

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 998**

51 Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)
C07H 19/16 (2006.01)
C07H 19/14 (2006.01)
A61K 31/7064 (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2004 PCT/US2004/012472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2005 WO05003147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2004 E 04775900 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 1633766**

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

30 Prioridad:

30.05.2003 US 474368 P

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

11.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CLARK, JEREMY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 726 998 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).

DESCRIPCION

Análogos de nucleósidos fluorados modificados

5 Esta solicitud se presenta el 21 de abril de 2004 como una solicitud de patente internacional PCT a nombre de PHARMASSET LTD. un residente de Estados Unidos solicitantes de todas las designaciones, excepto los Estados Unidos.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención incluye nucleósidos de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilo que tienen la configuración β -D natural, composiciones farmacéuticas que comprenden estos nucleósidos y un portador farmacéuticamente aceptable, nucleósidos para su uso en el tratamiento o profilaxis de las infecciones por *Flaviviridae*, especialmente el virus de la hepatitis C (VHC), y los métodos para sintetizar los nucleósidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un importante problema de salud que lleva a una enfermedad del hígado crónica, como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular, en un número importante de individuos infectados, que se estima que es el 2-15% de la población mundial. Según el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos se estima que solo en los Estados Unidos hay 4,5 millones de personas infectadas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, hay más de 200 millones de personas infectadas en todo el mundo, con por lo menos de 3 a 4 millones de personas infectadas cada año. Una vez infectados, aproximadamente el 20% de las personas eliminan el virus, pero el resto puede albergar el VHC durante el resto de sus vidas. Del diez al veinte por ciento de las personas con infección crónica desarrollan eventualmente cirrosis o cáncer que destruyen el hígado. La enfermedad vírica se transmite por vía parenteral a través de la sangre y productos sanguíneos contaminados, agujas contaminadas, o sexual y verticalmente de madres infectadas o madres portadoras a sus descendientes. Los tratamientos actuales para la infección por VHC, que están restringidos a la inmunoterapia con interferón- α recombinante solo o en combinación con el análogo de nucleósido ribavirina, tienen un beneficio clínico limitado ya que la resistencia se desarrolla rápidamente. Además, no existe una vacuna establecida para el VHC. En consecuencia, hay una necesidad urgente de mejores agentes terapéuticos que combatan eficazmente la infección crónica por VHC.

20 El virión del VHC es un virus de ARN de cadena positiva encapsulado con una secuencia genómica de oligoribonucleótidos individual de aproximadamente 9600 bases que codifica una poliproteína de aproximadamente 3.010 aminoácidos. Los productos proteicos del gen del VHC consisten de las proteínas estructurales C, E1 y E2, y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A y NS4B, y NS5A y NS5B. Se cree que las proteínas no estructurales (NS) proporcionan la maquinaria catalítica para la replicación vírica. La proteasa NS3 libera NS5B, la ARN polimerasa dependiente del ARN de la cadena de la poliproteína. La polimerasa NS5B del VHC es necesaria para la síntesis de un ARN de cadena doble a partir de un ARN vírico de cadena sencilla que sirve como plantilla en el ciclo de replicación del VHC. Por lo tanto, la polimerasa NS5B se considera un componente esencial en el complejo de replicación del VHC (K. Ishi, et al., "Expression of Hepatitis C Virus NS5B Protein: Characterization of Its RNA Polymerase Activity and RNA Binding," *Heptology*, 29: 1227-1235 (1999); V. Lohmann, et al., "Biochemical and Kinetic Analysis of NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase of the Hepatitis C Virus," *Virology*, 249: 108-118 (1998). La inhibición de la polimerasa NS5B del VHC previene la formación del ARN de VHC de cadena doble y, por lo tanto, constituye un enfoque atractivo para el desarrollo de terapias antivíricas específicas para el VHC.

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

Virus Flaviviridae

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

35 El género del *pestivirus* incluye el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el virus de la peste porcina clásica (CSFV, también denominado virus del cólera porcino) y el virus de la enfermedad fronteriza (BDV) de las

ovejas (Moennig, V. et al. Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Las infecciones por pestivirus de ganado domesticado (vacas, cerdos y ovejas) provocan importantes pérdidas económicas en todo el mundo. El BVDV provoca enfermedad de la mucosa en el ganado y tiene una importancia económica significativa para la industria ganadera (Meyers, G. y Thiel, H.J., Advances in Virus Research, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al, Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Los pestivirus humanos no se han caracterizado tan extensamente como los pestivirus animales. Sin embargo, los estudios serológicos indican una exposición considerable a los pestivirus en humanos.

Los pestivirus y los hepacivirus son grupos de virus estrechamente relacionados dentro de la familia Flaviviridae. Otros virus estrechamente relacionados en esta familia incluyen el virus A del GB, agentes similares al virus A del GB, el virus B del GB y el virus C del GB (también denominado virus G de la hepatitis, VGH). El grupo de hepacivirus (virus de la hepatitis C, VHC) consiste en una serie de virus estrechamente relacionados pero genotípicamente distinguibles que infectan a los humanos. Hay por lo menos 6 genotipos de VHC y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre los pestivirus y los hepacivirus, combinados con la poca capacidad de los hepacivirus para crecer de manera eficiente en cultivos celulares, el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) se usa a menudo como un sustituto para estudiar el virus del VHC.

La organización genética de los pestivirus y hepacivirus es muy similar. Estos virus de ARN de cadena positiva poseen un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica todas las proteínas víricas necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que se procesa co- y post-traduccionalmente por las proteinasas tanto celulares como codificadas por virus para producir las proteínas víricas maduras. Las proteínas víricas responsables de la replicación del ARN del genoma vírico están localizadas dentro de aproximadamente el extremo terminal carboxi. Dos tercios del ORF se denominan proteínas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de poliproteínas de la parte de proteína no estructural del ORF para los pestivirus y los hepacivirus es muy similar. Tanto para los pestivirus como para los hepacivirus, las proteínas no estructurales (NS) maduras, en orden secuencial desde el extremo terminal amino de la región que codifica la proteína no estructural al extremo terminal carboxi del ORF, consisten de p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B.

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

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

Tratamiento de la infección por VHC con interferón

Los interferones (IFN) han estado disponibles comercialmente para el tratamiento de la hepatitis crónica durante casi una década. Los IFN son glicoproteínas producidas por células inmunitarias en respuesta a una infección vírica. Los IFN inhiben la replicación de una serie de virus, incluyendo el VHC, y cuando se usan como el único tratamiento para la infección por hepatitis C, en ciertos casos el IFN puede suprimir el ARN del VHC sérico hasta niveles indetectables. Adicionalmente, el IFN puede normalizar los niveles séricos de amino transferasa. Desafortunadamente, el efecto del IFN es temporal y se produce una respuesta sostenida en solo el 8%-9% de los pacientes con infección crónica por VHC (Gary L. Davis. Gastroenterology 18:S104-S114, 2000). Sin embargo, la mayoría de los pacientes tienen dificultades para tolerar el tratamiento con interferón, que provoca síntomas graves parecidos a la gripe, pérdida de peso y falta de energía y resistencia.

Una serie de patentes divulgan los Flaviviridae, incluyendo el VHC, y tratamientos que usan terapias basadas en interferón. Por ejemplo, La patente de Estados Unidos N° 5.980.884 de Blatt et al. divulga métodos para

volver a tratar pacientes afectados por VHC usando interferón de consenso. La Patente de Estados Unidos N° 5.942.223 de Bazer et al. divulga una terapia anti-VHC usando interferón-tau ovino o bovino. La patente de Estados Unidos N° 5.928.636 de Alber et al. divulga la terapia de combinación de interleucina-12 e interferón alfa para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo el VHC. La Patente de Estados Unidos N° 5.849.696 de Chretien et al. divulga el uso de timosinas, solas o en combinación con interferón, para tratar el VHC. La Patente de Estados Unidos N° 5.830.455 de Valtuena et al. divulga una terapia para el VHC de combinación que emplea interferón y un recuperador de radicales libres. La Patente de Estados Unidos N° 5.738.845 de Imakawa divulga el uso de proteínas tau interferón humanas para tratar el VHC. Otros tratamientos basados en interferón para el VHC se divulgan en La Patente de Estados Unidos N° 5.676.942 de Testa et al., La Patente de Estados Unidos N° 5.372.808 de Blatt et al. y la Patente de Estados Unidos N° 5.849.696. Una serie de patentes también divulgan formas pegiladas de interferón, como las Patentes de Estados Unidos N° 5.747.646, 5.792.834 y 5.834.594 de Hoffmann-La Roche; la Publicación PCT N° WO 99/32139 y WO 99/32140 de Enzon; la WO 95/13090 y las Patentes de Estados Unidos N° 5.738.846 y 5.711.944 de Schering; y la Patente de Estados Unidos N° 5.908.621 de Glue et al.

El interferón alfa-2a y el interferón alfa-2b están actualmente aprobados como monoterapia para el tratamiento del VHC. El ROFERON®-A (Roche) es la forma recombinante de interferón alfa-2a. El PEGASYS® (Roche) es la forma pegilada (es decir, modificada con polietilenglicol) de interferón alfa-2a. El INTRON®A (Schering Corporation) es la forma recombinante del interferón alfa-2b, y el PEG-INTRON® (Schering Corporation) es la forma pegilada de interferón alfa-2b.

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

Ribavirina

La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de nucleósidos antivírico de amplio espectro, no inductor de interferón, sintético vendido bajo el nombre comercial de Virazole (The Merck Index, 11ª edición, Editor: Budavari, S., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, p1304, 1989). La Patente de Estados Unidos N° 3.798.209 y RE29.835 divulgan y reivindican la ribavirina. La ribavirina es estructuralmente similar a la guanosina y tiene actividad in vitro contra varios virus de ADN y ARN, incluyendo los *Flaviviridae* (Gary L. Davis. Gastroenterology 118: 5104-51 14, 2000).

La ribavirina reduce los niveles de amino transferasa séricos a la normalidad en el 40% de los pacientes, pero no reduce los niveles séricos de ARN de VHC (Gary L. Davis, 2000). Por tanto, la ribavirina sola no es eficaz para reducir los niveles de ARN víricos. Además, la ribavirina tiene una toxicidad significativa y se sabe que induce anemia. La ribavirina no está aprobada para monoterapia contra el VHC. Se ha aprobado en combinación con interferón alfa-2a o interferón alfa-2b para el tratamiento del VHC.

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

Combinación de interferón y ribavirina

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

Las publicaciones de PCT N° WO 99/59621, WO 00/37110, WO 01/81359, WO 02/32414 y WO 03/02446 1 de Schering Corporation divulgan el uso de la terapia de combinación de interferón alfa pegilado y ribavirina para el tratamiento del VHC. Las publicaciones de PCT N° WO 99/15 194, WO 99/64016 y WO 00/24355 de Hoffmann-La Roche Inc. también divulgan el uso de la terapia de combinación de interferón alfa pegilado y ribavirina para el

tratamiento del VHC.

Métodos adicionales para tratar infecciones por Flaviviridae

5 El desarrollo de nuevos agentes antivirales para las infecciones por *Flaviviridae*, especialmente la hepatitis C, está actualmente en desarrollo. Se están desarrollando inhibidores específicos de enzimas derivadas del VHC, como la proteasa, la helicasa y los inhibidores de la polimerasa. También se están desarrollando fármacos que inhiben otros pasos en la replicación del VHC, por ejemplo, fármacos que bloquean la producción de antígenos del VHC a partir del ARN (inhibidores de IRES), fármacos que impiden el procesamiento normal de las proteínas del VHC (inhibidores de la glicosilación), fármacos que bloquean la entrada del VHC en las células (bloqueando su receptor) y agentes citoprotectores no específicos que bloquean la lesión celular provocada por la infección del virus. Además, también se están desarrollando enfoques moleculares para tratar la hepatitis C, por ejemplo, las ribozimas, que son enzimas que descomponen moléculas de ARN vírico específicas, oligonucleótidos antisentido, que son segmentos complementarios pequeños de ADN que se unen al ARN viral e inhiben la replicación vírica, y las técnicas de interferencia de ARN están bajo investigación (Bymock et al. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11:2; 79-95 (2000); De Francesco et al. in *Antiviral Research*, 58: 1-16 (2003); and Kronke et al., *J. Virol.*, 78:3436-3446 (2004).

20 El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) es un pestivirus que pertenece a la familia *Flaviviridae* y se ha usado como un sustituto para la prueba *in vitro* de posibles agentes antivirales. Aunque la actividad contra BVDV puede sugerir actividad contra otros flavivirus, a menudo un compuesto puede estar inactivo contra BVDV y activo contra otro flavivirus. Sommadossi y La Colla han revelado "Methods and compositions for treating flaviviruses and pestiviruses", PCT WO 01/92282) que los ribonucleósidos que contienen un grupo metilo en la posición 2' "ascendente" tienen actividad contra el BVDV. Sin embargo, no está claro si estos compuestos pueden inhibir otros flavivirus, incluyendo el VHC en cultivos celulares o a nivel de NS5B del VHC. Curiosamente, aunque esta publicación divulga un gran número de compuestos que son 2'-metil-2'-X-ribonucleósidos, donde X es un halógeno, no se considera el flúor. Además, estos inventores no muestran una vía sintética que conduce a nucleósidos halogenados en la posición 2' "descendente".

30 El virus del dengue (DENV) es el agente causal de la fiebre hemorrágica del dengue (FHD). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), dos quintas partes de la población mundial están ahora en riesgo de infección con este virus. Se estima que 500.000 casos de DHF requieren hospitalización cada año con una tasa de mortalidad del 5% en niños.

35 El virus del Nilo Occidental (VNO), un flavivirus que anteriormente solo se conocía que existía en las regiones intertropicales, ha surgido en los últimos años en las zonas templadas de Europa y América del Norte, lo que representa una amenaza para la salud pública. La manifestación más grave de infección por VNO es la encefalitis fatal en humanos. Se ha informado de brotes en la ciudad de Nueva York y casos esporádicos en el sur de los Estados Unidos desde 1999.

40 Actualmente no existe un tratamiento preventivo contra el VHC, el virus del dengue (DENV) o la infección por el virus del Nilo Occidental. Las terapias aprobadas actualmente, que existen solo contra el VHC, son limitadas. Los ejemplos de agentes antivirales que se han identificado como activos contra el flavivirus de la hepatitis C incluyen:

45 1) Inhibidores de la proteasa:

Se están investigando inhibidores de la proteasa NS3 basados en el sustrato (Attwood et al., PCT WO 98/22496, 1998.; Attwood et al., *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1999, 10, 259-273; Attwood et al., Preparación y uso de derivados de aminoácidos como agentes antivirales, Publicación de patente alemana. DE 19914474; Tung et al. inhibidores de las serina proteasas, particularmente la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C, PCT WO 98/17679), incluyendo alfacetoamidas e hidrazinoureas, e inhibidores que terminan en un electrófilo, como un ácido borónico o fosfonato (Llinas-Brunet et al., análogos de péptidos inhibidores de la hepatitis C, PCT WO 99/07734).

También se están investigando inhibidores de la proteasa NS3 no basados en sustrato, como derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitrobenzamida (Sudo K. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, 643-647; Sudo K. et al. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1998, 9, 186), incluyendo RD3-4082 y RD3-4078, el primero sustituido en la amida con una cadena de 14 carbonos y el último que procesa un grupo para-fenoxifenilo.

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

60 Varias patentes de Estados Unidos divulgan inhibidores de proteasa para el tratamiento del VHC. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.004.933 de Spruce et al. divulga una clase de inhibidores de la cisteína proteasa para inhibir la endopeptidasa 2 del VHC. La Patente de Estados Unidos N° 5.990.276 de Zhang et al. divulga

65

inhibidores sintéticos de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C. El inhibidor es una subsecuencia de un sustrato de la proteasa NS3 o un sustrato del cofactor NS4A. El uso de enzimas de restricción para tratar el VHC se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 5.538.865 de Reyes et al. Los péptidos como inhibidores de la serina proteasa NS3 del VHC se divulgan en la WO 02/008251 de Corvas International, Inc. y la WO 02/08187 y la WO 02/008256 de Schering Corporation. Los tripéptidos inhibidores del VHC se divulgan en las patentes de Estados Unidos N° 6.534.523, 6.410.531 y 6.420.380 de Boehringer Ingelheim y la WO 02/060926 de Bristol Myers Squibb. Los péptidos diarílicos como inhibidores de la serina proteasa NS3 del VHC se divulgan en la WO 02/48172 de Schering Corporation. Las imidazoleidinonas como inhibidores de la serina proteasa NS3 del VHC se divulgan en la WO 02/08198 de Schering Corporation y la WO 02/48157 de Bristol Myers Squibb. La WO 98/17679 de Vertex Pharmaceuticals y la WO 02/48116 de Bristol Myers Squibb también divulgan inhibidores de la proteasa del VHC.

