 30 min. a 0°C . Se añade NaHCO_3 acuoso (hasta pH ~ 8), seguido de NaCl (~ 3 g), y se agita la mezcla durante 30 min. Se separa la capa orgánica, se seca y se evapora a presión reducida. Se purifica el material bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (5% de MeOH en CH_2Cl_2), para obtener 10 puro.

- 5
- 10 Después de aislar el compuesto 11 por filtración, se puede concentrar el filtrado, que está enriquecido en el otro estereoisómero en el fósforo, y purificarlo por técnicas cromatográficas. Se trata este estereoisómero de 11 con nucleósido 9 para obtener el compuesto 31 descrito en el Ejemplo 12.

Ejemplo 5. Preparación alternativa de la Fórmula II (Compuesto 10)

15

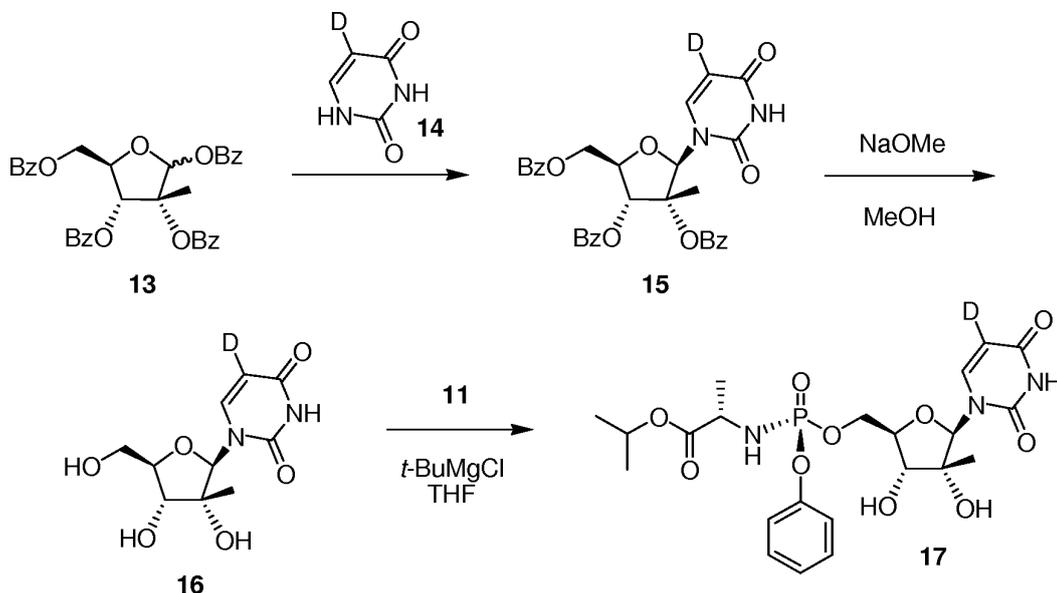


Se prepara el compuesto 12 de un modo análogo al descrito anteriormente en el Ejemplo 4 para el compuesto 11. Datos espectroscópicos para 12: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 1,19 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,22 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,39 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 4,25-4,38 (m, 2H), 4,96 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 7,10 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,19 (m, 1H), 7,25 (m, 2H), 7,34 (m, 2H), 8,50 (dd, $J = 9,0$ Hz, $J = 2,9$ Hz, 1H), 9,15 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H); ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ -3,4.

- 20
- 25 Se trata el nucleósido 9 con el compuesto 12 de un modo análogo al descrito en el Ejemplo 3, para obtener el compuesto 10.

Se puede preparar el compuesto 31 descrito en el Ejemplo 12 usando el otro estereoisómero del compuesto 12 de un modo análogo al descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 6. Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(5-deutero-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Compuesto 17).



5

10

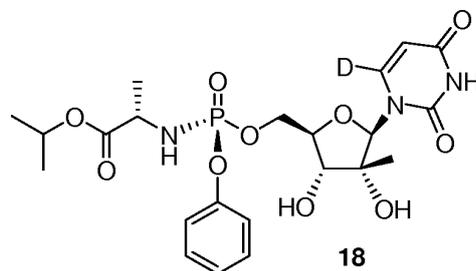
Se trató 1,2,3,5-tetra-O-benzoil-2-C-metil- β -D-ribofuranosa 13 (2,44 g) con uracil-5- d_1 14 (1,0 g), siguiendo el procedimiento descrito en Harry-O'kuru *et al.* (J. Org. Chem. 1997, 62, 1754) usando uracilo no deuterado, para obtener el nucleósido protegido 15. Se trató el compuesto 15 con NaOMe en MeOH, para obtener 2'-C-metiluridina-5- d_1 (16). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,16 (s, 3H), 3,78 (dd, $J = 12,5$ Hz, 2,6 Hz, 1H), 3,84 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,92 (d de app t, $J = 9,2$ Hz, 2,4 Hz, 1H), 3,98 (dd, $J = 12,5$ Hz, 2,2 Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 8,14 (s, 1H); ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 20,2, 60,5, 73,4, 80,0, 83,9, 93,1, 142,4, 152,5, 166,0 (C-5 del uracilo no observado).

15

Se convirtió el compuesto 16 (0,7 g) en el derivado fosforamidato 17 de un modo análogo al descrito en el Ejemplo 3. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 1,21 ($2 \times$ d, $J = 6,3$ Hz, 6H), 1,35 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 0,9$ Hz, 3H), 3,79 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (dc, $J_{\text{H,P}} = 10,0$ Hz, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,08 (m, 1H), 4,37 (ddd, $J = 11,8$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 5,9$ Hz, $J = 3,7$ Hz, 1H), 4,50 (ddd, $J = 11,8$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 5,9$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 1H), 4,96 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,37 (m, 2H), 7,67 (s, 1H); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 3,8; LC-MS: 529 amu ($M + 1$).

20

Ejemplo 7. Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-deutero-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Compuesto 18).

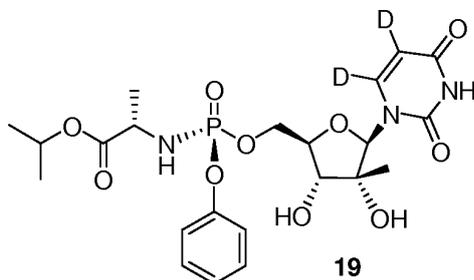


25

30

Se preparó el compuesto 18 usando uracil-6- d_1 de un modo análogo al descrito para el compuesto 17 en el Ejemplo 6. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 1,21 ($2 \times$ d, $J = 6,3$ Hz, 6H), 1,35 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 0,9$ Hz, 3H), 3,79 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (dc, $J_{\text{H,P}} = 10,0$ Hz, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,09 (m, 1H), 4,37 (ddd, $J = 11,8$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 5,9$ Hz, $J = 3,7$ Hz, 1H), 4,50 (ddd, $J = 11,8$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 5,9$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 1H), 4,96 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 5,60 (s, 1H), 5,96 (s, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,37 (m, 2H); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 3,8; LC-MS: 529 amu ($M + 1$).

Ejemplo 8. Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(5,6-dideutero-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Compuesto 19)

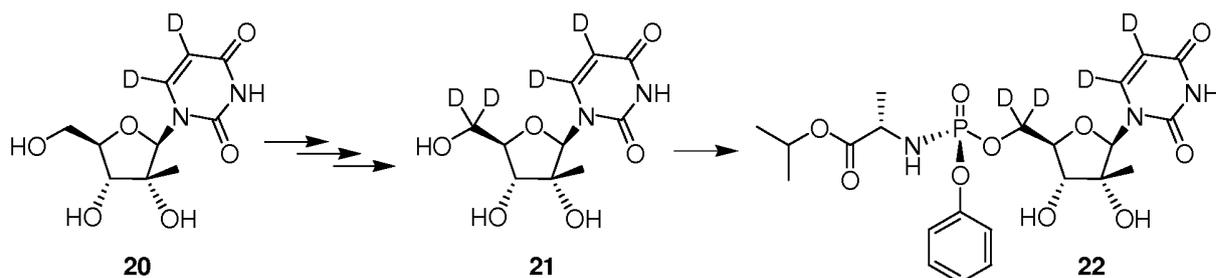


5

Se preparó el compuesto 19 usando uracil-5,6- d_2 de un modo análogo al descrito para el compuesto 17 en el Ejemplo 6. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 1,21 ($2 \times$ d, $J = 6,3$ Hz, 6H), 1,35 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 0,9$ Hz, 3H), 3,79 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (dc, $J_{\text{H,P}} = 10,0$ Hz, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,09 (m, 1H), 4,37 (ddd, $J = 11,8$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 5,9$ Hz, $J = 3,7$ Hz, 1H), 4,50 (ddd, $J = 11,8$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 5,9$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 1H), 4,96 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 5,96 (s, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,37 (m, 2H); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 3,8; LC-MS: 530 amu ($M + 1$).

Ejemplo 9. Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(5,6-dideutero-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)dideuterometoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Fórmula I, Compuesto 22).

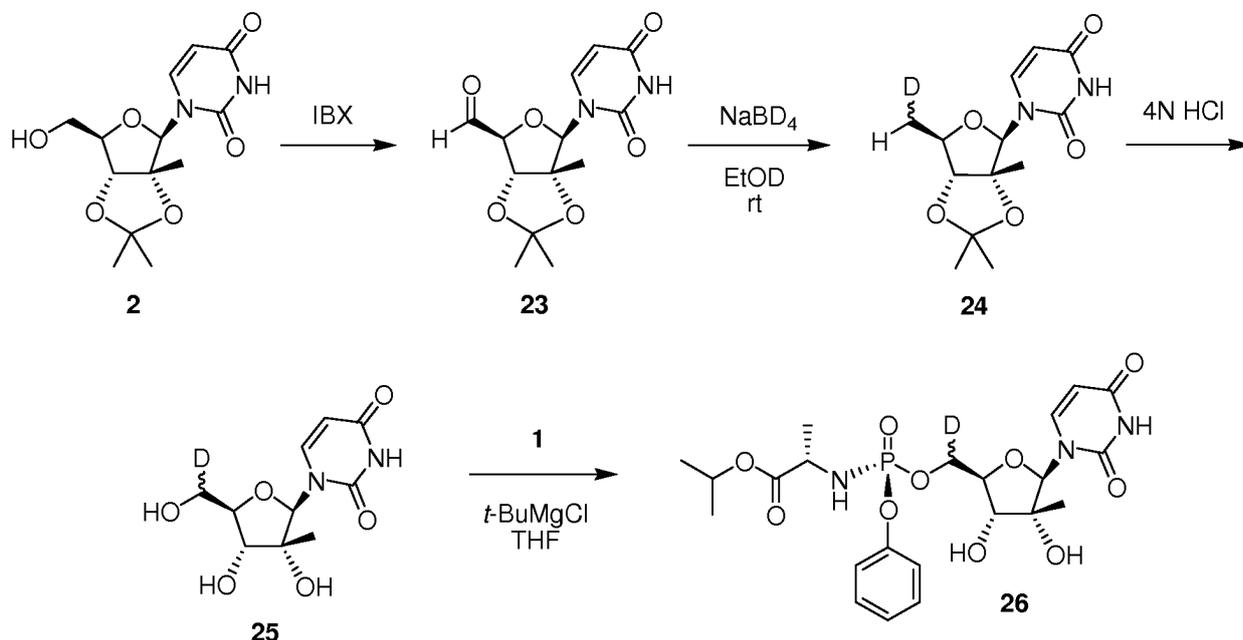
15



Se preparó el nucleósido 20 mediante uracil-5,6- d_2 de un modo análogo al descrito para el compuesto 16 en el Ejemplo 6. Se convirtió el nucleósido 20 en el nucleósido deuterado 21 de un modo análogo al descrito para el compuesto 8 en los Ejemplos 2 y 3. Datos espectroscópicos para 21: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 3,84 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 5,95 (s, 1H); ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 20,2, 73,4, 80,0, 83,8, 93,1, 152,5, 166,0 (el C-5' de la ribosa, el C-5 del uracilo y el C-6 del uracilo no fueron observados). Se convirtió el nucleósido 21 en el derivado fosforamidata 22 de un modo análogo al descrito en el Ejemplo 3. Datos espectroscópicos para 22: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 1,21 ($2 \times$ d, $J = 6,3$ Hz, 6H), 1,35 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 0,9$ Hz, 3H), 3,79 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,91 (dc, $J_{\text{H,P}} = 10,0$ Hz, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 9,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 2,2$ Hz, 1H), 4,96 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 5,95 (s, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,37 (m, 2H); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 3,8; LC-MS: 532 amu ($M + 1$).

30

Ejemplo 10. Preparación de 2-(((S)-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)deuterometoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Fórmula III, Compuesto 26).



5

Se lava ácido 2-yodooxibenzoico comercial (IBX, 3,54 g) consecutivamente con acetonitrilo (2×30 ml), acetona (2×20 ml) y Et₂O (10 ml) y se seca después a conciencia a vacío antes de su uso. Se somete a refluxo una mezcla de 2 (0,894 g) e IBX lavado (2,52 g) en acetonitrilo anhidro (90 ml) durante 2 h. Se enfría la mezcla y se filtra para eliminar los sólidos. Se concentra el filtrado y se trata con CH₂Cl₂. Se eliminan los sólidos de nuevo por filtración y se concentra el filtrado a presión reducida, para obtener 23 como una espuma incolora.

10

Se disuelve el compuesto 23 (1,19 g) en EtOD (15 ml) y se añade a esta solución turbia NaBD₄ (0,168 g) en porciones a 0°C con agitación. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h y se enfría después hasta 0°C antes de añadir una solución ac. saturada de NH₄Cl (1 ml) para detener la reacción. Se añade solución salina acuosa saturada (30 ml) y se extrae la mezcla con EtOAc (5×30 ml). Se secan los extractos orgánicos combinados sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se evaporan a sequedad a presión reducida. Se purifica el material bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (10% de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente), para obtener 24.