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

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

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

5) Inhibidores de la helicasa (Diana G.D. et al., Compuestos, composiciones y métodos para el tratamiento de la hepatitis C, Patente de Estados Unidos N° 5.633.358; Diana G.D. et al., Derivados de piperidina, composiciones farmacéuticas de los mismos y su uso en el tratamiento de la hepatitis C, PCT WO 97/36554);

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

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

8) Inhibidores de la traducción dependiente de IRES (Ikeda N. et al., Agente para la prevención y tratamiento de la hepatitis C, Publicación de Patente Japonesa. JP-8268890; Kai Y. et al. Prevención y tratamiento de enfermedades víricas, Publicación de Patente Japonesa. JP-10101591);

9) Ribozimas, como las ribozimas resistentes a las nucleasas (Maccjak, D.J. et al., Hepatology 1999, 30, resumen 995) y las divulgadas en la Patente de Estados Unidos N° 6.043.077 de Barber et al. y las Patentes de Estados Unidos N° 5.869.253 y 5.610.054 de Draper et al.;

10) También se han desarrollado análogos de nucleósidos para el tratamiento de infecciones por Flaviviridae. Idenix Pharmaceuticals divulga el uso de ciertos nucleósidos ramificados en el tratamiento de flavivirus (incluyendo el VHC) y pestivirus en las Publicaciones Internacionales N° WO 01/90121 y WO 01/92282. Específicamente, un método para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C (y los flavivirus y los pestivirus) en humanos y otros animales huésped se divulga en las publicaciones de Idenix que incluyen la administración de una cantidad eficaz de un β -D o β -L nucleósido 1', 2', 3' o 4'-ramificado biológicamente activo o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de los mismos, administrados solos o en combinación con otro agente antiviral, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable.

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

Otras solicitudes de patente que divulgan el uso de ciertos análogos de nucleósidos para tratar la infección por el virus de la hepatitis C incluyen: PCT/CAOO/01316 (WO 01/32153; presentada el 3 de noviembre de 2000) y PCT/CAOI/00197 (WO 01/60315; presentada el 19 de febrero de 2001) presentada por BioChem Pharma, Inc. (ahora Shire Biochem, Inc.); PCT/LTSO2/01531 (WO 02/057425; presentada el 18 de enero de 2002) y PCT/U502/03086 (WO 02/057287; presentada el 18 de enero de 2002) presentada por Merck & Co., Inc., PCT/EPOT/09633 (WO 02/18404; publicada el 21 de agosto de 2001) presentada por Roche, y las Publicaciones de PCT N° WO 01/79246 (presentada el 13 de abril de 2001) WO 02/32920 (presentada el 18 de octubre de 2001) y la WO 02/48 165 de Pharmasset, Ltd.

La WO 2004/007512 de Merck & Co. divulga una serie de compuestos de nucleósidos divulgados como inhibidores de ARN polimerasa vírica dependiente de ARN. Los nucleósidos divulgados en esta publicación son principalmente nucleósidos 2'-metil-2'-hidroxi sustituidos. La WO 02/057287 de Merck et al. publicada el 25 de julio de 2002, divulga un género grandes de nucleósidos derivados de pirimidina de las sustituciones 2'-metil-2'-hidroxi. La WO 2004/009020 de Merck et al. divulga una serie de derivados de tionucleósidos como inhibidores de ARN polimerasa vírica dependiente del ARN. La WO 03/105770 de Merck et al. divulga una serie de derivados de nucleósidos carbocíclicos que son útiles para el tratamiento de infecciones por VHC.

La Publicación de PCT N° WO 99/43691 de la Universidad de Emory, titulada "2'-Fluoronucleósidos" divulga el uso de ciertos 2'-fluoronucleósidos para tratar la VHC. La Patente de Estados Unidos N° 6.348.587 de la Universidad de

Emory, titulada "2'-fluoronucleósidos", divulga una familia de 2'-fluoronucleósidos útiles para el tratamiento de la hepatitis B, el VHC, el VIH y la proliferación celular anormal. Se divulga que el sustituyente 2' está en la posición "ascendente" o "descendente".

5 Eldrup et al. (Sesión Oral V, Virus de la Hepatitis C, Flaviviridae; 16ª Conferencia Internacional sobre Investigación Antivírica (27 de abril de 2003, Savannah, Ga.)) Describió la relación de la actividad estructural de los nucleósidos 2'-modificado para la inhibición del VHC.

10 Bhat et al. (Sesión Oral V, Virus de la Hepatitis C, Flaviviridae; 16ª Conferencia Internacional sobre Investigación Antivírica (27 de abril de 2003, Savannah, Ga.); P A75) describen la síntesis y las propiedades farmacocinéticas de los análogos de nucleósidos como posibles inhibidores de la replicación del ARN del VHC. Los autores informan que los nucleósidos 2'-modificados muestran una potente actividad inhibidora en los ensayos de replicones basados en células.

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

15 11) Otros compuestos varios que incluyen 1-amino-alquilciclohexanos (Patente de Estados Unidos Nº 6.034.134 de Gold et al.), lípidos de alquilo (Patente de Estados Unidos Nº 5.922.757 de Chojkier et al.), vitamina E y otros antioxidantes (Patente de Estados Unidos Nº 5.922.757 de Chojkier et al.), escualeno, amantadina, ácidos biliares (Patente de Estados Unidos Nº 5.846.964 de Ozeki et al.), Ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico, (Patente de Estados Unidos Nº 5.830.905 de Diana et al.), benzenedicarboxamidas (Patente de Estados Unidos Nº 5.633.388 de Diana et al.), derivados del ácido poliadenílico (Patente de Estados Unidos Nº 5.496.546 de Wang et al.), 2,3-didesoxinosina (Patente de Estados Unidos Nº 5.026.687 de Yarchoan et al.), benzimidazoles (Patente de Estados Unidos Nº 5.891.874 de Colacino et al.), extractos de plantas (Patente de Estados Unidos Nº 5.837.257 de Tsai et al., Patente de Estados Unidos Nº 5.725.859 de Omer et al. y Patente de Estados Unidos Nº 6.056.961), y piperidinas (Patente de Estados Unidos Nº 5.830.905 de Diana et al.).

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

50 13) A continuación se muestra un resumen de varios fármacos en investigación, incluyendo varios tratados con anterioridad, que se encuentran actualmente en varias fases de desarrollo para el tratamiento del VHC:

Fármaco	Mecanismo/Objetivo	Empresa	Estado en los Estados Unidos
BILN-2061	Inhibidor de la serina-proteasa NS3	Boehringer Ingelheim	Fase II
ISIS 14803	Traducción antisentido/preventiva de ARN	ISIS/Elan	Fase II
Viramidina	Profármaco de ribavirina	Ribapharm	Fase II
NM 283	Inhibidor de ARN polimerasa del VHC	Idenix	Fase II/III
VX-497	Inhibidor de la IMPDH	Vértice	Fase I/II
JKT-003	Inhibidor de ARN polimerasa del VHC	Japan Tobacco/Akros	Fase I/II
Levovirina	Análogo de L-ribavirina	Ribapharm/Roche	Fase I/n

(continuación)

Fármaco	Mecanismo/Objetivo	Empresa	Estado en los Estados Unidos
Isatoribina; ANA245	Análogo de nucleósido que interactúa con el receptor TLR7	Anadys	Fase I
Albúferon	Modulador inmune	Human Genome Sciences	Fase I
Peg-Infergen	Modulador inmune	Intermune	Fase I
VX-950	Inhibidor de la proteasa NS3-4A del VHC	Vértice	Preclínico
SCH 6	Inhibidor de la proteasa NS3-4A del VHC	Schering Plough	Preclínico
R803	Inhibidor de la ARN polimerasa del VHC	Rigel	Fase I
HCV-086	-	ViroPharma/Wyeth	Fase I
R1479	Inhibidor de la ARN polimerasa del VHC	Roche	Fase I

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

A la luz del hecho de que la infección por VHC ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo y tiene efectos trágicos en el paciente infectado, sigue habiendo una gran necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos eficaces para tratar la hepatitis C que tenga baja toxicidad para el huésped.

Además, dada la creciente amenaza de otras infecciones por flaviviridae, sigue habiendo una gran necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos eficaces que tengan baja toxicidad para el huésped.

SUMARIO DE LA INVENCION

Actualmente no existe un tratamiento preventivo para la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del dengue (DENV) o el virus del Nilo Occidental (VNO), y las terapias aprobadas actualmente, que existen solo contra el VHC, son limitadas. El diseño y desarrollo de compuestos farmacéuticos es esencial, especialmente aquellos que son sinérgicos con otros *Flaviviridae* aprobados y en investigación, y en particular el VHC, la terapéutica para la evolución de los estándares de tratamiento, incluidas las terapias de combinación más eficaces.

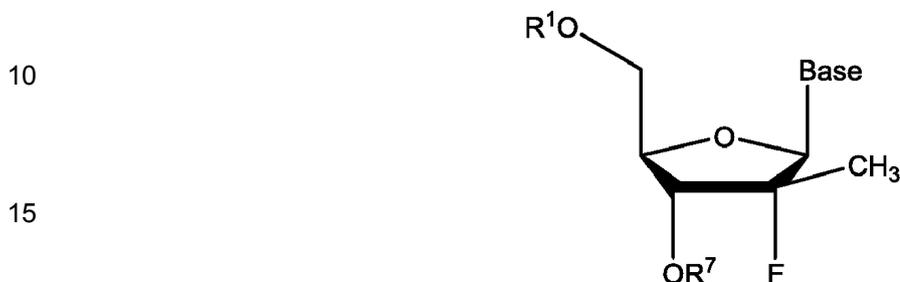
La presente invención proporciona un (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil nucleósido (β -D o β -L), o una de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el uso de tales compuestos para el tratamiento de un huésped infectado con un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, incluyendo la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla. Además, los nucleósidos de la presente invención muestran actividad contra rinovirus. Los rinovirus (RV) son virus pequeños (30 nm) no encapsulados, que contienen un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla dentro de una cápside icosaédrica (20 lados). Los RV pertenecen a la familia *Picornaviridae*, que incluye los géneros Enterovirus (poliovirus, coxsackievirus grupos A y B, echovirus, enterovirus numerados) y Hepatovirus (virus de la hepatitis A). Aproximadamente están identificados actualmente 101 serotipos. Los rinovirus se asocian con mayor frecuencia al resfriado común, la nasofaringitis, la tosferina, la neumonía, la otitis media y las exacerbaciones del asma.

El inventor ha hecho el descubrimiento inesperado de que las sustituciones 2' en los nucleósidos β -D o β -L de la presente invención imparten una mayor especificidad por el virus de la hepatitis C, además de mostrar una toxicidad menor después de la administración a un huésped. La invención también incluye compuestos para su uso en el tratamiento de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla e infección por rinovirus, que incluye la administración de una cantidad eficaz anti-vírica de un nucleósido β -D o β -L divulgado en la presente, o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en combinación o alternancia con otro agente antiviral eficaz.

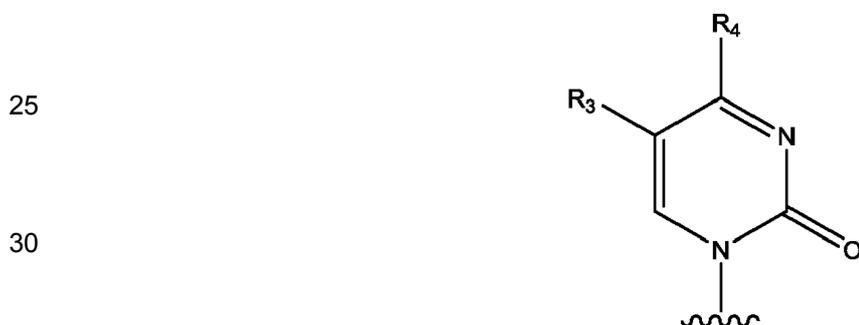
Los nucleósidos de la presente invención poseen las propiedades únicas de tener una especificidad mayor por el virus de la hepatitis C y una toxicidad menor en cultivo o cuando se administran a un animal. Una razón potencial, pero no limitativa, de esto es la presencia de la sustitución 2'-flúor en el anillo de ribosa. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.348.587 de Schinazi et al., divulga una familia de compuestos de nucleósidos 2'-fluoro que son útiles en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C. Por el contrario, son las

sustituciones 2'-metilo como las que se encuentran en la 2'-C-metilcitidina como se muestra en la WO 2004/02999 de Idenix en donde la sustitución 2'-metilo en el anillo de nucleósidos en la posición 2' no es específica de la hepatitis C.

5 Por tanto, en un aspecto, el nucleósido antivírico eficaz es un (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil nucleósido (β -D o β -L) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la fórmula general:



20 en donde la Base es



35 R^1 y R^7 son independientemente H, fosfato, incluyendo monofosfato, difosfato, trifosfato, H-fosfonato, acilo, alquilo C_1 - C_{10} , incluyendo alquilo inferior, alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo, fenil alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo sustituido o no sustituido, bifenil alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo sustituido o no sustituido, o naftil alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo sustituido o no sustituido;

40 R^3 y R^4 son independientemente H, halógeno (incluyendo F, Cl, Br, I), OH, OR', SH, SR', NH_2 , NHR' , NR'_2 , alquilo inferior de C_1 - C_6 , alquilo inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_1 - C_6 como CF_3 y CH_2CH_2F , alqueno inferior de C_2 - C_6 como $CH=CH_2$, alqueno inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_2 - C_6 como $CH=CHC_1$, $CH=CHBr$ y $CH=CHI$, alqueno inferior de C_2 - C_6 como $C=CH$, alqueno inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_2 - C_6 , alcoxi inferior de C_1 - C_6 como CH_2OH y CH_2CH_2OH , alcoxi inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_1 - C_6 , CO_2H , CO_2R' , $CONH_2$, $CONHR'$, $CONR'_2$, $CH=CHCO_2H$, $CH=CHCO_2R'$;

45 R' es un alquilo opcionalmente sustituido de C_1 - C_{12} (particularmente cuando el alquilo es un residuo de aminoácido), cicloalquilo, alqueno opcionalmente sustituido de C_2 - C_6 , alqueno inferior opcionalmente sustituido de C_2 - C_6 , u opcionalmente acilo sustituido.

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

55 La presente invención también proporciona en varios aspectos, compuestos para su uso en el tratamiento o profilaxis de infección por el virus de la hepatitis C, infección por el virus del Nilo Occidental, una infección vírica de fiebre amarilla o una infección por rinovirus que comprende administrar a un huésped una cantidad antivírica de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil nucleósido descrito en la presente. La invención también incluye compuestos para su uso en el tratamiento o la prevención de la infección por *Flaviviridae*, incluidos todos los miembros del género Hepacivirus (VHC), el género Pestivirus (BVDV, CSFV, BDV) o el género Flavivirus (virus del dengue, grupo del virus de la encefalitis japonesa (incluido el virus del Nilo Occidental). Virus), y el virus de la fiebre amarilla).

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

65

enriquecido enantioméricamente.

La presente invención también proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una infección por el virus de la hepatitis C, una infección por el virus del Nilo Occidental, una infección vírica de fiebre amarilla o una infección por rinovirus en un huésped que comprende administrar una cantidad eficaz de un (2'R)-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil nucleósido (β -D o β -L) divulgados en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación o alternancia con uno o más agentes antivirales eficaces, opcionalmente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable de los mismos, como se describe en la presente. Los ejemplos no limitativos de los tipos de agentes antivirales o sus profármacos que pueden usarse en combinación con los compuestos divulgados en la presente incluyen, pero no están limitados a: interferón, incluyendo el interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, un interferón pegilado, interferón beta, interferón gamma, interferón tau e interferón omega; una interleucina, incluyendo la interleucina 10 y la interleucina 12; ribavirina; interferón en combinación con ribavirina; un inhibidor de proteasa incluyendo un inhibidor de NS3; un inhibidor de helicasa; un inhibidor de la polimerasa; gliotoxina; un inhibidor de IRES; y un oligonucleótido antisentido; un derivado de tiazolidina; una benzanilida, una ribozima; otro nucleósido, profármaco de nucleósido o derivado de nucleósido; un 1-amino-alquilciclohexano; un antioxidante incluyendo vitamina E; escualeno; amantadina; un ácido biliar; ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico; una bencenodocarboxamida; ácido poliadnéilico; un bencimidazol; timosina; un inhibidor de beta tubulina; una vacuna profiláctica; fitosoma de silibina-fosfatidilcolina; y micofenolato.

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

1) alquilando el bloque de construcción de carbohidratos apropiadamente modificado, posterior fluoración, seguido de acoplamiento para formar los nucleósidos de la presente invención (Esquema 1) o

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

Además, los L-enantiómeros correspondientes a los compuestos de la invención pueden prepararse siguiendo los mismos métodos generales (Esquemas 1 ó 2), comenzando con el correspondiente bloque de construcción de L-carbohidrato o L-enantiómero de nucleósido como material de partida.

Por tanto, la presente invención incluye por lo menos las siguientes características generales:

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

(b) procesos para la preparación de los nucleósidos β -D y β -L de la fórmula general divulgada, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como se describe en la presente;

(c) composiciones farmacéuticas que comprenden un nucleósido β -D o β -L de las fórmulas generales divulgadas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente, para el tratamiento o la profilaxis de una infección vírica en un huésped;

(d) composiciones farmacéuticas que comprenden un nucleósido β -D o β -L de las fórmulas generales divulgadas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más agentes antivirales eficaces, opcionalmente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente, para el tratamiento o la profilaxis de una infección vírica en un huésped;

(e) compuestos para su uso en métodos para el tratamiento o la profilaxis de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla e infección por rinovirus en un huésped, que comprende administrar una cantidad eficaz de un nucleósido β -D o β -L de las fórmulas generales divulgadas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente;

(f) compuestos para su uso en métodos para el tratamiento o la profilaxis de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla e infección por rinovirus en un huésped, que comprende administrar una cantidad eficaz de un nucleósido β -D o β -L de las fórmulas generales divulgadas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación o alternancia con uno o más agentes antivirales eficaces, opcionalmente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente;

(g) el uso de un nucleósido β -D o β -L de las fórmulas generales divulgadas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, como se describe en la

presente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla e infección por rinovirus en un huésped;

5 (h) el uso de un nucleósido β -D o β -L de las fórmulas generales divulgadas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación o alternancia con uno o más agentes antivirales eficaces, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, como se describe en la presente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla e infección por rinovirus en un huésped.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La **Figura 1** es una representación gráfica de la reducción dependiente de la dosis del replicón de ARN del VHC basado en el tratamiento con β -D-(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. **(A)** : La reducción vírica se comparó con la reducción de los niveles de ARN celular (ARN ribosómico) para obtener valores del índice terapéutico. Se determinó que EC_{90} , que representa la concentración eficaz del 90% a las 96 horas después de la administración dependiente de la dosis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina, era de 5 μ M. **(B)**: El ARN del VHC se redujo significativamente de manera dependiente de la dosis durante 7 días después del tratamiento con 25 μ M.