15

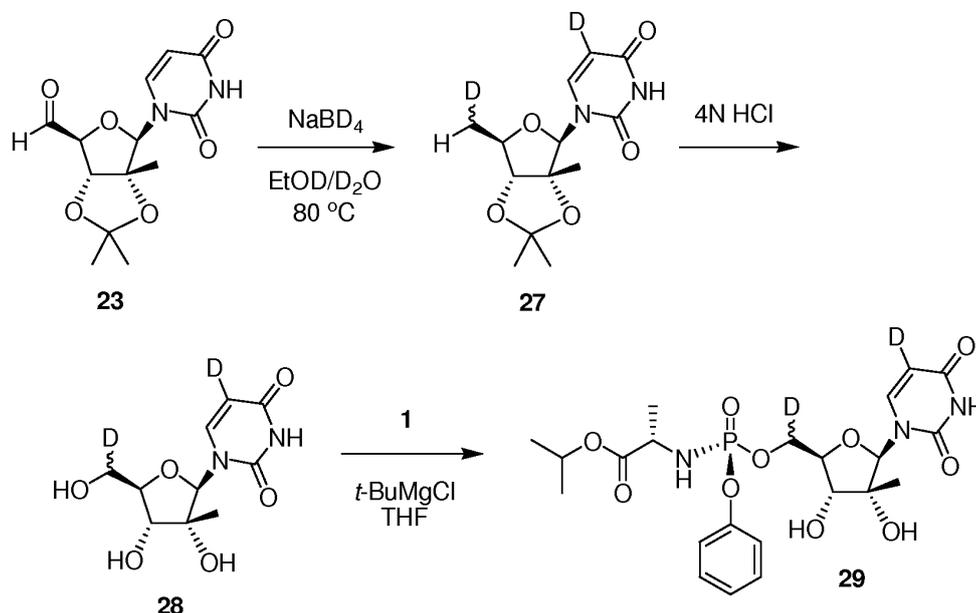
20

Se prepara el compuesto 25 de un modo análogo al descrito para el compuesto 8 en los Ejemplos 2 y 3. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, 300 K): δ 1,16 (s, 6H), 3,76 (d ancho, 2,6 Hz, 1H), 3,84 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H), 3,92 (d de d, *J* = 9,2 Hz, 2,4 Hz, 2H), 3,96 (d ancho, *J* = 2,2 Hz, 1H), 5,67 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 5,96 (s, 2H), 8,14 (2 × d, *J* = 8,1 Hz, 2H); ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, 300 K): δ 20,2, 60,2 (t, *J*_{H,D} = 21,3 Hz), 73,4, 80,0, 83,8, 93,1, 102,3, 142,5, 152,5, 166,0.

25

Se prepara el fosforamidato 26 de un modo análogo al descrito para el compuesto 10 en el Ejemplo 3.

Ejemplo 11. Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(5-deutero-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)deuterometoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Fórmula III, Compuesto 29).



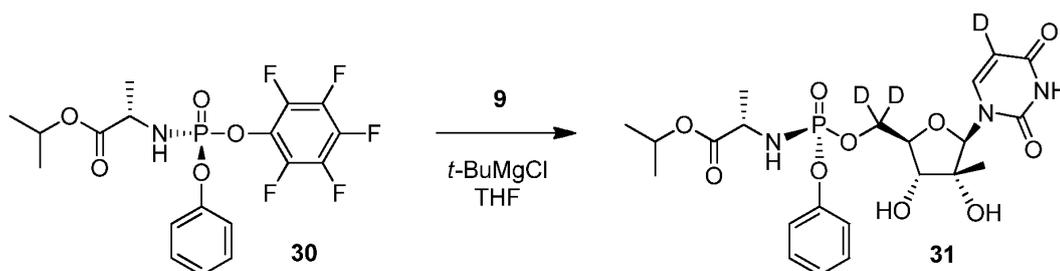
5

Se preparan los compuestos 27, 28 y 29 usando métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 3. Datos espectroscópicos para 29: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,16 (s, 6H), 3,76 (d ancho, 2,6 Hz, 1H), 3,84 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 3,92 (d de d, $J = 9,2$ Hz, 2,4 Hz, 2H), 3,96 (d ancho, $J = 2,2$ Hz, 1H), 5,96 (s, 2H), 8,14 ($2 \times$ s, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 20,2, 60,2 (t, $J_{\text{H,D}} = 21,4$ Hz), 73,4, 80,0, 83,8, 93,1, 142,4, 152,5, 166,0 (C-5 del uracilo no observado).

10

Ejemplo 12. Preparación de 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(5-deutero-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)dideuterometoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (S)-isopropilo (Compuesto 31).

15



20

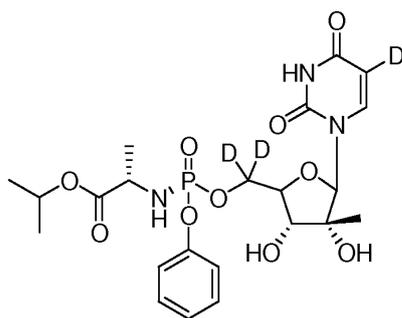
Se concentran los lavados combinados de MTBE y EtOAc/hexanos de la síntesis del compuesto 1 en el Ejemplo 1 a presión reducida, para obtener una mezcla de 30 y 1. Se trata el nucleósido 9 con esta mezcla de un modo análogo al descrito en el Ejemplo 3, para obtener los derivados fosoramidato 31 y 10. Se aísla 31 puro por HPLC preparatoria. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 1,15 (s, 3H), 1,24 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,25 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,34 (dd, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 1,0$ Hz, 3H), 3,80 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,92(dc, $J_{\text{H,P}} = 9,0$ Hz, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,12 (dd, $J = 9,2$ Hz, $J_{\text{H,P}} = 2,7$ Hz, 1H), 5,00 (septeto, $J = 6,3$ Hz, 1H), 5,99 (s, 1H), 7,22 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,72 (s, 1H); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD , 300 K): δ 3,9; LC-MS: 531 amu ($M + 1$).

25

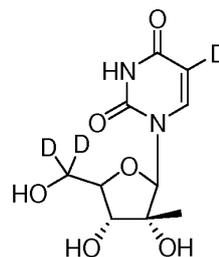
Ejemplo 13. Determinación de las concentraciones de nucleósidos en hepatocitos humanos

Por facilidad de referencia, se hace referencia a las siguientes Fórmulas en este ejemplo:

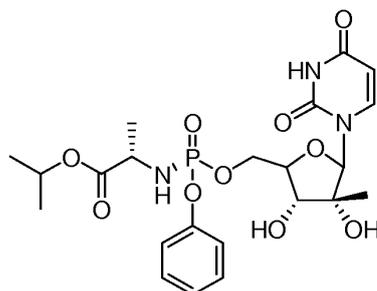
30



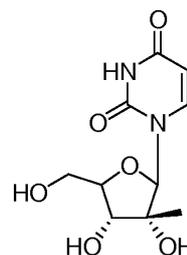
Fórmula II



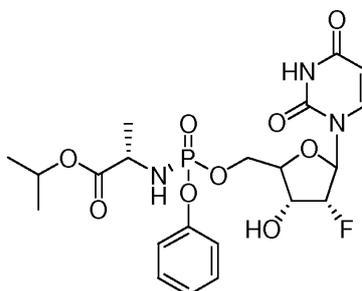
Fórmula VI



Fórmula VII



Fórmula IX



Fórmula X

5

Preparación de hepatocitos

Se recibieron hepatocitos hepáticos frescos plaqueados en un formato de 12 pocillos o de 6 pocillos (Life Technologies, Catálogo #HMFN12 y #HMNF06). Tras su recepción, se eliminó el medio de envío inmediatamente y se reemplazó con 1 ml o 2 ml de medio de cultivo precalentado (Medio de Chee modificado suplementado; Xenotech LLC, Catálogo # K2300) para los formatos de 12 y 6 pocillos, respectivamente. Se aclimataron las células durante la noche a 37°C con un 5% de atmósfera de CO₂. Se aspiró el medio de las placas de 12 y 6 pocillos y se reemplazó con 1 ml o 2 ml, respectivamente, de medio fresco que contenía 20 μM de Fórmula II, 20 μM de Fórmula VII o control de solvente (0,05% de DMSO). Se incubaron las muestras a 37°C, con un 5% de atmósfera de CO₂, por duplicado para la Fórmula II y únicas para la Fórmula VII en cada formato de pocillo. También se estudió la estabilidad de los compuestos en ausencia de células. A las 24 horas, se retiró el medio y se congeló. Se lavaron las células dos veces con PBS frío. Se añadió metanol frío al 70% (0,75 ml o 1,5 ml, para los formatos de 12 y 6 pocillos, respectivamente) que contenía Fórmula X como patrón interno a cada pocillo y se retiraron las células suavemente de la placa por raspado. Se aspiraron las células recuperadas suspendidas en la solución metanólica en un vial y se congelaron a -80°C.

Extracción y análisis de LC-MS/MS de los hepatocitos

Se extrajeron las soluciones celulares durante la noche a -80°C en metanol al 70%, se retiraron del congelador, se descongelaron y se agitaron en vórtice. Se centrifugaron los tubos a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiraron los sobrenadantes y se analizaron por LC-MS/MS. Se prepararon seis concentraciones de Fórmula II,

Fórmula VII, Fórmula VI o Fórmula IX por dilución seriada de razón 3 en DMSO. Se añadieron alícuotas de los compuestos a las concentraciones especificadas a metanol al 70% que contenía patrón interno. También se añadieron dos concentraciones a soluciones de células del experimento incubadas en ausencia de compuesto. Se congelaron las muestras a -80°C durante la noche y luego se descongelaron y se agitaron en vórtice. Se centrifugaron las muestras a 3.000 rpm durante 15 minutos. Se retiraron los sobrenadantes y se analizaron por LC-MS/MS. Las concentraciones de calibración eran 5, 1,67, 0,556, 0,185, 0,0617 y 0,0206 μM . Se cuantificaron los analitos usando regresión lineal de valores estándar de calibración con respuesta del instrumento. Los criterios de aceptación usados y las concentraciones estándar de calibración eran $\pm 30\%$ de la concentración nominal. No se usaron los estándares de calibración que no satisfacían los criterios especificados en la curva de calibración. Se aceptaron los valores de las muestras cuando al menos un 66% de las concentraciones estándar durante la operación estaban dentro del 30% del nominal. El valor "r" requerido para la aceptación de la operación era $> 0,98$. Se analizaron muestras de células sin patrón interno debido a sólo un 81% de eficacia de extracción del patrón interno de las células mientras se realizaba la calibración sin células; esto dio una determinación más precisa de las concentraciones.

Extracción y análisis de LC-MSIMS de los medios de hepatocitos

Se retiraron los incubados de medios de hepatocitos del congelador, se descongelaron y se agitaron en vórtice. Se mezclaron 2 partes de medio de hepatocitos incubado con 1 parte de patrón interno que contenía acetonitrilo y se centrifugaron después a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiraron los sobrenadantes y se analizaron por LC-MS/MS. Los controles eran seis concentraciones de Fórmula II, Fórmula VII, Fórmula VI o Fórmula IX preparadas por dilución seriada de razón 3 en DMSO. Se añadieron alícuotas de los compuestos a medios de hepatocitos frescos, para obtener concentraciones 5, 1,67, 0,556, 0,185, 0,0617 y 0,0206 μM de medio de calibración. Se centrifugaron 2 partes de medio de calibración mezcladas con 1 parte de muestras de patrón interno que contenía acetonitrilo a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiraron los sobrenadantes y se analizaron por LC-MS/MS. Se cuantificaron las concentraciones de analitos en las muestras usando regresión lineal de los valores estándar de calibración con respuesta del instrumento. Los criterios de aceptación usados y las concentraciones estándar de calibración eran $\pm 30\%$ de la concentración nominal. No se usaron los estándares de calibración que no satisfacían los criterios especificados en la curva de calibración. Se aceptaron los valores de las muestras cuando al menos un 66% de las concentraciones estándar durante la operación estaban dentro del 30% del nominal. El valor "r" requerido para la aceptación de la operación era $> 0,98$.

Como muestran los datos en la FIG. 1 y la FIG. 2, hay más nucleósido desfosforilado (es decir, nucleósido 5'-OH no deseado) en las muestras incubadas con el fosforamido no deuterado que con el fosforamido 5'-deuterado. Concretamente, usando 20 μM de Fórmula II o su contrapartida de Fórmula VII no deuterada (placa de 12 pocillos (1 ml) con hepatocitos sembrados a razón de 0,67 millones de células por pocillo durante 24 horas) se obtiene como resultado una concentración 1,9 veces (medio, es decir, concentración extracelular) y 2,9 veces (extracto celular, es decir, intracelular) mayor de 2'-metiluridina desfosforilada no deuterada (Fórmula IX) en comparación con la resultante de la forma 5'-deuterada (Fórmula VI). Los resultados de la incubación de 20 μM de Fórmula II o su contrapartida no deuterada (placa de 6 pocillos (2 ml) con hepatocitos sembrados a razón de 1,7 millones de células por pocillo durante 24 horas) indican una concentración 1,5 veces (extracto celular, es decir, intracelular) y 2,8 veces (extracto celular, es decir, intracelular) mayor en una mayor concentración de 2'-metiluridina desfosforilada no deuterada (Fórmula IV) en comparación con la resultante de la forma 5'-deuterada (Fórmula VI). Por lo tanto, como media, la actividad nucleotidasa de los hepatocitos da lugar a aproximadamente el doble del 5'-OH nucleósido producido cuando la posición 5' no está deuterada. Esta diferencia en la reserva del 5'-monofosfato disponible para activación al trifosfato cuando se usa el derivado de nucleósido 5'-deuterado puede tener un efecto significativo sobre la eficacia, la dosificación, la toxicidad y/o la farmacocinética del fármaco.

Ejemplo 14. Niveles de trifosfato (Fórmula IV) en comparación con los niveles de trifosfato de VX-135-TP

En este Ejemplo, se describen los resultados de tres experimentos que comparaban los niveles de trifosfato de la Fórmula IV con el nivel de trifosfato de VX-135. Se usaron hepatocitos humanos según los métodos generales descritos en el Ejemplo 13. Se determinaron las concentraciones de Fórmula IV producidas en hepatocitos humanos (pmol de Fórmula IV/millón de células) a las 2, 4, 8, 25 ó 48 horas de incubación con 5 μM de Fórmula II.

Como comparación con un candidato a ensayo clínico como se describirá más adelante en el Ejemplo 14 y la Figura 3, un póster presentado por Alios (EASL 2013) indica que el nivel de trifosfato de VX-135 medido en hepatocitos humanos tras 24 horas de incubación con 50 μM de VX-135 era de 1.174 pmol/millón de células. Por el contrario, el nivel de la Fórmula IV tras 25 horas de incubación de hepatocitos humanos con 5 μM de Fórmula II, es decir, una concentración diez veces inferior, es de 486 pmol/millón de células. Por lo tanto, la cantidad de trifosfato producida por incubación de la Fórmula II es 4 veces mayor (dosis normalizada) que la cantidad de trifosfato producida por VX-135. Aunque no se conoce actualmente la estructura precisa de VX-135, se trata de un profármaco análogo de nucleótido de uridina inhibidor de NS5B.

Ejemplo 15. Determinación de la concentración de Fórmula IV a partir de la dosificación de Fórmula II

Se determinó la relación de la concentración de Fórmula IV (ng/ml) como resultado de la concentración de Fórmula II (μM) en hepatocitos humanos. Se usaron los métodos generales del Ejemplo 13 para determinar las concentraciones de compuestos. Se determinaron las concentraciones de Fórmula IV en hepatocitos humanos tras incubaciones de 24 horas con 0,15, 0,45 y 1,35 μM de Fórmula II. Se representaron los resultados y se calculó la regresión lineal usando Microsoft Excel. Tal como se muestra en la Figura 4, existe una relación lineal a las concentraciones estudiadas para la dosificación de la Fórmula II y la concentración resultante del compuesto trifosfato activo (Fórmula IV).

Adicionalmente, tras la incubación de la Fórmula II a 50 nM en hepatocitos primarios durante 24 horas, el nivel de Fórmula IV variaba de 9,2 a 16,2 pmol/millón de células. Estas concentraciones son de 5 a 8 veces mayores que las concentraciones obtenidas cuando se incubaron las células Huh-luc/neo con 50 nM de Fórmula II. Dado que la Fórmula IV es la especie activa que inhibe la replicación de los replicones de VHC en células Huh-luc/neo, la CE_{50} predicha de la Fórmula II en hepatocitos humanos primarios sería de 6,25-10 nM (frente a un VHC putativo en hepatocitos primarios) suponiendo que la relación lineal obtenida en la Figura 4 entre la Fórmula II y la Fórmula IV continúe a menor concentración.

Ejemplo 16. Determinación de las semividas de la Fórmula IV y de GS-7977-TP

En este Ejemplo, se usaron los métodos generales del Ejemplo 13 para determinar las semividas del trifosfato activo (Fórmula IV o GS-7977-TP) en hepatocitos humanos, de perro, de mono y de rata. Para explicarlo brevemente, se añadieron la Fórmula II o GS-7977 (Sovaldi) a concentraciones seleccionadas a hepatocitos (humanos, de perro, de mono y de rata) y se incubaron a 37°C. Se midieron los extractos celulares del sobrenadante de Fórmula IV o GS-7977-TP (los metabolitos del trifosfato activo) por cromatografía líquida de alto rendimiento con detección espectrométrica de masas en tándem (LC-MS/MS). Los hepatocitos humanos usados para las determinaciones de la semivida eran células en formato de 12 pocillos de hepatocitos humanos y se sembraron a razón de 0,67 millones de células por pocillo. Los hepatocitos caninos usados para las determinaciones de la semivida eran células en formato de 12 pocillos de hepatocitos de perro Beagle y se sembraron a razón de 0,67 millones de células por pocillo. Los hepatocitos de mono usados para las determinaciones de la semivida eran células en formato de 12 pocillos de hepatocitos de mono Cinomolgo y se sembraron a razón de 0,9 millones de células por pocillo. Los hepatocitos de rata usados para las determinaciones de la semivida eran células en formato de 12 pocillos de hepatocitos de rata Sprague-Dawley (SD) y se sembraron a razón de 0,67 millones de células por pocillo. Todas las células fueron obtenidas de Life Technologies.

Tal como se muestra en la Figura 5, la semivida de la Fórmula IV es mayor que la semivida del trifosfato de Sovaldi en los hepatocitos de las cuatro especies. La mayor semivida era en los hepatocitos humanos, seguidos de los de perro, luego de los de mono y luego de los de rata. Las semividas van de 10 a 30 horas para la Fórmula IV y de 8 a 23 horas para el trifosfato de Sovaldi.

Ejemplo 17. Niveles de trifosfato (Fórmula IV y GS-7977-TP) en hepatocitos humanos

En este Ejemplo, se determinaron los niveles de trifosfato de Fórmula IV y GS-7977-TP usando los métodos generales descritos en el Ejemplo 13. Los resultados para los tres experimentos que determinan los niveles de trifosfato de Fórmula IV tal como se describe en la Tabla mostrada en la Figura 3, están representados gráficamente y se muestran aquí en la Figura 6. También se determinaron los niveles del correspondiente trifosfato de Sovaldi (GS-7977) con objeto de comparación, y se muestran en la Figura 7. Resumiendo, se determinaron las concentraciones de Fórmula IV o GS-7977-TP producidos en hepatocitos humanos (pmol/millón de células) a las 2, 4, 8, 25 ó 48 horas de incubación con 5 μM de Fórmula II o GS7977 (Sovaldi), respectivamente.

Además, como se describe en el Ejemplo 17 y en las Figuras 6 y 7, a lo largo de un período de 48 horas, mientras que la conversión intracelular al correspondiente trifosfato de Sovaldi (GS-7977) medida en hepatocitos humanos es 2 veces mayor que la del trifosfato derivado de la Fórmula II (es decir, Fórmula IV), la concentración de la Fórmula IV está aún creciendo a las 48 horas, mientras que la concentración del trifosfato metabolito de Sovaldi disminuye desde las 24 hasta las 48 horas. La creciente concentración de la Fórmula IV, combinada con su semivida de >24 h, sugieren la acumulación de los niveles de Fórmula IV (el trifosfato de Fórmula II) en los hepatocitos con la dosificación repetida. Esta tendencia, tras una rampa de dosificación inicial *in vivo* hasta la aclimatación, puede llevar a una mayor concentración en estado estacionario de Fórmula IV *in vivo* para el trifosfato derivado de la Fórmula II que para el trifosfato de Sovaldi. Además, la potencia intrínseca (el efecto inhibitorio sobre la actividad RdRp de NS5B) de la Fórmula IV (el trifosfato de Fórmula II) es 1,5 veces mejor que la potencia intrínseca del trifosfato de Sovaldi.