20 La **Figura 2** representa el cambio de peso medio (%) de ratones suizos hembra en el estudio de toxicidad de β -D-(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina a varias dosis. Las inyecciones intraperitoneales se administraron en los días 0 al día 5 de los 0, 3,3, 10, 33, 100 mg/kg. Cada grupo de dosificación contenía 5 ratones y ningún ratón murió durante el estudio de 30 días.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Se describen ahora con detalle varias realizaciones de la invención. Tal como se usa en la descripción de la presente y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "un", "uno" y "el" incluye una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, como se usa en la descripción de la presente y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

35 Los términos usados en esta especificación tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos que se usan para describir la invención se tratan a continuación, o en otro lugar de la especificación, para proporcionar una orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones y los métodos de la invención y cómo elaborarlos y usarlos. Por conveniencia, ciertos términos pueden estar resaltados, por ejemplo, usando cursiva y/o comillas. El uso del resaltado no tiene influencia en el alcance y significado de un término; el alcance y el significado de un término es el mismo, en el mismo contexto, esté o no resaltado. Se apreciará que lo mismo se puede decir de más de una manera. Por consiguiente, puede usarse un lenguaje y sinónimos alternativos para uno o más de los términos tratados en la presente, y no debe colocarse ningún significado especial sobre si un término se elabora o trata en la presente. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. Una enumeración de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de esta especificación, incluidos los ejemplos de los términos tratados en la presente, es solo ilustrativo, y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. De igual manera, la invención no se limita a las varias realizaciones proporcionadas en esta especificación.

40 Como se usa en la presente, "alrededor de" o "aproximadamente" significará generalmente dentro del 20 por ciento, preferiblemente dentro del 10 por ciento, y más preferiblemente dentro del 5 por ciento de un valor o intervalo dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente son aproximadas, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" se puede inferir si no se establece expresamente.

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

50 Los compuestos divulgados o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos son útiles en la prevención y el tratamiento de infecciones por VHC. Además, estos compuestos o formulaciones pueden usarse de manera profiláctica para

prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad clínica en individuos que son positivos para el antígeno anti-VHC o que han estado expuestos al VHC.

5 Los compuestos descritos en la presente pueden convertirse en un éster farmacéuticamente aceptable por reacción con un agente esterificante apropiado, por ejemplo, un haluro o anhídrido de ácido. El compuesto o su derivado farmacéuticamente aceptable puede convertirse en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de una manera convencional, por ejemplo, por tratamiento con una base apropiada. El éster o la sal del compuesto puede convertirse en el compuesto original, por ejemplo, por hidrólisis.

10 Definiciones

15 El término "independientemente" se usa en la presente para indicar que la variable, que se aplica independientemente, varía independientemente de una aplicación a otra. Así, en un compuesto tal como R^aXYR^a , en el que R^a es "independientemente carbono o nitrógeno", ambos R^a pueden ser carbono, ambos R^a pueden ser nitrógeno, o un R^a puede ser carbono y el otro R^a nitrógeno.

20 Como se usa en la presente, los términos "enantioméricamente puro" o "enantioméricamente enriquecido" se refieren a una composición de nucleósidos que comprende por lo menos aproximadamente el 95%, y preferiblemente aproximadamente el 97%, 98%, 99% o 100% de un único enantiómero de ese nucleósido.

25 Como se usa en la presente, el término "sustancialmente libre de" o "sustancialmente en ausencia de" se refiere a una composición de nucleósidos que incluye por lo menos un 85 o 90% en peso, preferiblemente del 95% al 98% en peso, e incluso más preferiblemente del 99% al 100% en peso, del enantiómero designado de ese nucleósido. En una realización preferida, en los métodos y compuestos de esta invención, los compuestos están sustancialmente libres de enantiómeros.

30 De manera similar, el término "aislado" se refiere a una composición de nucleósidos que incluye por lo menos el 85 o el 90% en peso, preferiblemente del 95% al 98% en peso, e incluso más preferiblemente del 99% al 100% en peso, del nucleósido, el resto comprendiendo otras especies químicas o enantiómeros.

35 El término "alquilo", como se usa en la presente, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico, primario, secundario o terciario de típicamente C_1 a C_{10} , e incluye específicamente metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos alquilo tanto sustituidos como no sustituidos. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más fracciones seleccionadas del grupo que consiste de hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, o cualquier otro grupo funcional viable que no inhiba la actividad farmacológica de este compuesto, ya sea desprotegido o protegido, según sea necesario, como saben los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis" 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

45 El término "alquilo inferior", como se usa en la presente, y, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un grupo alquilo C_1 a C_4 lineal, ramificado o, si es apropiado, cíclico saturado (por ejemplo, ciclopropilo) alquilo, que incluye formas tanto sustituidas como no sustituidas. A menos que se indique específicamente lo contrario en esta solicitud, cuando el alquilo es una fracción adecuada, se prefiere el alquilo inferior. De manera similar, cuando el alquilo o alquilo inferior es una fracción adecuada, se prefiere alquilo o alquilo inferior no sustituido.

50 Los términos "alquilamino" o "arilamino" se refieren a un grupo amino que tiene uno o dos sustituyentes alquilo o arilo, respectivamente.

55 El término "protegido", como se usa en la presente y, a menos que se defina lo contrario, se refiere a un grupo que se añade a un átomo de oxígeno, nitrógeno o fósforo para prevenir su reacción adicional o con otros propósitos. Los expertos en la técnica de la síntesis orgánica conocen una amplia variedad de grupos protectores de oxígeno y nitrógeno. Ejemplos no limitativos incluyen: $C(O)$ -alquilo, $C(O)Ph$, $C(O)arilo$, CH_3 , CH_2 -alquilo, CH_2 -alquenilo, CH_2Ph , CH_2 -arilo, CH_2O -alquilo, CH_2O -arilo, SO_2 -alquilo, SO_2 -arilo, *tert*-butildimetilsililo, *tert*-butildifenilsililo y 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno).

60 El término "arilo", como se usa en la presente, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a fenilo, bifenilo o naftilo, y preferiblemente fenilo. El término incluye fracciones tanto sustituidas como no sustituidas. El grupo arilo puede estar sustituido con una o más fracciones seleccionadas del grupo que consiste de hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, ya sea desprotegido, o protegido según sea necesario, como saben los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

65 Los términos "alcarilo" o "alquilarilo" se refieren a un grupo alquilo con un sustituyente arilo. Los términos

"aralquilo" o "arilalquilo" se refieren a un grupo arilo con un sustituyente alquilo.

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

5 El término "acilo" se refiere a un éster de ácido carboxílico en el que la fracción no carbonilo del grupo éster se selecciona de alquilo lineal, ramificado o cíclico o alquilo inferior, alcoxilalquilo incluyendo metoximetilo, aralquilo incluyendo bencilo, ariloxialquilo como fenoximetilo, arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido con halógeno (F, Cl, Br, I), alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, ésteres de sulfonato como alquilo o aralquilo sulfonilo incluyendo metanosulfonilo, el éster mono, di o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo (por ejemplo, dimefil-t-butilsililo) o difenilmefilsililo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo.

El término "acilo inferior" se refiere a un grupo acilo en el que la fracción no carbonilo es alquilo inferior.

15 El término "acilo" se refiere a un grupo de la fórmula C(O)R', en donde R' es un alquilo lineal, ramificado o cíclico (incluyendo alquilo inferior), aminoácido, arilo incluyendo fenilo, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxilalquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo como fenoximetilo; o alquilo sustituido (incluyendo alquilo inferior), arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido con cloro, bromo, fluoro, yodo, alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, ésteres de sulfonato como alquil o aralquil sulfonilo, incluyendo metanosulfonilo, el éster mono, di o trifosfato, tritilo o monometoxi-tritilo, bencilo sustituido, alcarilo, aralquilo incluyendo bencilo, alcoxilalquilo incluyendo metoxietilo, ariloxialquilo como fenoximetilo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo. En particular, los grupos acilo incluyen acetilo, trifluoroacetilo, metilacetilo, ciclopropilacetilo, ciclopropilcarboxilo, propionilo, butirilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, neo-heptanoilo, fenilacetilo, 2-acetoxi-2-fenilacetilo, difenilacetilo, α -metoxi- α -trifluorometil-fenilacetilo, bromoacetilo, 2-nitro-bencenoacetilo, 4-cloro-bencenoacetilo, 2-cloro-2,2-difenilacetilato, 2-cloro-2-fenilacetilo, trimetilacetilo, clorodifluoro-acetilo, perfluoro acetilo, fluoroacetilo, bromodifluoroacetilo, metoxiacetilo, 2-tiofenacetilo, clorosulfonilacetilo, 3-metoxifenilacetilo, fenoxiacetilo, terc-butilacetilo, tricloroacetilo, monocloro-acetilo, dicloroacetilo, 7H-dodecafluoro-heptanoilo, perfluoro-heptanoilo, 7H-dodeca-fluoroheptanoilo, 7-clorododecafluoro-heptanoilo, 7-cloro-dodecafluoro-heptanoilo, 7H-dodecafluoroheptanoilo, 7H-dodeca-fluoroheptanoilo, nona-fluoro-3,6-dioxa-heptanoilo, nonafluoro-3,6-dioxaheptanoilo, perfluoroheptanoilo, metoxibenzoilo, metil 3-amino-5-feniltiofeno-2-carboxilo, 3,6-dicloro-2-metoxibenzoilo, 4-(1,1,2,2-tetrafluoro-etoxi)-benzoilo, 2-bromo-propionilo, omega-aminocaprilol, decanoilo, n-pentadecanoilo, estearilo, 3-ciclopentil-propionilo, 1-benceno-carboxilo, O-acetilmandelilo, pivaloil acetilo, 1-adamantano-carboxilo, ciclohexano-carboxilo, 2,6-piridindicarboxilo, ciclopropano-carboxilo, cicloputano-carboxilo, cicloputano-carboxilo, cicloputano-carboxilo, perfluorociclohexil carboxilo, 4-metilbenzoilo, clorometil isoxazolil carbonilo, perfluorociclohexil carboxilo, crotonilo, 1-metil-1H-indazol-3-carbonilo, 2-propenilo, isovalerilo, 1-pirrolidincarbonilo, 4-fenilbenzoilo. Cuando se usa el término acilo, se pretende que sea una divulgación específica e independiente de acetilo, trifluoroacetilo, metilacetilo, ciclopropilacetilo, propionilo, butirilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, neo-heptanoilo, fenilacetilo, difenilacetilo, trifluorometil-fenilacetilo, bromoacetilo, 4-cloro-bencenoacetilo, 2-cloro-2,2-difenilacetilo, 2-cloro-2-fenilacetilo, trimetilacetilo, clorodifluoro-acetilo, perfluoroacetilo, fluoroacetilo, bromodifluoroacetilo, 2-tiofenacetilo, terc-butilacetilo, tricloroacetilo, monocloro-acetilo, dicloroacetilo, metoxibenzoilo, 2-bromo-propionilo, decanoilo, n-pentadecanoilo, estearilo, 3-ciclopentil-propionilo, 1-benceno-carboxilo, pivaloil acetilo, 1-adamantano-carboxilo, ciclohexano-carboxilo, 2,6-piridindicarboxilo, ciclopropano-carboxilo, ciclobutano-carboxilo, 4-metilbenzoilo, crotonilo, 1-metil-1H-indazol-3-carbonilo, 2-propenilo, isovalerilo, 4-fenilbenzoilo.

45 El término "aminoácido" incluye aminoácidos α , β y δ de origen natural y sintético, e incluye, pero no está limitado a, aminoácidos encontrados en proteínas, es decir glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En una realización preferida, el aminoácido está en la configuración 1. Alternativamente, el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroilo, lisinilo, argininilo, histidinilo, β -alanilo, β -valinilo, β -leucinilo, β -isoleucinilo, β -prolinilo, β -fenilalaninilo, β -triptofanilo, β -metioninilo, β -glicinilo, β -serinilo, β -treoninilo, β -cisteinilo, β -tirosinilo, β -asparaginilo, β -glutaminilo, β -aspartoilo, β -glutaroilo, β -lisinilo, β -argininilo o β -histidinilo. Cuando se usa el término aminoácido, se considera que es una divulgación específica e independiente de cada uno de los ésteres de α , β , γ o δ glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina en las configuraciones D y L.

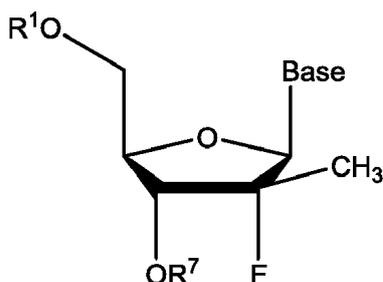
60 El término "huésped", como se usa en la presente, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el que el virus puede replicarse, incluyendo líneas celulares y animales, y preferiblemente un humano. Alternativamente, el huésped puede llevar una parte del genoma vírico, cuya replicación o funciones pueden ser alteradas por los compuestos de la presente invención. El término huésped se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma vírico, y animales, en particular, primates y humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el huésped es un paciente humano. Las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, sin embargo, están claramente previstas en la presente invención.

65 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se usa a lo largo de la especificación para describir cualquier

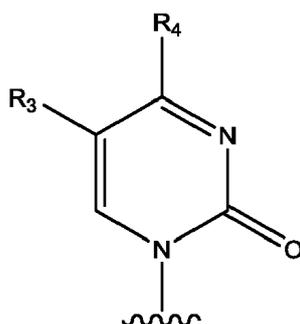
forma farmacéuticamente aceptable (como un éster, éster de fosfato, sal de un éster o un grupo relacionado) de un compuesto que, tras la administración a un paciente, proporciona el compuesto activo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos como potasio y sodio, metales alcalinotérreos como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

I. Compuesto activo, y derivados fisiológicamente aceptables y sales del mismo

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



en donde la Base es

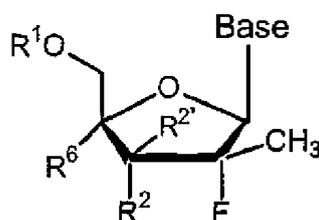


R¹ y R⁷ son independientemente H, fosfato, incluyendo monofosfato, difosfato, trifosfato, H-fosfonato, acilo, alquilo C₁-C₁₀, incluyendo alquilo inferior, alquilo C₁-C₁₀ sulfonilo, fenil alquilo C₁-C₁₀ sulfonilo sustituido o no sustituido, bifenil alquil C₁-C₁₀ sulfonilo sustituido o no sustituido, o naftil alquilo C₁-C₁₀ sulfonilo sustituido o no sustituido;

R³ y R⁴ son independientemente H, halógeno incluyendo F, Cl, Br, I, OH, OR', SH, SR', NH₂, NHR', NR'₂, alquilo inferior de C₁-C₆, alquilo inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C₁-C₆ como CF₃ y CH₂CH₂F, alqueno inferior de C₂-C₆ como CH=CH₂, alqueno inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C₂-C₆ como CH=CHCl, CH=CHBr y CH=CHI, alquino inferior de C₂-C₆ como C=CH, alquino inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C₂-C₆, alcoxi inferior de C₁-C₆, alcoxi inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C₁-C₆, CO₂H, CO₂R', CONH₂, CONHR', CONR'₂, CH=CHCO₂H, CH=CHCO₂R';

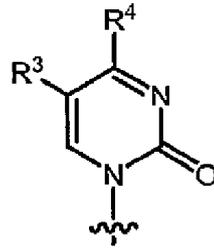
R' es un alquilo opcionalmente sustituido de C₁-C₁₂ (particularmente cuando el alquilo es un residuo de aminoácido), cicloalquilo, alquino opcionalmente sustituido de C₂-C₆, alqueno inferior opcionalmente sustituido de C₂-C₆, u opcionalmente acilo sustituido.