Ejemplo 18. Determinación de la CI_{50} de la ARN polimerasa de NS5B

Se monitorizó la reacción de la ARN polimerasa de NS5B mediante la incorporación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-CTP}$ a ARN naciente sintetizado a partir de una plantilla de ARN de hélice negativa derivada de la región no traducida (NTR) 5' del VHC y que incluía el sitio de entrada ribosómico interno (IRES).

Para generar la plantilla de ARN IRES de hélice negativa, se amplificó ADN dúplex (bases NTR 1-341) a partir del plásmido pFK-I₃₄₁PI-Luc/NS3-3'/ET del VHC usando los cebadores 5'-NTR-1-21 (GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACTCCAC) y T7-5NTR-341-317 (GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGTGCACGGTCTACGAGACCTCC, secuencia promotora T7 subrayada). Se transcribió ARN de hélice negativa a partir de este ADN dúplex usando ARN polimerasa T7 (Kit de Transcripción MEGAscript T7, Life Technologies). Se purificó el ARN de los componentes de la reacción (MEGAclean, Life Technologies) y se valoraron su rendimiento y su pureza por electroforesis en gel de agarosa y absorción óptica.

Se realizaron reacciones de ARN polimerasa de NS5B para la determinación de la CI_{50} en placas de microtitulación de 96 pocillos en reacciones de 20 μl que contenían tampón de ensayo (50 mM de Na^+ HEPES, 1 mM de MgCl_2 , 0,75 mM de MnCl_2 , 2 mM de DTT, pH 7,5), 1 U/ μl de SUPERase[™]In (Life Technologies), 20 ng/ μl de plantilla de ARN IRES, 1 μM de cada de ATP, CTP, GTP y UTP (Life Technologies), incluyendo $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-CTP}$ a una actividad específica final de 50 Ci/mmol (PerkinElmer), compuestos de ensayo en series de dilución medio-log de 10 puntos y polimerasa de NS5B. Se incubaron las reacciones a 27°C durante 60 minutos y se finalizaron por dilución hasta 100 μl en solución de detención 1x (concentraciones finales 144 mM de Na^+ citrato, 1,44 M de NaCl, 10 mM de EDTA, pH 7,0). Se aplicaron mediante vacío μl de muestras detenidas a esterillas de filtro de membrana de nilón (PerkinElmer), se lavó 4x en 60 mM de Na^+ citrato, 600 mM de NaCl (pH 7,0), se aclaró secuencialmente en H_2O y EtOH, se secó y se contó en un contador MicroBeta2 con cassette de centelleo (PerkinElmer). Se vio en reacciones paralelas que la actividad polimerasa de NS5B estaba dentro del rango lineal. Se expresó la actividad del compuesto como la concentración que reducía la incorporación de radiomarcaje en un 50% (CI_{50}), según se determinó por ajuste de curva sigmoideal usando análisis de regresión no lineal (Prism Software, GraphPad, La Jolla, CA).

En la Tabla I, se muestra la actividad inhibitoria de los compuestos trifosfato de nucleósido (Fórmula IV y GS-7977-trifosfato) frente a la polimerasa de NS5B de tipo salvaje. Se presentan los valores de la CI_{50} como media \pm desviación estándar a partir de N experimentos independientes para los compuestos frente a la polimerasa de NS5B de tipo salvaje (WT).

Tabla 1	GT-1b WT ^a	
	CI_{50} (μM)	N
Fórmula IV	1,4 \pm 0,1	4
GS-7977-TP	2,1 \pm 0,3	4

Se ha descrito esta memoria en relación a realizaciones que quedan ilustradas por los Ejemplos acompañantes. La invención puede, sin embargo, ser realizada de diferentes formas y no ha de ser considerada como limitada a las realizaciones aquí expuestas. Dadas las enseñanzas que aquí se ofrecen, alguien con conocimientos ordinarios en la técnica podrá modificar la invención para un fin deseado y dichas variaciones son consideradas como dentro del alcance de la divulgación.

Lista de secuencias

<110> Achillion Pharmaceuticals Inc.
Deshpande, Milind

<120> Derivado de nucleósido altamente activo para el tratamiento del VHC

<130> API0087US3

<140> Aquí adjunto
<141> 14-04-2014

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 30

ES 2 623 287 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia cebadora 5'-NTR-1-21

<400> 1
gccagcccc tgatgggggc gacctccac 30

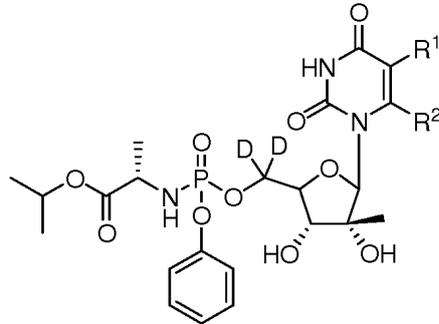
10 <210> 2
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia cebadora T7-SNTR-341-317

20 <400> 2
gaaattaata cgactcacta taggggtgc acggtctacg agacctcc 48

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde la Fórmula I es

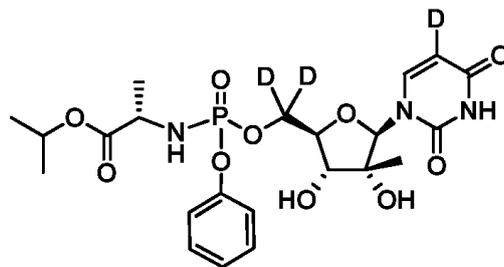


5

Formula I

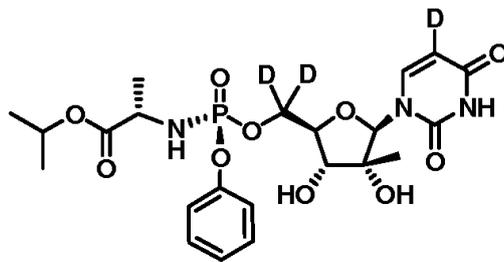
donde R¹ y R² son cada uno hidrógeno o D y cada posición representada como D tiene enriquecimiento en deuterio de al menos un 50%.

10 2. Un compuesto o sal de la Reivindicación 1 de fórmula

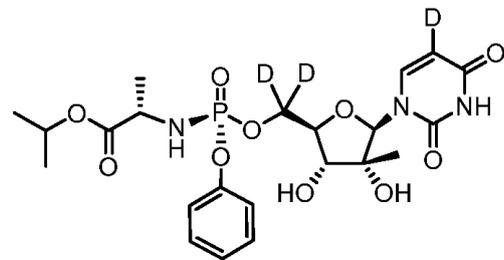


15

3. Un compuesto o sal de la Reivindicación 2 de fórmula



4. Un compuesto o sal de la Reivindicación 2 de fórmula

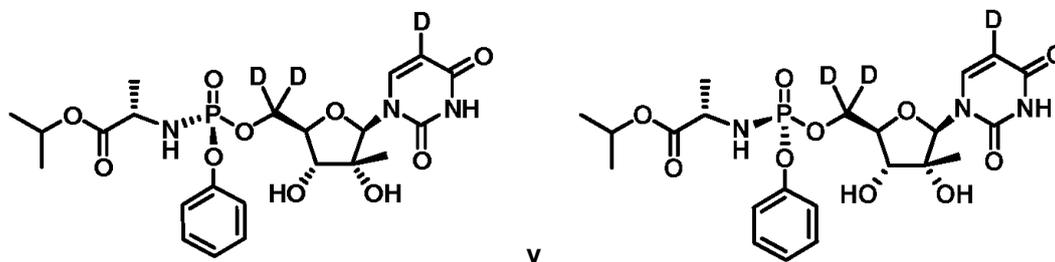


20

5. Un compuesto o sal de la Reivindicación 2, donde cada posición representada como D tiene un enriquecimiento en deuterio de al menos un 90%.