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



en donde Base es:

5



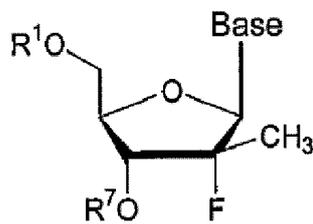
10

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

15

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

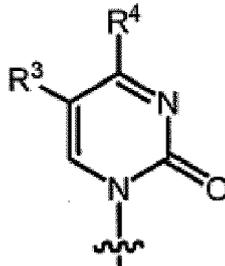
20



25

en donde Base es:

30



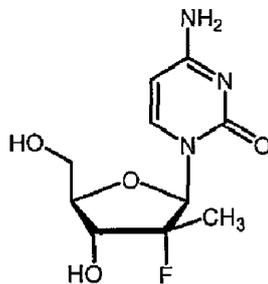
35

40

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

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

45



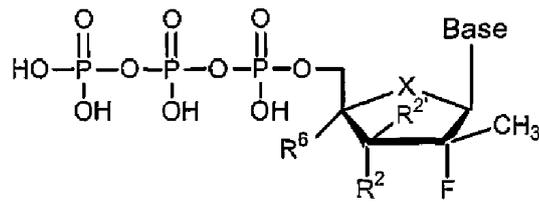
50

55

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

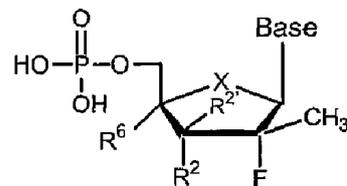
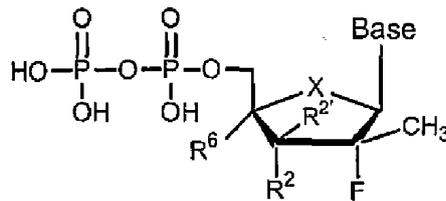
60

65



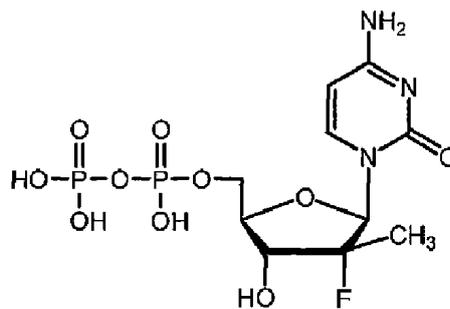
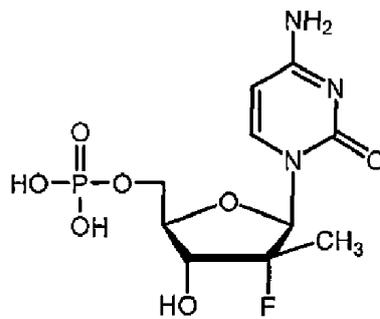
10 en donde X es O, y Base, R², R^{2'} y R⁶ son como se han definido anteriormente.

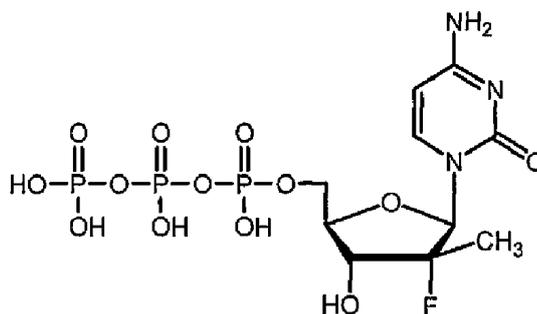
También se pretende que los compuestos de la presente invención incluyan sales farmacéuticamente aceptables del éster de trifosfato así como sales farmacéuticamente aceptables de derivados de éster de 5'-difosfato y 5'-monofosfato de las siguientes fórmulas estructurales, respectivamente.



en donde Base, X, R², R^{2'} y R⁶ son como se han definido anteriormente.

35 Ejemplos no limitativos adicionales de derivados de ácido fosfórico son los nucleósidos de la presente invención que se muestran a continuación:





En las varias realizaciones, se prefieren los derivados fluorados. El flúor se ve como "isostérico" con hidrógeno debido a su tamaño (el radio de Van der Waals para H es 1.20Å y para F 1.35Å). Sin embargo, el peso atómico (18.998) y la electronegatividad del flúor (4.0 [escala de Pauling], 4.000 [escala de Sanderson]) son más similares al oxígeno (3.5 [Pauling], 3.654 [Sanderson]) que al hidrógeno (2.1 [Pauling], 2.592 [Sanderson]) (March, J., "Advances in Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure", Tercera edición, 1985, p. 14., Wiley Interscience, Nueva York). Se sabe que el flúor es capaz de formar un enlace de hidrógeno, pero a diferencia de un grupo hidroxilo (que puede actuar tanto como aceptor de protones como donante de protones), el flúor actúa solo como aceptor de protones. Por otra parte, los 2'-fluoro-ribonucleósidos pueden verse como análogos de tanto los ribonucleósidos como los desoxinucleósidos. Pueden ser mejor reconocidos por la ARN polimerasa vírica a nivel de trifosfato que por la ARN polimerasa del huésped, inhibiendo por tanto selectivamente la enzima vírica.

II. Sales farmacéuticamente aceptables

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

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico como una amina con un ácido adecuado produciendo un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden elaborar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

III. Composiciones farmacéuticas

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

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

La cantidad de compuesto incluido en las formulaciones terapéuticamente activas, de acuerdo con la

presente invención, es una cantidad eficaz para tratar la infección o afección, en realizaciones preferidas, una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo occidental, el virus de la fiebre amarilla y una infección por rinovirus. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto en forma de dosificación farmacéutica varía habitualmente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 2.000 mg o más, dependiendo del compuesto usado, la afección o infección tratada y la vía de administración. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad profilácticamente o preventivamente eficaz de las composiciones, de acuerdo con la presente invención, cae dentro del mismo intervalo de concentración como se expuso anteriormente para una cantidad terapéuticamente eficaz y es habitualmente la misma que una cantidad terapéuticamente eficaz.

La administración del compuesto activo puede variar de continuo (goteo intravenoso) a varias administraciones orales por día (por ejemplo, cuatro veces al día, dos veces al día) y puede incluir administración oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente potenciador de la penetración), bucal y de supositorios, entre otras vías de administración. También pueden usarse comprimidos orales con recubrimiento entérico para mejorar la biodisponibilidad y la estabilidad de los compuestos de una vía de administración oral. La forma de dosificación más eficaz dependerá de la farmacocinética del agente particular elegido, así como de la gravedad de la enfermedad en el paciente. Se prefieren particularmente las formas de dosificación oral, debido a la facilidad de administración y al posible cumplimiento favorable por parte del paciente.

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

Para formulaciones parenterales, el portador comprenderá habitualmente agua estéril o solución acuosa de cloruro de sodio, aunque también se pueden incluir otros ingredientes, incluyendo aquellos que ayudan a la dispersión. Cuando se usa agua estéril y se mantiene como estéril, las composiciones y los portadores también deben esterilizarse. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores, agentes de suspensión y similares apropiados líquidos.

Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a antígenos víricos) también pueden prepararse mediante métodos convencionales para producir portadores farmacéuticamente aceptables. Esto puede ser apropiado para el suministro de nucleósidos libres de los compuestos de nucleósidos de acuerdo con la presente invención.

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

Los compuestos de acuerdo con la presente invención, debido a su baja toxicidad para las células huésped en ciertos casos, pueden emplearse ventajosamente de manera profiláctica para prevenir una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla, y una infección por rinovirus o prevenir la aparición de síntomas clínicos asociados con la infección o condición vírica. En este aspecto, las presentes composiciones se usan para prevenir o retrasar la aparición de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo occidental, el virus de la fiebre amarilla, y una infección por rinovirus. Este método profiláctico comprende la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento, o que está en riesgo de desarrollar el virus o la afección, una cantidad de un compuesto de acuerdo con la presente invención, eficaz para aliviar, prevenir o retrasar la aparición de la infección vírica o condición. En el tratamiento profiláctico, se prefiere que el compuesto antivírico utilizado tenga una baja toxicidad y preferiblemente no sea tóxico para el paciente. Se prefiere particularmente en este aspecto de la presente invención que el compuesto que se usa deba ser lo más eficaz posible contra el virus o la afección y muestre un mínimo de toxicidad para el paciente. En el caso de una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo

Occidental, el virus de la fiebre amarilla, y una infección por rinovirus, los compuestos de acuerdo con la presente invención, que pueden usarse para tratar estos estados de enfermedad, pueden administrarse dentro del mismo intervalo de dosificación para el tratamiento terapéutico (es decir, de aproximadamente 250 microgramos hasta 1 gramo o más de una a cuatro veces al día para una forma de dosificación oral) como un agente profiláctico para prevenir la proliferación de la infección vírica, o alternativamente, para prolongar el inicio de la infección vírica, que se manifiesta ella misma en los síntomas clínicos.

Además, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en combinación o alternancia con uno o más agentes antivirales, incluyendo otros compuestos de la presente invención. Ciertos compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser eficaces para mejorar la actividad biológica de ciertos agentes de acuerdo con la presente invención al reducir el metabolismo, el catabolismo o la inactivación de otros compuestos y, como tales, se co-administran para este efecto deseado.

IV. Estereoisomería y polimorfismo

Se aprecia que los nucleósidos de la presente invención tienen varios centros quirales y pueden existir y aislarse en formas ópticamente activas y racémicas. Algunos compuestos pueden mostrar polimorfismo. Debe entenderse que la presente invención abarca cualquier forma racémica, ópticamente activa, diastereomérica, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, de un compuesto de la invención, que posea las propiedades útiles descritas en la presente. Es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas (por ejemplo, por resolución de la forma racémica por técnicas de recristalización, por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, por síntesis quiral o por separación cromatográfica usando una fase estacionaria quiral).

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

De igual manera, la mayoría de los aminoácidos son quirales (designados como L o D, en donde el enantiómero L es la configuración de origen natural) y pueden existir como enantiómeros separados.

Ejemplos de métodos para obtener materiales ópticamente activos son conocidos en la técnica, e incluyen por lo menos los siguientes.

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

ii) cristalización simultánea - una técnica mediante la cual los enantiómeros individuales se cristalizan por separado a partir de una solución del racemato, posible solamente si este último es un conglomerado en estado sólido;

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

iv) síntesis enzimática asimétrica - una técnica sintética mediante la cual por lo menos un paso de la síntesis usa una reacción enzimática para obtener un precursor sintético enantioméricamente puro o enriquecido del enantiómero deseado;

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

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

vii) transformaciones asimétricas de primer y segundo orden - una técnica mediante la cual los diastereoisómeros del racemato se equilibran para producir una preponderancia en solución del diastereómero a partir del enantiómero deseado o donde la cristalización preferencial del diastereómero a partir del enantiómero deseado perturba el equilibrio de tal manera que eventualmente en principio, todo el material se convierte en el diastereómero cristalino a partir del enantiómero deseado. El enantiómero deseado se libera del diastereómero;

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

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

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

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

xii) extracción con solventes quirales - una técnica mediante la cual los enantiómeros se separan en virtud de la disolución preferencial de un enantiómero en un solvente quiral particular;

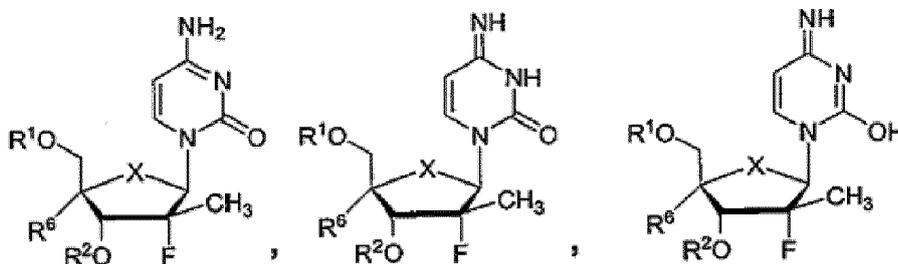
xiii) transporte a través de membranas quirales - una técnica mediante la cual un racemato se coloca en contacto con una barrera de membrana delgada. La barrera separa típicamente dos fluidos miscibles, uno que contiene el racemato, y una fuerza impulsora, como la concentración o el diferencial de presión provoca un transporte preferencial a través de la barrera de la membrana. La separación tiene lugar como resultado de la naturaleza quiral no racémica de la membrana que permite que solo pase un enantiómero del racemato.

En una realización se usa cromatografía quiral, incluyendo la cromatografía de lecho móvil simulada. Una amplia variedad de fases estacionarias quirales están disponibles comercialmente.

Algunos de los compuestos descritos en la presente contienen enlaces dobles olefinicos y, a menos que se especifique lo contrario, incluyen isómeros geométricos tanto E como Z.

Además, algunos de los nucleósidos descritos en la presente pueden existir como tautómeros, como los tautómeros de ceto-enol. Se pretende que los tautómeros individuales, así como las mezclas de los mismos, estén incluidos dentro de los compuestos de la presente invención como se ilustra a continuación.

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



En el ejemplo anterior, la primera estructura dibujada es la forma preferida.

V. Derivados

El compuesto activo puede administrarse como cualquier sal que después de la administración al receptor sea capaz de proporcionar directa o indirectamente el compuesto original, o que presente actividad por sí misma. Ejemplos no limitativos son las sales farmacéuticamente aceptables (referidas alternativamente como "sales fisiológicamente aceptables"). Además, las modificaciones pueden afectar a la actividad biológica del compuesto, en algunos casos aumentando la actividad sobre el compuesto original. Esto se puede evaluar fácilmente preparando la

sal y probando su actividad antivírica de acuerdo con los métodos descritos en la presente, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Sales farmacéuticamente aceptables

5 En los casos en que los compuestos son lo suficientemente básicos o ácidos para formar sales de ácidos o bases no tóxicas estables, puede ser apropiada la administración del compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácidos orgánicos formadas mediante la adición de ácidos, que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorato, a-cetoglutarato, a-glicerofosfato, formiato, fumarato, propionato, glicolato, lactato, piruvato, oxalato, maleato y salicilato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, incluyendo sales de sulfato, nitrato, bicarbonato, carbonato, bromhidrato y ácido fosfórico. En una realización preferida, la sal es una sal de mono- o di-clorhidrato.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico como una amina con un ácido adecuado proporcionando un anión fisiológicamente aceptable. También pueden elaborarse sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos. En una realización, la sal es una sal de clorhidrato, bromhidrato o mesilato del compuesto. En otra realización, la sal farmacéuticamente aceptable es un diclorhidrato, dibromhidrato o sal de dimesilato.

VI. Terapia de combinación o alternancia

25 En otra realización, para el tratamiento, inhibición, prevención y/o profilaxis de cualquier infección vírica descrita en la presente, el compuesto activo o su derivado o sal puede administrarse en combinación o alternancia con otro agente antiviral. En general, en terapia de combinación, las dosificaciones eficaces de dos o más agentes se administran juntas, mientras que durante la terapia de alternancia, se administra en serie una dosificación eficaz de cada agente. La dosificación dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Se debe tener en cuenta que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes y los programas de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

35 Se ha reconocido que pueden surgir variantes de flavivirus, pestivirus o VHC resistentes a los fármacos después de un tratamiento prolongado con un agente antiviral. La resistencia al fármaco tiene lugar más comúnmente por la mutación de un gen que codifica una enzima usada en la replicación vírica. La eficacia de un fármaco contra la infección vírica puede prolongarse, aumentarse o restablecerse administrando el compuesto en combinación o alternancia con un segundo, y quizás tercero, compuesto antivírico que induce una mutación diferente de la causada por el fármaco principal. Alternativamente, puede alterarse la farmacocinética, la biodistribución u otro parámetro del fármaco mediante dicha terapia de combinación o alternancia. En general, se prefiere generalmente la terapia de combinación a la terapia de alternancia porque induce múltiples estreses simultáneos en el virus.

45 Por ejemplo, un experto en la técnica reconocerá que puede usarse cualquier fármaco o terapia antivírica en combinación o alternancia con cualquier nucleósido de la presente invención. Cualquiera de los tratamientos víricos descritos en los Antecedentes de la invención pueden usarse en combinación o alternancia con los compuestos descritos en esta especificación. Los ejemplos no limitativos de los tipos de agentes antivirales o sus profármacos que pueden usarse en combinación con los compuestos divulgados en la presente incluyen: interferón, incluyendo interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, un interferón pegilado, interferón beta, interferón gamma, interferón tau e interferón omega; una interleucina, incluyendo la interleucina 10 y la interleucina 12; ribavirina; interferón alfa o interferón pegilado en combinación con ribavirina o levovirina; levovirina; un inhibidor de la proteasa incluyendo un inhibidor de NS3, un inhibidor de NS3-4A; un inhibidor de la helicasa; un inhibidor de la polimerasa incluyendo un inhibidor de la ARN polimerasa del VHC y de la polimerasa NS5B; gliotoxina; un inhibidor de IRES; y un oligonucleótido antisentido; un derivado de tiazolidina; una benzanihida, una ribozima; otro nucleósido, profármaco de nucleósido o derivado de nucleósido; un 1-amino-alkilciclohexano; un antioxidante incluyendo la vitamina E; escualeno amantadina; un ácido biliar; ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico; una bencenodicarboxamida; ácido poliadenílico; un bencimidazol; timosina; un inhibidor de beta tubulina; una vacuna profiláctica; un modulador inmune, un inhibidor de IMPDH; fitosoma de silibina-fosfatidilcolina; y micofenolato.

60 Ejemplos adicionales no limitativos de los tipos de fármacos o sus profármacos descritos anteriormente incluyen: aciclovir (ACV), ganciclovir (GCV o DHPG) y sus profármacos (por ejemplo, valil-ganciclovir), E-5-(2-bromovinil)-2'-deoxiuridina (BVDU), (E)-5-vinil-1-β-D-arabonosiluracilo (VaraU), (E)-5-(2-bromovinil)-1-β-D-arabinosiluracilo (BV-araU), 1-(2-deoxi-2-fluoro-β-D-arabinosil)-5-yodocitosina (D-FIAC), 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-L-arabinosil)-5-metiluracilo (L-FMAU), o clevudina), (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)adenina [(S)-HPMPA], (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)-2,6-diaminopurina [(S)-HPMPDAP], (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil)citosina

[(S)-HPMPC, o cidofivir], y (2S,4S)-1-[2-(hidroximetil)-1,3-dioxolan-4-il]-5-yodouracilo (L-5-IodU), entecavir, lamivudina (3TC), LdT, LdC, tenofovir y adefovir, el (-)-enantiómero del 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosina-1-il)-1,3-oxatiolano ((-)-FTC); el (-)-enantiómero del 2-hidroximetil-5-(citosina-1-il)-1,3-oxatiolano (3TC); carbovir, aciclovir, famciclovir, penciclovir, AZT, DDI, DDC, L-(-)-FMAU, D4T, amdoxovir, Reverset, Racivir, abacavir, profármacos de L-DDA fosfato y β -D-dioxolanil-6-cloroplorina (ACP)), inhibidores de la RT no nucleósidos, como nevirapina, MKC-442, DMP-226 (sustiva), inhibidores de la proteasa como indinavir, saquinavir, Kaletra, atazanavir; y compuestos anti-VIH como BILN-2061, ISIS 14803; viramidina, NM 283, VX-497, JKT-003, levovirina, isatoribina, albuferon, Peg-infergen, VX-950, R803, HCV-086, R1479 y DMP45.