6. Un compuesto o sal de la Reivindicación 2, donde cada posición representada como D tiene un enriquecimiento en deuterio de al menos un 95%.

7. Una mezcla 50/50 de estereoisómeros del compuesto de la Reivindicación 2, donde la mezcla consiste en



8. Una composición farmacéutica que contiene un principio activo, donde el principio activo es un compuesto o sal de la Reivindicación 2, y que también contiene un soporte farmacéuticamente aceptable.

9. La composición farmacéutica de la Reivindicación 8, que contiene uno o más principios activos adicionales.

10. La composición farmacéutica de la Reivindicación 9, donde el uno o más principios activos adicionales son un inhibidor de la proteasa NS3 del VHC, un inhibidor de NS5A del VHC, un inhibidor de NS5B del VHC o una combinación de los anteriores.

11. La composición farmacéutica de la Reivindicación 9, donde el uno o más principios activos adicionales son un inhibidor de NS5A y al menos uno de sofavir y ACH-2684.

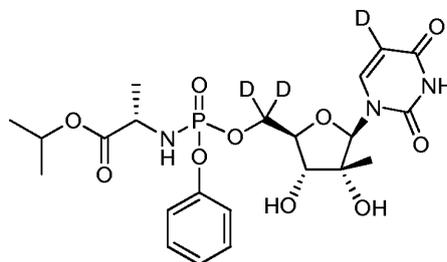
12. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de la Reivindicación 2 para uso en un método de tratamiento de una infección por VHC en un paciente.

13. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de la Reivindicación 8 para uso en un método de tratamiento de una infección por VHC en un paciente.

14. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un primer principio activo y una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más principios activos adicionales para uso en un método de tratamiento de una infección por VHC en un paciente, donde el primer principio activo es un compuesto o sal de la Reivindicación 1 y el uno o más principios activos adicionales son seleccionados entre un inhibidor de NS3 y un inhibidor de NS5A.

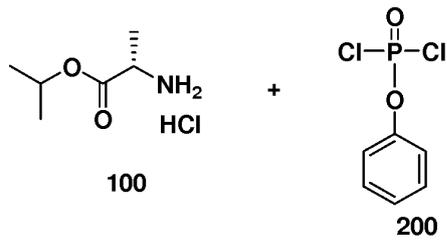
15. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de la Reivindicación 2 para uso en un método de tratamiento de una infección vírica por *Flaviviridae* en un paciente, donde la infección vírica por *Flaviviridae* es la fiebre del Dengue, la infección por el virus del Nilo occidental, la fiebre amarilla o la infección por el virus de la diarrea vírica bovina.

16. Un método para preparar un compuesto de fórmula

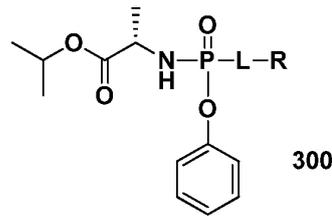


40 consistente en

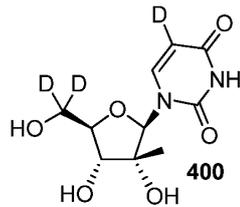
(i) la reacción de un aminoéster (100), donde el aminoéster es éster isopropílico de L-alanina, con un diclorofosfato (200), para formar una mezcla de reacción;



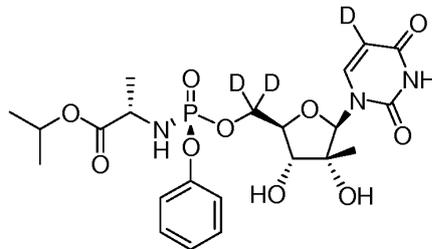
5 (ii) la adición a la mezcla de reacción de (i) de R-LH, donde L es S u O y R es un grupo arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo eventualmente sustituido, o R-LH, donde R-LH es una N-hidroxiimida, para formar un intermediario (300)



10 y
(iii) la reacción del intermediario (300) con un nucleósido (400)

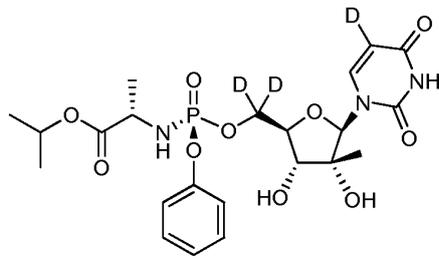


15 para formar

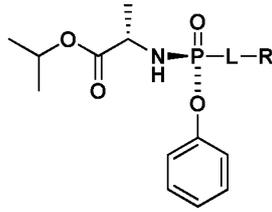


donde cada posición D representada como D tiene un enriquecimiento en deuterio de al menos un 50%.

20 17. Un método de la Reivindicación 16 para preparar un compuesto de fórmula

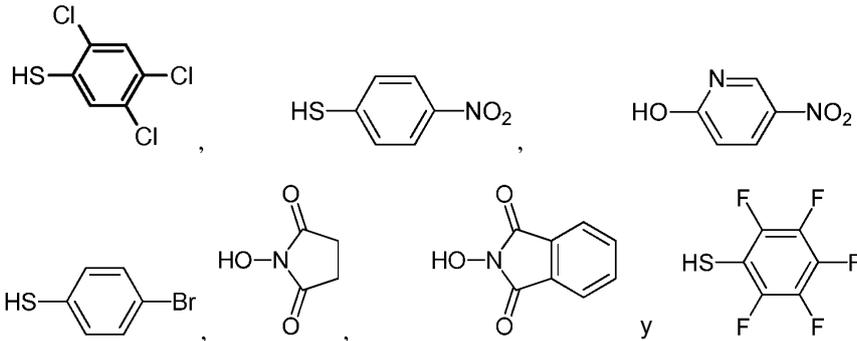


25 donde el intermediario 300 tiene la estructura



18. El método de la Reivindicación 16, donde el aminoéster (100) y el diclorofosfato (200) se combinan a una temperatura inferior a -20°C y R-LH es seleccionado entre

5



10 19. El método de la Reivindicación 16, donde el aminoéster (100) y el diclorofosfato (200) se combinan a una temperatura de -40°C a aproximadamente -60°C .