10 Composiciones farmacéuticas

Los huéspedes, incluyendo los humanos, infectados con pestivirus, flavivirus, infección por VHC o cualquier otra afección descrita en la presente, u otro organismo que se replique a través de una ARN polimerasa vírica dependiente del ARN, o para tratar cualquier otro trastorno descrito en la presente, pueden tratarse administrando al paciente una cantidad eficaz del compuesto activo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en presencia de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los materiales activos pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica, en forma líquida o sólida.

Una dosis preferida del compuesto para una infección por *Flaviviridae*, incluyendo el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental y el virus de la fiebre amarilla, e infección por rinovirus estará en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg una a cuatro veces al día. Las dosis más bajas pueden ser útiles y, por lo tanto, los intervalos pueden incluir de 50 - 1.000 mg de una a cuatro veces por día. El intervalo de dosificación eficaz de las sales farmacéuticamente aceptables puede calcularse en base al peso del nucleósido original que se va a administrar. Si la sal muestra actividad en sí misma, la dosificación eficaz puede estimarse como antes usando el peso de la sal, o por otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

El compuesto se administra convenientemente en cualquier forma de dosificación adecuada unitaria, incluyendo pero no limitada a una que contiene 25 a 3000 mg, preferiblemente de 50 a 2000 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Una dosificación oral de 50-1000 mg es habitualmente conveniente, incluyendo una o múltiples formas de dosificación de 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg. También se contemplan dosis de 0,1-50 mg, o 0,1-20 mg o 0,1-10.0 mg. Además, se pueden utilizar dosis más bajas en el caso de administración por una vía no oral, como, por ejemplo, mediante inyección o inhalación.

Idealmente, el ingrediente activo debe administrarse para alcanzar concentraciones en plasma máximas (C_{max}) del compuesto activo de aproximadamente 5,0 a 70 μ M, preferiblemente de aproximadamente 5,0 a 15 μ M. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa de una solución del 0,1 al 5% del ingrediente activo, opcionalmente en solución salina, o administrarse como un bolo del ingrediente activo.

La concentración de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Se debe tener en cuenta que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente son solo como ejemplares y no se pretende que limiten el alcance o la puesta en práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo puede administrarse de una vez, o puede dividirse en una serie de dosis más pequeñas para administrarse en intervalos de tiempo variables.

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

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

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

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

15 Si se administra por vía intravenosa, los portadores preferidos son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS).

20 En una realización preferida, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles, como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation.

25 Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también se prefieren como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas pueden prepararse disolviendo los lípidos apropiados (como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidilcolina, araquistil fosfatidil colina, y colesterol) en un solvente inorgánico que luego se evapora, dejando una película delgada de lípido seco sobre la superficie del recipiente. Luego se introduce en el recipiente una solución acuosa del compuesto activo o sus derivados de monofosfato, difosfato y/o trifosfato. El recipiente se da vueltas a mano para liberar el material lipídico de los lados del recipiente y dispersar los agregados lipídicos, formando así la suspensión liposomal.

35 VII. Métodos biológicos

Prueba antivírica de compuestos candidatos con el sistema de replicón del VHC en células Huh7.

40 Las células Huh7 que albergan el replicón del VHC pueden cultivarse en medios DMEM (alto contenido de glucosa, sin piruvato) que contengan suero fetal bovino al 10%, aminoácidos no esenciales 1x, Pen-Strep-Glu (100 unidades/litro, 100 microgramos/litro, y 2,92 mg/litro, respectivamente) y de 500 a 1000 microgramos/mililitro de G418. Los ensayos de selección antivírica pueden realizarse en el mismo medio sin G418 de la siguiente manera: para mantener las células en la fase de crecimiento logarítmico, las células se siembran en una placa de 96 pocillos a baja densidad, por ejemplo 1000 células por pocillo. El compuesto de prueba se añade inmediatamente después de sembrar las células y se incuba durante un período de 3 a 7 días a 37° C en una incubadora. Luego se retira el medio y se preparan las células para extracción total de ácido nucleico (incluyendo el ARN del replicón y el ARN huésped). El ARN de replicón puede luego amplificarse en un protocolo Q-RT-PCR y cuantificarse en consecuencia. Las diferencias observadas en los niveles del ARN del VHC del replicón en comparación con el control sin tratar es una manera de expresar la potencia antivírica del compuesto de prueba.

55 En otra configuración típica, un compuesto podría reducir la actividad de la ARN polimerasa vírica, pero no la actividad de la ARN polimerasa del huésped. Por lo tanto, la cuantificación del ARNr o ARNm de beta-actina (o cualquier otro fragmento de ARN del huésped) y la comparación con los niveles de ARN del control sin fármaco es una medida relativa del efecto inhibitor del compuesto de prueba sobre las ARN polimerasas celulares.

Ensayo de fosforilación de nucleósido a trifosfato activo

60 Para determinar el metabolismo celular de los compuestos, las células Huh-7 se obtienen de la American Type Culture Collection (Rockville, MD) y se cultivan en matraces de cultivo de tejidos de 225 cm² en medio esencial mínimo suplementado con aminoácidos no esenciales, penicilina-estreptomina al 1%. El medio se renueva cada tres días, y las células se subcultivan una vez a la semana. Después de desprenderse de la monocapa adherente con una exposición de 10 minutos a 30 ml de tripsina-EDTA y tres lavados consecutivos con medio, las células Huh-7 confluentes se sembraron a una densidad de 2,5 x 10⁶ células por pocillo en una placa de 6 pocillos y se expusieron a 10 μM de compuesto activo marcado con [³H] (500 dpm/pmol) durante los períodos de tiempo

65

especificados. Las células se mantienen a 37° C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. En los puntos temporales seleccionados, las células se lavan tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo. El compuesto activo intracelular y sus respectivos metabolitos se extraen incubando el sedimento celular durante la noche a -20° C con metanol al 60%, seguido de extracción con 20 μ l adicionales de metanol frío durante una hora en un baño de hielo. Luego, los extractos se combinan, se secan bajo un flujo de aire filtrado suave y se almacenan a -20° C hasta el análisis por HPLC.

Ensayo de biodisponibilidad en monos Cynomolgus

En el plazo de 1 semana antes del inicio del estudio, se implanta quirúrgicamente al mono cynomolgus un catéter venoso crónico y un puerto de acceso venoso subcutáneo (VAP) para facilitar la extracción de sangre y se somete a un examen físico que incluye hematología y evaluaciones químicas del suero y se registra el peso corporal. Cada mono (seis en total) recibe aproximadamente 250 μ Ci de compuesto marcado con ³H combinado con cada dosis de compuesto activo a un nivel de dosis de 10 mg/kg a una concentración de dosis de 5 mg/ml, ya sea a través de un bolo intravenoso (3 monos, IV) o mediante alimentación forzada oral (3 monos, PO). Cada jeringuilla dosificadora se pesa antes de la dosificación para determinar gravimétricamente la cantidad de formulación administrada. Las muestras de orina se recogen a través de una bandeja de captura en los intervalos designados (aproximadamente 18-0 horas antes de la dosis, 0-4, 4-8 y 8-12 horas después de la dosis) y se procesan. También se recogen muestras de sangre (antes de la dosis, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8, 12 y 24 horas después de la dosificación) a través del catéter venoso crónico y VAP o de un vaso periférico si el procedimiento de catéter venoso crónico no fuese posible. Las muestras de sangre y orina se analizan para la concentración máxima (C_{max}), momento en que se alcanza la concentración máxima (T_{max}), área bajo la curva (AUC), vida media de la concentración de la dosificación (T_{1/2}), depuración (CL), volumen y distribución del estado estable (V_{ss}) y biodisponibilidad (F).

Ensayo de toxicidad de la médula ósea

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

Ensayo de toxicidad de las mitocondrias

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

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

La cuantificación del ácido láctico se realizó con el kit de prueba de ácido D-láctico/ácido L-láctico (Boehringer Mannheim/R-Biopharm/Roche). Se descubrió la cantidad total de ácido láctico producido para cada muestra, así como el cambio en la producción de ácido láctico (% de ácido láctico/% de ADNr) como se describe en las instrucciones del fabricante.

Ensayo de citotoxicidad

Se añadieron 50 μ l de diluciones de fármaco 2X por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las concentraciones finales de fármaco variaron de 1 a 100 μ M. Se usó un control "sin fármaco" (solo medio) para determinar los valores de absorbancia mínimos y se usó un control "células + sólo medio" para el valor de absorbancia máximo. También se usó un control de solvente. Luego se añadieron células (PBM: 5 x 10⁴

células/pocillo; CEM: $2,5 \times 10^3$ células/pocillo; Vero, HepG2, Huh-7 y Clon A: 5×10^3 células/pocillo) y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% humidificada durante 3-5 días (PBM: 5 días; CEM: 3 días, todos los demás: 4 días). Después de la incubación, se añadieron 20 μl de colorante MTS del ensayo de proliferación celular de una solución acuosa de titulación celular a cada pocillo y la placa se volvió a incubar durante 2 a 4 horas. La absorbancia (490 nm) se leyó luego en un lector de placas ELISA usando el medio solo/sin pocillos de células como espacios en blanco. Se encontró el porcentaje de inhibición y se usó para calcular la CC_{50} .

Toxicidad in vivo en ratones

También se determinó la toxicidad *in vivo* después de las inyecciones en ratones suizos hembra de los varios nucleósidos divulgados en la presente invención. Las inyecciones intraperitoneales se administraron en los días 0, día 1, día 2, día 3 y día 5 de dosis variables del nucleósido particular. Se inyectó a los animales separados con vehículo como grupos de control. En estos estudios, cada grupo de dosificación contenía 5-10 ratones. Se midió el cambio de peso medio en cada uno de los ratones como un signo de toxicidad del compuesto.

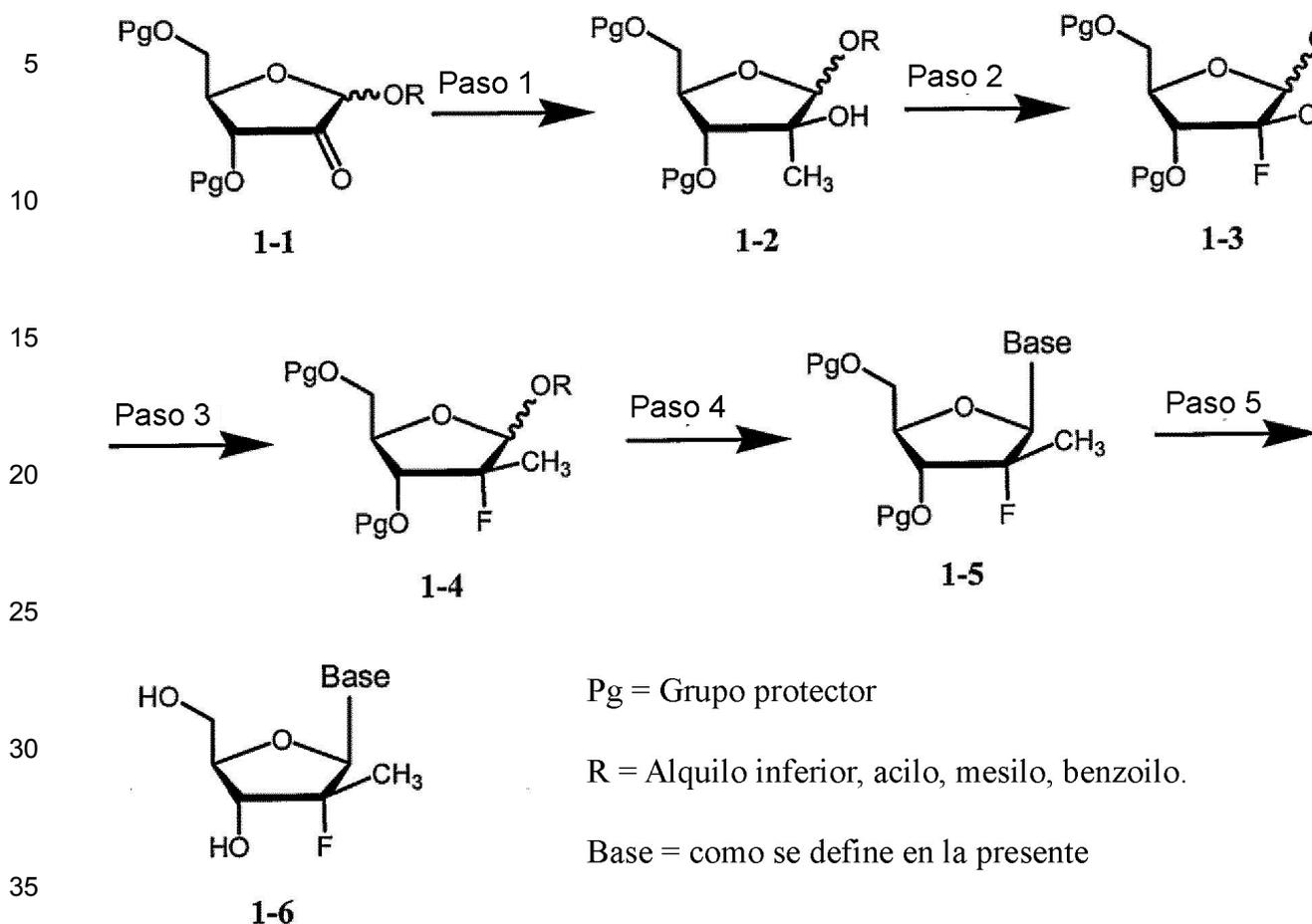
(BVDV) Ensayo de reducción de rendimiento

Se cultivaron células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK) en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero de caballo al 10% y 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina-estreptomicina. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 5×10^3 células/pocillo y se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5%. Las células se infectaron con BVDV citopáticas (cepa NADL) o no citopáticas (cepa SD-1) a una dilución del virus de 10^{-2} y se incubaron durante 45 min. Las monocapas de células se lavaron tres veces con medio. Se añadieron compuestos de ensayo que contenían medio fresco en concentraciones de respuesta a la dosis o ribavirina, como control positivo, a los cultivos y se añadió medio que no contenía fármaco a los controles sin fármaco. Después de 72 h de incubación, se recogió el sobrenadante y se extrajo el ARN vírico usando el Mini Kit de ARN vírico QIAmp (Qiagen, CA). La carga vírica se determinó mediante Q-RT-PCR usando cebadores específicos para NADL o SD-1 (1).

VIII. Protocolo sintético

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

1. *Glicosilación de la nucleobase con un azúcar apropiadamente modificado.*

Esquema 1

El Paso 1 en el Esquema 1 introduce el grupo 2-metilo usando un agente alquilante apropiado, como metil litio, trimetilaluminio o bromuro de metilmagnesio, en un solvente anhidro como tetrahidrofurano (THF), cloroformo o éter dietílico. Los compuestos 1-1 a 1-4 pueden ser puramente α o β o pueden existir como una mezcla anomérica que contiene tanto anómeros α como β en cualquier proporción. Sin embargo, la configuración anomérica preferida de la estructura 1-1 es β .

El paso 2 introduce el átomo de flúor en la posición 2 del alquil furanosido. Esto puede lograrse mediante tratamiento del alcohol terciario, 1-2, con un reactivo de fluoración comercialmente disponible como el trifluoruro de (dietilamino)azufre (DAST) o Desoxofluor en un solvente aprótico anhidro como tetrahidrofurano, cloroformo, diclorometano o tolueno. Preferiblemente, la estereoquímica procede con la inversión de la configuración en C-2. Es decir, a partir de un hidroxilo C-2 "ascendente" (o arabinofuranosido) en la estructura 1-2, el flúor C-2 está "descendente" en el ribofuranosido intermedio 1-3.

En el paso 3, los grupos protectores (Pg) opcionales se pueden desproteger y reprotger a grupos más adecuados para las manipulaciones restantes (T.W. Greene y P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999). Por ejemplo, los éteres bencílicos (Bn) pueden ser difíciles de eliminar en el nucleósido protegido, 1-5 y pueden desprotegerse y reemplazarse con un grupo más fácil de eliminar del nucleósido de tipo estructural 1-5. Además, la posición anomérica (C-1) también puede manipularse opcionalmente a un grupo adecuado para la reacción de acoplamiento con la nucleobase (paso 4). Los expertos en la técnica de la síntesis de nucleósidos han establecido varios métodos para manipulaciones anoméricas. Algunos ejemplos no limitativos por tratamiento del alquil furanosido (1-3, R = alquilo) con una mezcla de anhídrido acético, ácido acético y una cantidad catalítica de ácido sulfúrico (acetólisis) para proporcionar la estructura 1-4 donde R = Ac, con grupos protectores opcionales. Además, el grupo alquilo en 1-3 puede convertirse en un acetato, benzoato, mesilato, tosilato, triflato o tosilato, por ejemplo, hidrolizando primero el grupo 1-O-alquilo en un grupo 1-hidroxilo usando un ácido mineral que consiste de, pero no está limitado a, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido bromhídrico o un ácido orgánico que consiste de, pero no está limitado a, ácido trifluoroacético, ácido acético y ácido fórmico (a temperatura ambiente o temperatura elevada). El azúcar reductor podría luego convertirse en el carbohidrato deseado por tratamiento con cloruro de acetilo, anhídrido acético, cloruro de benzoilo, anhídrido benzoico, cloruro de

metanosulfonilo, anhídrido triflico, cloruro de trifilo o cloruro de tosilo en presencia de una base adecuada, como trietilamina, piridina, o dimetilaminopiridina.

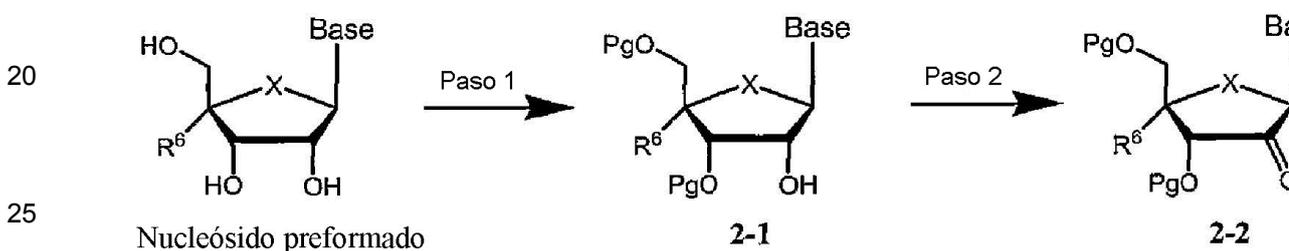
5 El enlace nucleosídico se construye mediante el tratamiento del producto intermedio **1-3** o **1-4** con la nucleobase persililada apropiada en presencia de un ácido de Lewis como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio, trimetilsililtriflato o un reactivo de mercurio (II) (HgO/HgBr₂) habitualmente a una temperatura elevada en un solvente aprótico como tolueno, acetonitrilo, benceno o una mezcla de alguno o todos estos solventes.

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

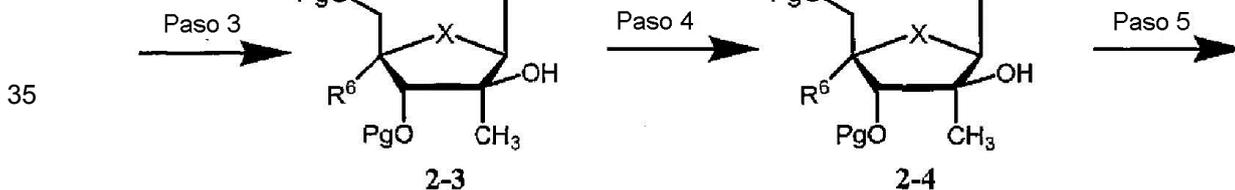
2. Modificación de un nucleósido preformado

15

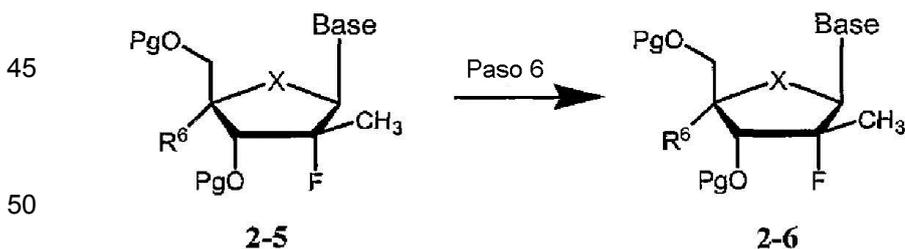
Esquema 2



30



40



55 Pg = grupo protector

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

X = como se define en la presente

60 R⁶ = como se define en la presente

65 El material de partida para este proceso es un nucleósido de purina o pirimidina apropiadamente sustituido con un 2'-OH y 2'-H. El nucleósido se puede adquirir o se puede preparar por cualquier medio conocido, incluyendo las técnicas de acoplamiento estándar. El nucleósido puede protegerse opcionalmente con grupos protectores adecuados, preferiblemente con grupos acilo o sililo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la

técnica, como se enseña en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed. John Wiley & Sons, 1999.

5 El nucleósido de pirimidina puede oxidarse luego en la posición 2' con el agente oxidante apropiado en un solvente compatible a una temperatura adecuada para proporcionar el nucleósido 2'-modificado. Los posibles agentes oxidantes son una mezcla de dimetilsulfóxido, anhídrido trifluoroacético o anhídrido acético (una oxidación de Swern/Moffat), trióxido de cromo u otro reactivo de cromato, periodinano de Dess-Martin o peróxido de rutenio/periodato de sodio.

10 El nucleósido opcionalmente protegido 2'-cetona se alquila luego usando agentes alquilantes como metililitio, trimetilaluminio, bromuro de metilmagnesio o reactivos similares en un solvente anhidro como tetrahidrofurano (THF), cloroformo o éter dietílico generalmente a temperaturas inferiores a 0° C. Se prefiere que los compuestos de la fórmula estructural **2-3** tengan la configuración 2'(S) o 2'-metilo "descendente", 2'-OH "ascendente".

15 El nucleósido de estructura **2-3** puede desprotegerse y reprotgerse con una serie de grupos protectores como un O-acilo (alquilo o arilo), O-sulfonilo o un N-acilo (alquilo o arilo) para la base. Este paso de reprotcción opcional no necesita limitarse a grupos protectores que funcionan como grupos protectores químicos. Otros grupos protectores como grupos acilo de cadena larga de entre 6 y 18 unidades de carbono o aminoácidos pueden introducirse independientemente en la nucleobase o el azúcar. Los grupos protectores pueden servir como profármacos de la sustancia activa.

25 El paso 5 introduce el átomo de flúor en la posición 2' del nucleósido preformado. Esto se puede lograr mediante el tratamiento del alcohol terciario, **2-4**, con un reactivo de fluoración comercialmente disponible como el trifluoruro de (dietilamino)azufre (DAST) o Desoxofluor en un solvente aprótico anhidro como tetrahidrofurano, cloroformo, diclorometano o tolueno. Preferiblemente, la estereoquímica procede con la inversión de la configuración en la posición 2'. Es decir, a partir de un hidroxilo C-2' "ascendente" (o arabinonucleósido) en la estructura **2-4**, el flúor C-2' está "descendente" en el nucleósido intermedio **2-5**. La configuración absoluta de un nucleósido de estructura **2-4** es (2'S) mientras que la configuración absoluta de un nucleósido de estructura **2-5** es (2'R).

30 Posteriormente, los nucleósidos de tipo estructural **2-5** pueden desprotegerse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como se enseña por T.W. Greene y P.G.M. Wuts, " Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

35 EJEMPLOS

Ejemplo 1

40 *Síntesis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitolidina a partir de un carbohidrato*

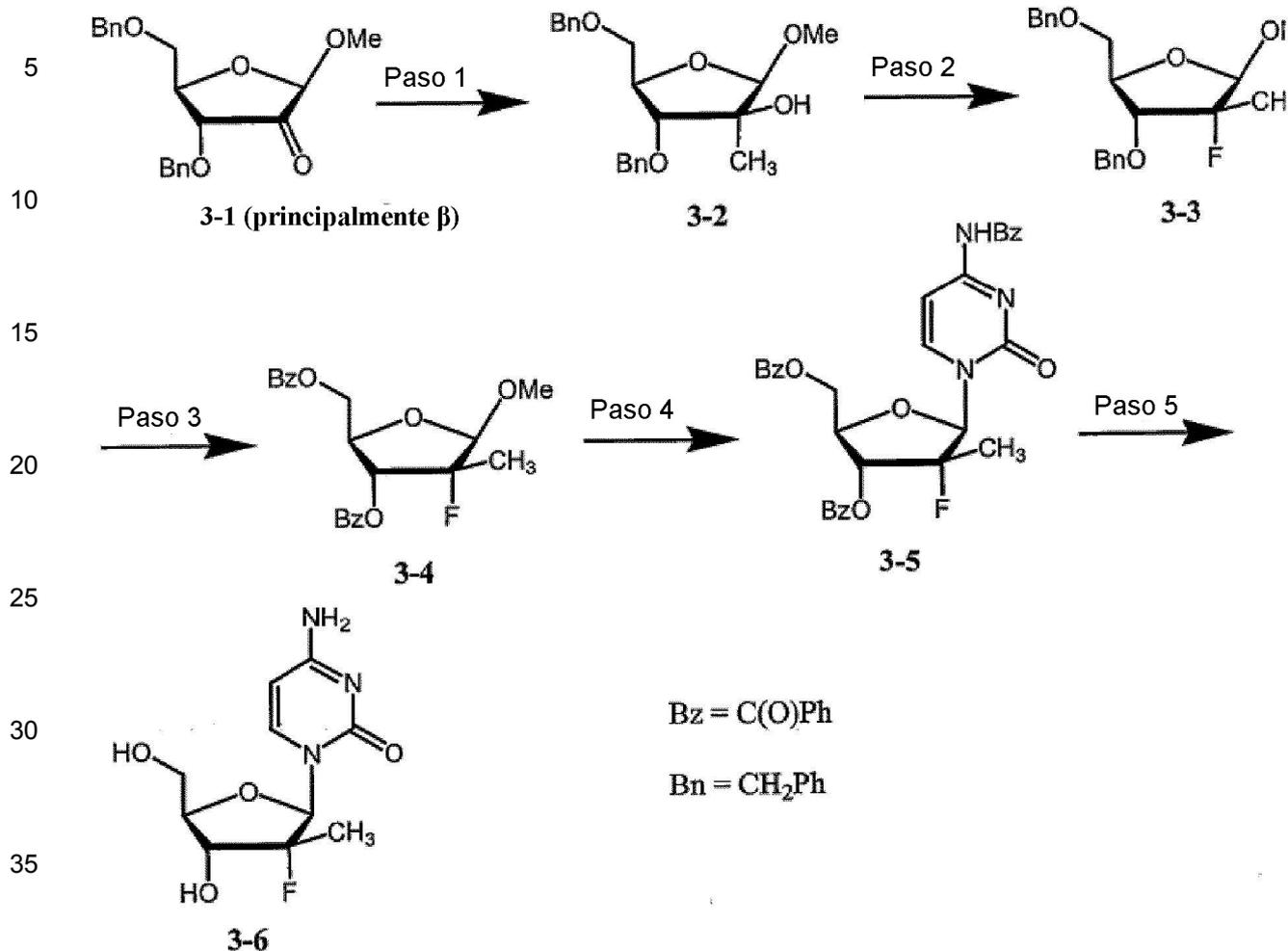
45

50

55

60

65

Esquema 3

Paso 1: el compuesto **3-1** (7,7 g, 0,022 mmol) se disolvió en éter dietílico anhidro y se enfrió a $-78^{\circ}C$. A esta solución se le añadió MeLi (30 ml, 1,6 M en éter dietílico). Después de que la reacción se hubo completado, la mezcla se trató con cloruro de amonio (1 M, 65 ml) y la fase orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4), se filtró, y se concentró hasta la sequedad. La cromatografía en gel de sílice seguida de cristalización en éter dietílico-hexanos proporcionó el compuesto puro **3-2** (6,31 g). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.40 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.49 (dd, 1H, $J = 10.3, 6.89$ Hz), 3.57 (dd, 1H, $J = 10.3, 3.88$ Hz), 3.84 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 4.03 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.58 (m, 3H), 4.83 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz), 7.31-7.36 (m, 10H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 18.4, 55.4, 72.2, 73.4, 79.5, 80.2, 84.7, 107.4, 127.7, 127.8, 127.83, 128.5, 138.2, 138.3.

Paso 2: El compuesto **3-2** se disolvió en CH_2Cl_2 y se trató con DAST (4,0 ml, 30,3 mmol) a temperatura ambiente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla así obtenida se vertió en $NaHCO_3$ saturado (100 ml) y se lavó con $NaHCO_3$ (1 x 15 ml). La capa orgánica se preparó adicionalmente de la manera habitual. La cromatografía en gel de sílice (1:5 EtOAc-hexanos) dio el compuesto bruto **3-3** (0,671 g) que era lo suficientemente puro para el paso siguiente. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.43 (d, 3H, $J = 22.8$ Hz), 3.35 (s, 3H), 3.49 (dd, 1H, $J = 10.5, 5.4$ Hz), 3.55 (dd, 1H, $J = 10.5, 4.1$ Hz), 3.87 (dd, 1H, $J = 23.5, 7.5$ Hz), 4.26 (m, 1H), 4.56 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz), 4.66 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz), 4.72 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz), 7.29-7.36 (m, 10H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 17.0 (d, $J = 24.4$ Hz), 55.2, 77.1, 73.4, 73.8, 77.3, 80.3, 81.2 (d, $J = 16$ Hz), 99.7 (d, $J = 178.9$ Hz), 106.8 (d, $J = 32.0$ Hz), 127.7, 127.8, 128.1, 128.3, 128.5, 128.6, 137.8, 138.3; ^{19}F NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -8.2 (m, 1F).

Paso 3: el Compuesto **3-3** (0,39 g, 1,1 mmol) se disolvió en 1:2 EtOH-EtOAc y se trató con Pd/C (~0,1 g) y ciclohexeno (~1 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche y luego se filtró a través de celite. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se disolvió en piridina (~5 ml). A esta solución se le añadió cloruro de benzoilo (0,22 ml, 1,83 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La piridina se eliminó al vacío y el residuo se dividió entre CH_2Cl_2 y $NaHCO_3$ saturado (10,0 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró, y la solución se concentró hasta la sequedad. La cromatografía en columna proporcionó 0,350 g de compuesto puro **3-4**. 1H NMR

(400 MHz, CDCl₃): δ 1.53 (d, 3H, *J* = 22.4 Hz), 3.39 (s, 3H), 4.46 (dd, 1H, *J* = 11.6, 4.7 Hz), 4.58 (m, 1H), 4.65 (dd, 1H, *J* = 11.6, 3.9 Hz), 4.87 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz), 5.64 (dd, 2H, *J* = 24.1, 7.8 Hz), 7.29-7.36 (m, 10H); ¹⁹F NMR (100 MHz, CDCl₃): δ -7.5 (m, 1F).

5 **Paso 4:** se trató una solución de bis(trimetilsilil)-*N*-benzoilcitosina (0,28 g, 0,77 mmol) y compuesto **3-4** (0,20 g, 0,5 mmol) en 1,2 dicloroetano (2 ml) y tolueno (2 ml) con TMSOTf (0,15 ml, 0,77 mmol). Después de que se juzgó por TLC que la mayor parte del material de partida había desaparecido, la solución se enfrió a la temperatura ambiente, se lavó con agua (1 x 5 ml), salmuera (1 x 5 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró hasta la sequedad. La cromatografía flash seguido por cristalización de CH₂Cl₂-hexanos proporcionó el compuesto **3-5** (68 mg). mp 241 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.49 (d, 3H, *J* = 22.4 Hz), 4.64 (dd, 1H, *J* = 12.9, 3.4 Hz), 4.73 (app d, 1H, *J* = 9.5 Hz), 4.89 (dd, 1H, *J* = 12.7, 2.2 Hz), 5.56 (dd, 1H, *J* = 20.7, 8.6 Hz), 6.52 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 7.38-7.67 (m, 10H), 7.89 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz), 8.07-8.11 (m, 5H), 8.67 (s, 1H); ¹⁹F NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 2.85 (m, 1F).

15 **Paso 5:** el compuesto **3-5** (40 mg, 0.05 mmol) se disolvió en amoníaco metanólico y se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. La solución se concentró hasta la sequedad y se cromatografió (SiO₂) eluyendo con 1:4 EtOH-CH₂Cl₂. El rendimiento fue de aproximadamente 12 mg de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-*C*-metilcitudina pura, **3-6**. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.16 (d, 3H, *J* = 22.0 Hz), 3.61 (dd, 1H, *J* = 11.6, 5.2 Hz), 3.60-3.83 (m, 3H, *J* = 10.5, 5.4 Hz), 5.24 (s, 1H, intercambiable con D₂O), 5.59 (s, 1H, intercambiable con D₂O), 5.71 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 6.08 (d, 1H, *J* = 19.0 Hz), 7.24 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz, intercambiable con D₂O), 7.87 (d, 1H); ¹⁹F NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.13 (m, 1F).