20. El método de la Reivindicación 18, donde se añade base a la mezcla de aminoéster (100) y diclorofosfato (200).

15 21. El método de la Reivindicación 20, donde la base es trietilamina y la adición de base a la mezcla se produce en un solvente orgánico seleccionado entre diclorometano, 2-miltetrahidrofurano o tetrahidrofurano.

Compuesto parental	Medio de hepatocitos				Extracto celular de hepatocitos ajustado al volumen del medio	
	% Parental que queda @ T24h	Estabilidad del tampón Parental T24h 37°C	Nucleósido (Fórmula IX o Fórmula VI)		Conc. parental (µM)	Nucleósido (Fórmula IX o Fórmula VI) Conc. (µM)
			Conc. (µM)	% Dosis 20 µM		
Fórmula VII	0,82	97	8,4	42	<0,02	0,044
Fórmula II	0,41	97	4,4	22	<0,02	0,015

FIG. 1

Compuesto parental	Medio de hepatocitos				Extracto celular de hepatocitos ajustado al volumen del medio	
	% Parental que queda @ T24h	Estabilidad del tampón Parental T24h 37°C	Nucleósido (Fórmula IX o Fórmula VI)		Conc. parental (µM)	Nucleósido (Fórmula IX o Fórmula VI) Conc. (µM)
			Conc. (µM)	% Dosis 20 µM		
Fórmula VII	4,9	97	5,2	26	<0,02	0,057
Fórmula II	3,9	97	3,4	17	<0,02	0,020

FIG. 2

Tiempo (h)	Fórmula IV (pmol/millón de células)				VX-135-TP (pmol/millón de células)
	rep1	rep2	rep3	Media±SD v	
2	72.1	71.5	67.9	70.5±2.25	
4	130	129	129	129±0.62	
8	218	217	236	224±10.6	
25	506	465	488	486±20.9	117.4 (Dosis normalizada)
48	619	581	575	592±24.3	

FIG. 3

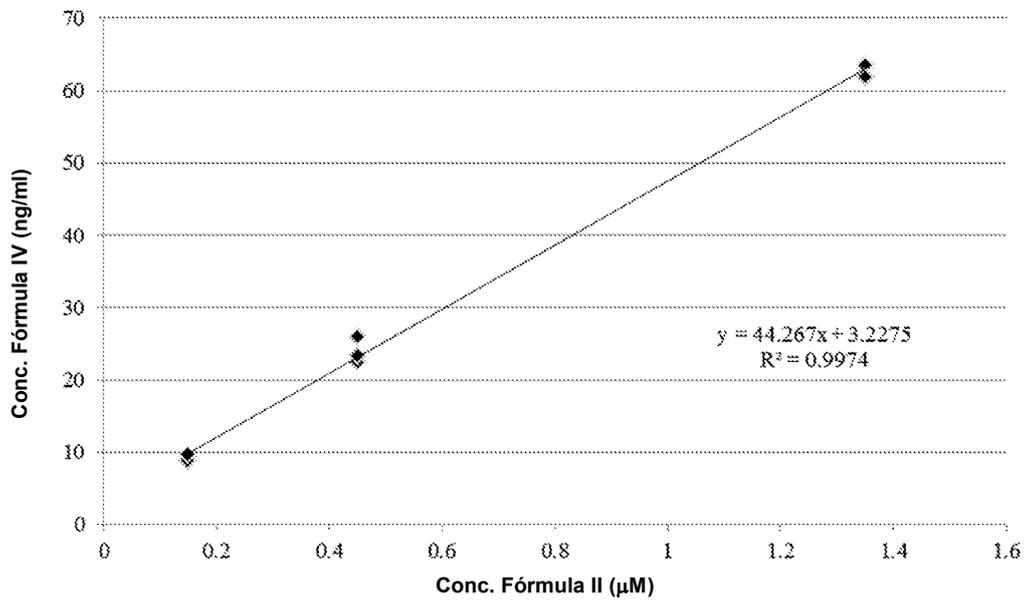


FIG. 4

Especie	Fórmula IV t_{1/2} (h)	GS-7977-TP t_{1/2} (h)
Humano	27.6 (26.0-29.4) ^a	22.6 (21.5-23.9)
Perro	29.6 (22.0-45.4)	17.7 (15.0-21.5)
Mono	14.5 (11.8-18.9)	9.3 (7.9-11.4)
Rata	10.2 (8.6-12.5)	7.6 (6.4-9.3)

FIG. 5

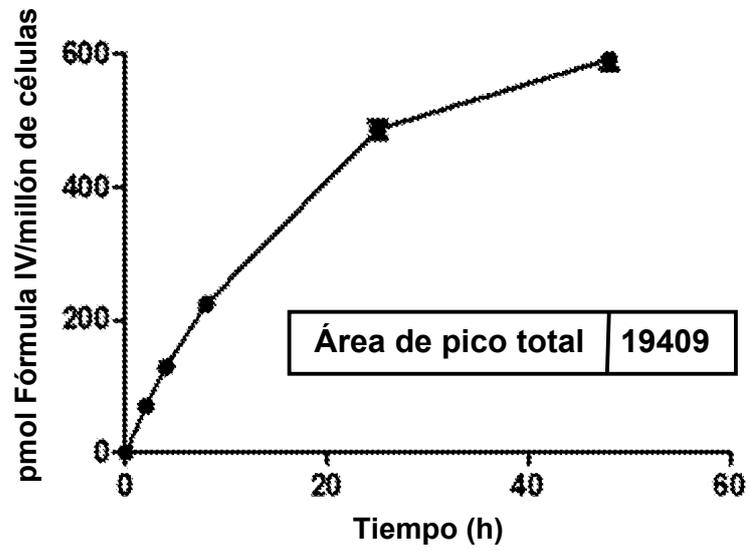


FIG. 6

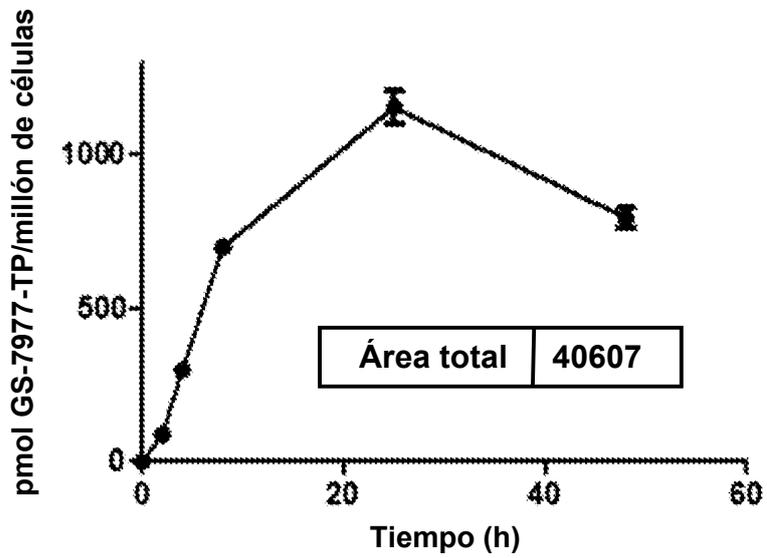


FIG. 7