Ejemplo 2

25 *Síntesis de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-*C*-metilcitudina a partir de citidina*

30

35

40

45

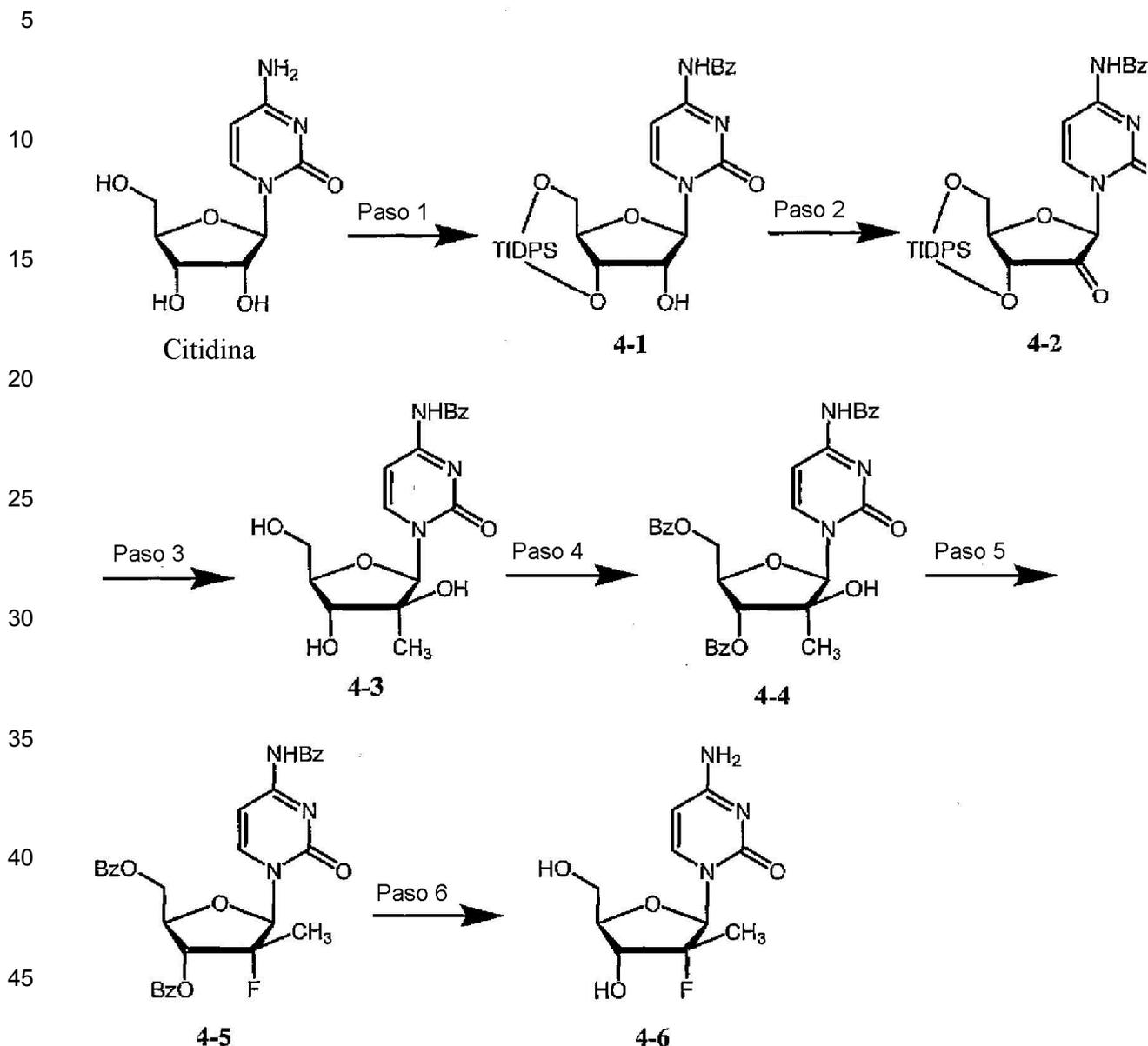
50

55

60

65

Esquema 4



50 TIDPS = 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno)

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

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

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

Paso 3: el Compuesto **4-2** (48,57 g, 8,26 mmol) se disolvió en tolueno anhidro (~400 ml) y el solvente se eliminó al vacío con exclusión de la humedad. El residuo se secó luego al vacío (bomba de aceite) durante otras 2 h. Con la exclusión estricta de la humedad, la espuma residual se disolvió en éter dietílico anhidro (1,03 l) bajo argón. La solución resultante se enfrió a -78° C bajo argón y se añadió gota a gota MeLi (1,6 M, 258,0 ml, 0,413 mol) a través un embudo de adición. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó durante 2 h a -78°C. Se añadió lentamente NH₄Cl 1 M acuoso (500 ml). Después de calentar a temperatura ambiente, la mezcla se lavó con H₂O (2 x 500 ml), se secó (Na₂SO₄) y luego se concentró hasta la sequedad para obtener una espuma marrón (~60 g, > 100%).

La reacción se realizó dos veces más usando 37,62 g y 56,4 g del compuesto **4-2**. Los productos brutos combinados (128,0 g, 0,212 mol) se disolvieron en THF (1,28 l) y se trataron con HOAc concentrado (23 ml, 0,402 mol). A la solución se le añadió TBAF (384,0 ml, 1 M en THF). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 0,75 h y la mezcla se trató con gel de sílice (750 g) y se concentró hasta la sequedad. El polvo se colocó en una columna de gel de sílice compactada en CH₂Cl₂. La elución con 1:7 EtOH-CH₂Cl₂ proporcionó un sólido ceroso oscuro que se pre-adsorbió sobre gel de sílice (300 g) y se cromatografió como antes. El compuesto **4-3** (46,4 g, 53,0% de **4-2**) se aisló como un sólido blanquecino. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.20 (s, 3H, CH₃), 3.62-3.69 (m, 2H,), 3.73-3.78 (m, 2H,), 5.19 (t, 1H, J = 5.4 Hz, OH-5'), 5.25 (s, 1H, OH-2'), 5.52 (d, 1H, J = 5.0 Hz, OH-3'), 5.99 (s, 1H, H-1'), 7.32 (d, 1H, J = 5.8 Hz), 7.50 (Ψt, 2H, J = 7.7 Hz), 7.62 (Ψt, 1H, J = 7.3 Hz), 8.00 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 8.14 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 11.22 (s, 1H, NH). Anal. calculado para C₁₇H₁₉N₃O₆ • 0.5 H₂O: C, 55.13; H, 5.44; N, 11.35. Found: C, 55.21; H, 5.47; N, 11.33.

Paso 4: el compuesto **4-3** (46,0 g, 0,13 mol) se disolvió en piridina anhidra y se concentró hasta la sequedad al vacío. El jarabe resultante se disolvió en piridina anhidra bajo argón y se enfrió a 0° C con agitación. La solución marrón se trató con cloruro de benzoilo (30 ml, 0,250 mol) gota a gota durante 10 min. Se retiró el baño de hielo y se continuó agitando durante 1,5 h, por lo que la TLC mostró que no quedaba material de partida. La mezcla se inactivó mediante la adición de agua (5 ml) y se concentró hasta la sequedad. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ saturado (1 x 500 ml) y H₂O (1 x 500 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se filtró, se concentró hasta la sequedad y se cromatografió en gel de sílice eluyendo con un gradiente escalonado de EtOAc-hexanos (25-60%) para proporcionar el compuesto **4-4** en forma de una espuma amarilla (48,5 g, 67%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.64 (s, 3H, CH₃), 4.50 (m, 1H, H-4), 4.78-4.85 (m, 2H, H-5',5a'), 5.50 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H-3'), 6.42 (s, 1H, H-1'), 7.44-7.54 (m, 7H, Ar), 7.57-7.66 (m, 3H, Ar), 7.94 (d, 2H, J = 7.8 Hz), 8.05-8.09 (m, 4H, Ar), 8.21 (d, 1H, J = 7.3 Hz). Anal. calculado para C₃₁H₂₇N₃O₈: C, 65.37; H, 4.78; N, 7.38. Found: C, 65.59; H, 4.79; N, 7.16.

Paso 5: el compuesto **4-4** (7,50 g, 0,013 mol) se disolvió en tolueno anhidro (150 ml) bajo una atmósfera de argón y se enfrió a -20° C. Se añadió DAST (2,5 ml, 18,9 mmol) lentamente y se retiró el baño de enfriamiento después de que se hubo completado la adición. La agitación se continuó durante 1 h y la mezcla se vertió en NaHCO₃ saturado (100 ml) y se lavó hasta que cesó la evolución de gas. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 1:1 EtOAc-hexanos. El rendimiento fue de 1,22 g (16,3%) de **4-5** puro como un sólido blanco. mp 241 °C (CH₂Cl₂-hexanes); ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.49 (d, 3H, J = 22.4 Hz, CH₃), 4.64 (dd, 1H, J = 3.44, 12.9 Hz, H-5'), 4.73 (d, 1H, J = 9.5 Hz, H-4'), 4.90 (dd, 1H, J = 2.4, 12.7 Hz, H-5a'), 5.56 (dd, 1H, J = 8.6, 20.7 Hz, H-3'), 6.52 (d, 1H, J = 18.0 Hz, H-1'), 7.47-7.57 (m, 7H, Ar), 7.62-7.71 (m, 3H, Ar), 7.89 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 8.07-8.11 (m, 5H, Ar), 8.67 (bs, 1H, NH). ¹⁹F NMR (CDCl₃): δ 3.3 (m). Anal. calculado para C₃₁H₂₆FN₃O₇ • 0.7 H₂O: C, 63.74; H, 4.72; N, 7.20. Found: C, 63.71; H, 4.54; N, 7.20.

Paso 6: El compuesto **4-5** (6,30 g, 0,011 mol) se suspendió en amoníaco metanólico (aproximadamente 7 N, 150 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó al vacío, se co-evaporó con metanol (1 x 20 ml) y se pre-adsorbió en gel de sílice. El polvo blanco se colocó en una columna de gel de sílice (compactada en CHCl₃) y la columna se eluyó con EtOH al 9% en CHCl₃, luego con EtOH al 17% y finalmente con EtOH al 25% en CHCl₃. La concentración de las fracciones que contenían el producto, la filtración a través de un disco de 0,4 μm y la liofilización en agua proporcionaron el compuesto **4-6**, 2,18 g (76%). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.17 (d, 3H, J = 22.3 Hz, CH₃), 3.63 (dd, 1H, J = 2.7, 13.7 Hz, H-5'), 3.70-3.84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5.24 (app s, 1H, OH-3'), 5.60 (d, 1H, J = 5.4 Hz, H-5'), 5.74 (d, 1H, J = 7.71 Hz, H-5), 6.07 (d, 1H, J = 18.9 Hz, H-1'), 7.31 (s, 1H, NH₂), 7.42 (s, 1H, NH₂), 7.90 (d, 1H, J = 7.3 Hz, H-6). ¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ 2.60 (m). Anal. calculado para C₁₀H₁₄FN₃O₄ • 1.4 H₂O: C, 44.22; H, 5.95; N, 14.77. Encontrado: C, 42.24; H, 5.63; N, 14.54. El compuesto **4-6** (0,10 g, 0,386 mmol) se convirtió en la sal de clorhidrato disolviéndolo en agua (2 ml) y ajustando el pH a aproximadamente 3,0 con HCl 1M. El agua se eliminó al vacío y el residuo se cristalizó en EtOH acuoso para dar **4-6**

en forma de la sal de clorhidrato (71,0 mg). mp 243 °C (dec); ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1.29 (d, 3H, J = 22.6 Hz, CH₃), 3.65 (dd, 1H, J = 2.3, 12.7 Hz, H-5'), 3.76-3.90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5.96 (d, 1H, J = 17.3 Hz, H-1'), 6.15 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-5), 8.33 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-6), 8.69 (s, 1.5H, NH), 9.78 (s, 1.5H, NH). ¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ 1.69 (m). Anal. calculado para C₁₀H₁₄FN₃O₄ · HCl: C, 40.62; H, 5.11; N, 14.21. Encontrado: C, 40.80; H, 5.09; N, 14.23.

Ejemplo 3

Actividad antivírica de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina

Ensayo de replicón de VHC

La actividad anti-flavivirus de los compuestos se determinó según se describe por Stuyver, et al. ("Análogo de ribonucleósidos que bloquea la replicación de la diarrea vírica bovina y los virus de la hepatitis C en cultivo", Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47:244-254 (2003). El compuesto se disolvió en DMSO y se añadió al medio de cultivo a concentraciones finales que variaron entre 3 y 100 μM. Una incubación de 4 días dio como resultado una reducción dependiente de la dosis del ARN del VHC del replicón (Figura 1A). Se alcanzó una reducción de 1 log del ARN del replicón (o valor de EC₉₀) a aproximadamente 2,5 μM. La medición de la reducción del ARNr dio una indicación del efecto inhibitor sobre las polimerasas celulares. La resta de este valor de toxicidad celular de los valores antivíricos dio como resultado la línea de índice terapéutico y el valor de EC₉₀. En base a estos cálculos, se obtuvo un valor de EC₉₀ medio, corregido por la toxicidad celular, de aproximadamente 2,5 μM. La Figura 1A muestra la reducción dependiente de la dosis del ARN del VHC del replicón en base al tratamiento con (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. La reducción vírica se comparó con la reducción de los niveles de ARN celular (ARN ribosómico) para obtener valores del índice terapéutico. EC₉₀ representa la concentración efectiva del 90% a las 96 horas después de la administración dependiente de la dosis de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. La Figura 1B muestra la reducción prolongada en el ARN del VHC del replicón hasta 7 días después del tratamiento con 5 y 25 μM.

La actividad de la (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina en el sistema del replicón se resume en la Tabla 1. Los valores de CE₉₀ para (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina así como para 2'-C-metilcitidina y 2'-C-metiladenosina se muestran para tres clones de replicón separados (HCV-WT (tipo salvaje), 9-13 y 21-5), así como otros dos clones (S282T y ARNr). Los valores de EC₉₀ para (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina estuvieron en el intervalo de 1,6 a 4,6 μM para los clones de replicón. Por el contrario los valores EC₉₀ para 2'-C-metilcitidina estaban en el intervalo de 6,6 a 37,4 μM. Curiosamente, los valores de CE₉₀ para 2'-C-metiladenosina fueron comparables a los de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina. La actividad de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina y 2'-C-metilcitidina en otros replicones probados se muestra en la Tabla 2.

Ensayo de polimerasa

La Tabla 3 muestra la potencia de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina-5'-trifosfato (TP) en el ensayo de polimerasa NS5B. Se determinó que la concentración inhibidora del 50% estaba en el intervalo de 1,07 a 7,7 μM.

Toxicidad

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

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

Estudios animales

La Figura 2 representa el cambio de peso medio (%) de ratones suizos hembra en el análisis de toxicidad in vivo de (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina a varias dosis. Las inyecciones intraperitoneales se administraron en los días 0 a 5 de 0, 3,3, 10, 33, 100 mg/kg. Cada grupo de dosificación contenía 5 ratones y ningún ratón murió durante el estudio de 30 días. No se observó toxicidad significativa en los ratones.

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

5 Otra actividad antivírica

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

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

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

Replicón	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina	2'-C-metilcitidina	2'-C-metiladenosina
HCV-WT 1b	4.6 ± 2.0	21.9 ± 4.3	2.1 ± 0.27
S282T mut. 1b	30.7 ± 11.7	37.4 ± 12.1	> 100
9-13 (subgenómico)	4.6 ± 2.3	13.0	0.7
21-5 (longitud completa)	1.6 ± 0.7	6.6	0.6

* Los valores representan EC₉₀ (μM)

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

Replicón	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina			2'-C-metilcitidina		
	EC ₉₀ (μM)	IC ₉₀ (μM)		EC ₉₀ (μM)	IC ₉₀ (μM)	
		GAPDH	MTT		GAPDH	MTT
1b (Ntat)	3.8	> 100	> 100	27.2	> 100	> 100
1b (Btat)	11.5	> 100	> 100	31.1	> 100	> 100
1a (pp1aSI-7)	34.7	> 100	> 100	35.0	> 100	> 100

Tabla 3: Ensayo de polimerasa NS5B de HCV 1b (IC₅₀, μM)

	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina TP	2'-C-metilcitidina TP	2-C-metiladenosina TP
NS5B de tipo salvaje	1.7 ± 0.4 ^a	6.0 ± 0.5	20.6 ± 5.2
	7.7 ± 1.2 ^b		
S282T	2.0 ^a	26.9 ± 5.5	> 100
	8.3 ± 2.4 ^c		

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

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

Virus	Célula	EC ₅₀ , CPE (μM)	EC ₅₀ , NR ^a (μM)	CC ₅₀ , CPE (μM)	CC ₅₀ , NR ^a (μM)
Nilo Occidental	Vero	32	12	> 100	32
Dengue Tipo 2	Vero	32/55	> 100 /> 100	> 100	> 100
Fiebre amarilla	Vero	19/3.2	32/12	> 100	> 100
Influenza A (H1N1)	MDCK	> 100	> 100	> 100	> 100

(continuación)

Virus	Célula	EC ₅₀ , CPE (μM)	EC ₅₀ , NR ^a (μM)	CC ₅₀ , CPE (μM)	CC ₅₀ , NR ^a (μM)
Influenza A (H3N2)	MDCK	> 100	> 100	> 100	> 100
Influenza B	MDCK	> 100	> 100	> 100	> 100
Rinovirus Tipo 2	KB	25	20	> 100	> 100
VEE	Vero	> 100	> 100	> 100	> 100
SARSCoV	Vero	> 100	> 100	> 100	> 100

^a NR = Rojo Neutro.

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

Virus	(2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina (EC ₉₀ , μM)	2'-C-metilcitidina (EC ₉₀ , μM)	2'-C-metiladenosina (EC ₉₀ , μM)
BVDVncp	> 22	0.5	1.2
BVDVcp	> 100	2	1.5
RSV	> 100	> 100	> 100
VIH ^a	> 100	ND	ND
VHB	> 10	> 10	ND
Coronavirus 229E	> 100	ND	ND

ND = No determinado.

Tabla 6: Estudios de citotoxicidad^a

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

^a Los resultados se determinaron usando el ensayo MTS.

Tabla 7: Estudio de toxicidad mitocondrial

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

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

Parámetro	Unidades	Media ± SD
C _{max}	μM	9.6 ± 2.7
T _{max}	horas	2 ± 1
AUC _{0-último}	μMxh	44.2 ± 22.2
T ½	horas	3.9 ± 0.1
Biodisponibilidad	F%	21 ± 11

Tabla 9: Efecto de los análogos de nucleósidos en células humanas de médula ósea

Compuesto (análogo de β-D)	BFU-E	CFU-GM
	IC ₅₀ (μM)	
2'-fluoro-2'-C-metilcitidina	98.2	93.9
2'-C-metilcitidina	20.1	13.2
AZT	0.08	0.95

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

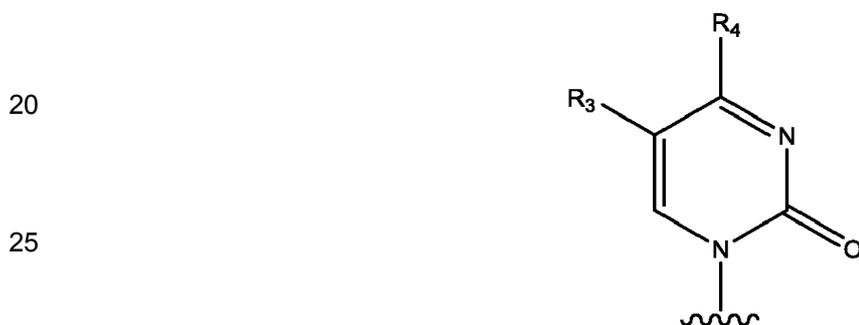
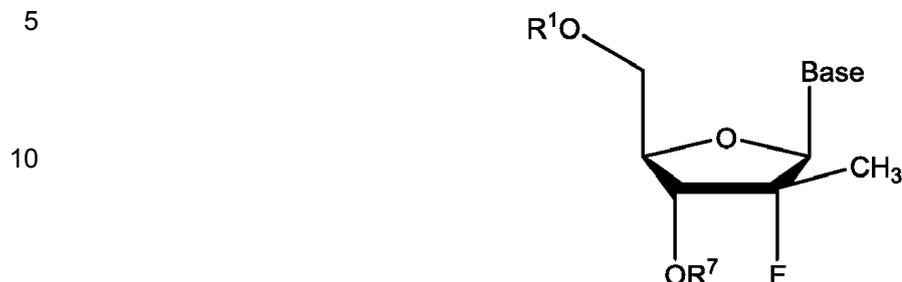
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil nucleósido (β -D o β -L) de la fórmula



30 R^1 y R^7 son independientemente H, fosfato, incluyendo monofosfato, difosfato, trifosfato, H-fosfonato, acilo, alquilo C_1 - C_{10} , incluyendo alquilo inferior, alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo, fenil alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo sustituido o no sustituido, bifenil alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo sustituido o no sustituido, o naftil alquilo C_1 - C_{10} sulfonilo sustituido o no sustituido;

35 R^3 y R^4 son independientemente H, halógeno (incluyendo F, Cl, Br, I), OH, OR', SH, SR', NH_2 , NHR' , NR'_2 , alquilo inferior de C_1 - C_6 , alquilo inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_1 - C_6 como CF_3 y CH_2CH_2F , alqueno inferior de C_2 - C_6 como $CH=CH_2$, alqueno inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_2 - C_6 como $CH=CHCl$, $CH=CHBr$ y $CH=CHI$, alquino inferior de C_2 - C_6 como $C\equiv CH$, alquino inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_2 - C_6 , alcoxi inferior de C_1 - C_6 como CH_2OH y CH_2CH_2OH , alcoxi inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_1 - C_6 , CO_2H , CO_2R' , $CONH_2$, $CONHR'$, $CONR'_2$, $CH=CHCO_2H$, $CH=CHCO_2R'$;

40 R' es un alquilo opcionalmente sustituido de C_1 - C_{12} (particularmente cuando el alquilo es un residuo de aminoácido), cicloalquilo, alquino opcionalmente sustituido de C_2 - C_6 , alqueno inferior opcionalmente sustituido de C_2 - C_6 , u opcionalmente acilo sustituido.

45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil nucleósido (β -D o β -L) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

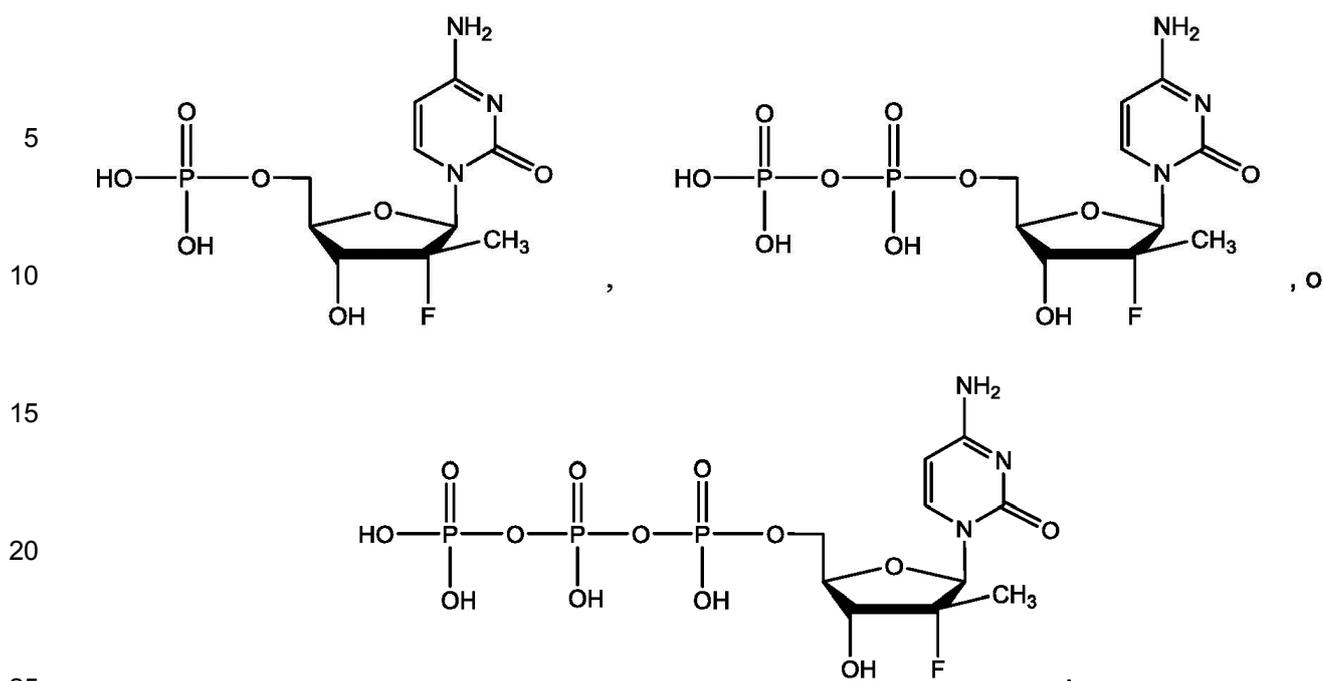
50 R^1 y R^7 son independientemente H, fosfato, (incluyendo monofosfato, difosfato, trifosfato), H-fosfonato, acilo, alquilo C_1 - C_4 , metanosulfonilo o bencilsulfonilo;

55 R^3 y R^4 son independientemente H, halógeno (incluyendo F, Cl, Br, I), OH, SH, NH_2 , alquilo inferior de C_1 - C_6 , alquilo inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_1 - C_6 como CF_3 y CH_2CH_2F , alqueno inferior de C_2 - C_6 como $CH=CH_2$, alqueno inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_2 - C_6 como $CH=CHCl$, $CH=CHBr$ y $CH=CHI$, alquino inferior de C_2 - C_6 como $C\equiv CH$, alquino inferior halogenado (F, Cl, Br, I) de C_2 - C_6 , alcoxi inferior de C_1 - C_6 , CO_2H , $CONH_2$ o $CH=CHCO_2H$.

3. El (2'R)-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metil nucleósido (β -D) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, de fórmula:

60

65



4. Una composición farmacéutica que comprende un nucleósido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5. Un nucleósido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia.

6. Un nucleósido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o profilaxis de una infección por *Flaviviridae* en un huésped.

7. Un nucleósido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la infección por *Flaviviridae* es el virus de la hepatitis C.

8. Un nucleósido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como un inhibidor de la polimerasa NS5B del VHC.

9. Un nucleósido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso en combinación o alternancia con uno o más agentes antivirales.

10. El uso de un nucleósido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección por *Flaviviridae* en un huésped.

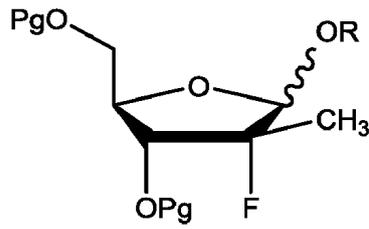
11. El uso de un nucleósido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación o alternancia con uno o más agentes antivirales distintos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección por *Flaviviridae* en un huésped.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 o 11, en donde la infección por *Flaviviridae* es el virus de la hepatitis C.

13. El uso de un nucleósido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para su uso como un inhibidor de la polimerasa NS5B del VHC.

14. El uso de un nucleósido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación o alternancia con uno o más agentes antivirales en la fabricación de un medicamento para su uso como un inhibidor de la polimerasa NS5B del VHC.

15. Un método para sintetizar el nucleósido de la reivindicación 1 o 2, que comprende glicosilar la nucleobase de pirimidina con un compuesto que tiene la siguiente estructura:



1-4

en donde R es alquilo inferior, acilo, benzoilo o mesilo; y Pg se selecciona de entre C(O)- alquilo C₁-C₁₀, C(O)fenilo, C(O) bifenilo, C(O)naftilo, CH₃, CH₂- alquilo C₁-C₁₀, CH₂-alquenoilo, CH₂Ph, CH₂-bifenilo, CH₂-naftilo, CH₂O-alquilo C₁-C₁₀, CH₂O-fenilo, CH₂O-bifenilo, CH₂O-naftilo, SO₂-alquilo C₁-C₁₀, SO₂-fenilo, SO₂-bifenilo, SO₂-naftilo, *tert*-butildimetilsililo, *tert*-butildifenilsililo, o ambos Pg pueden venir juntos para formar un 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

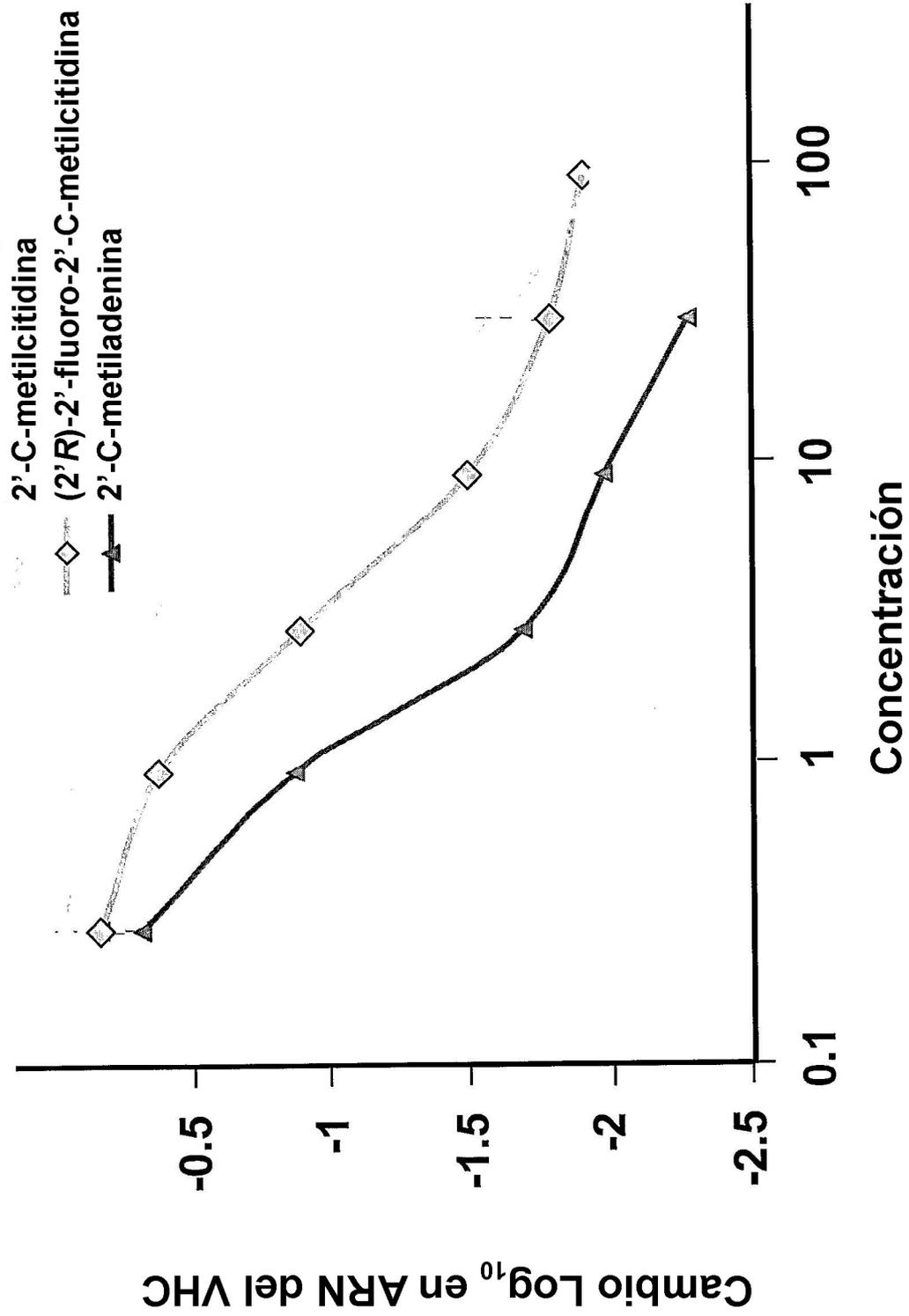


Figura 1A

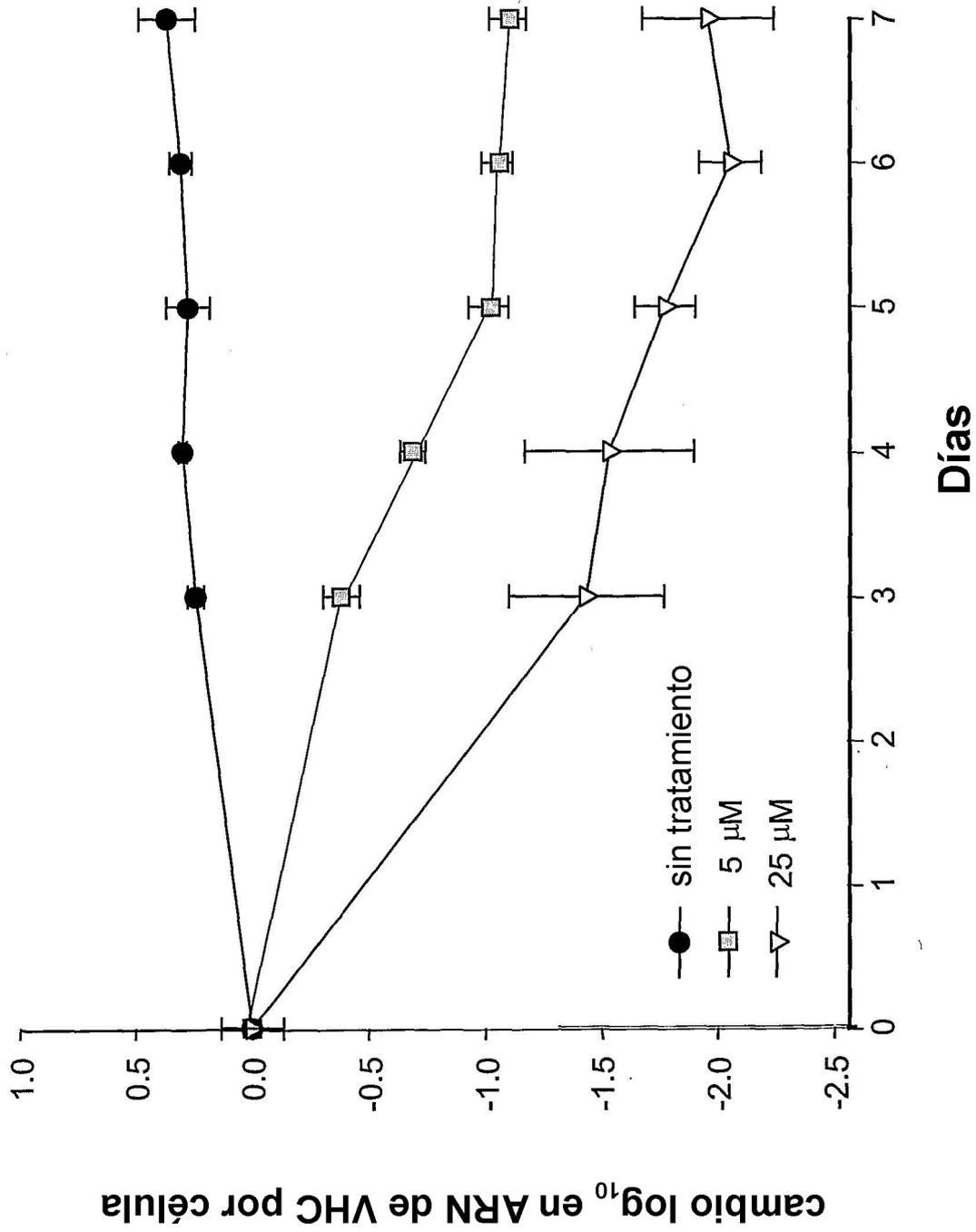


Figura 1B

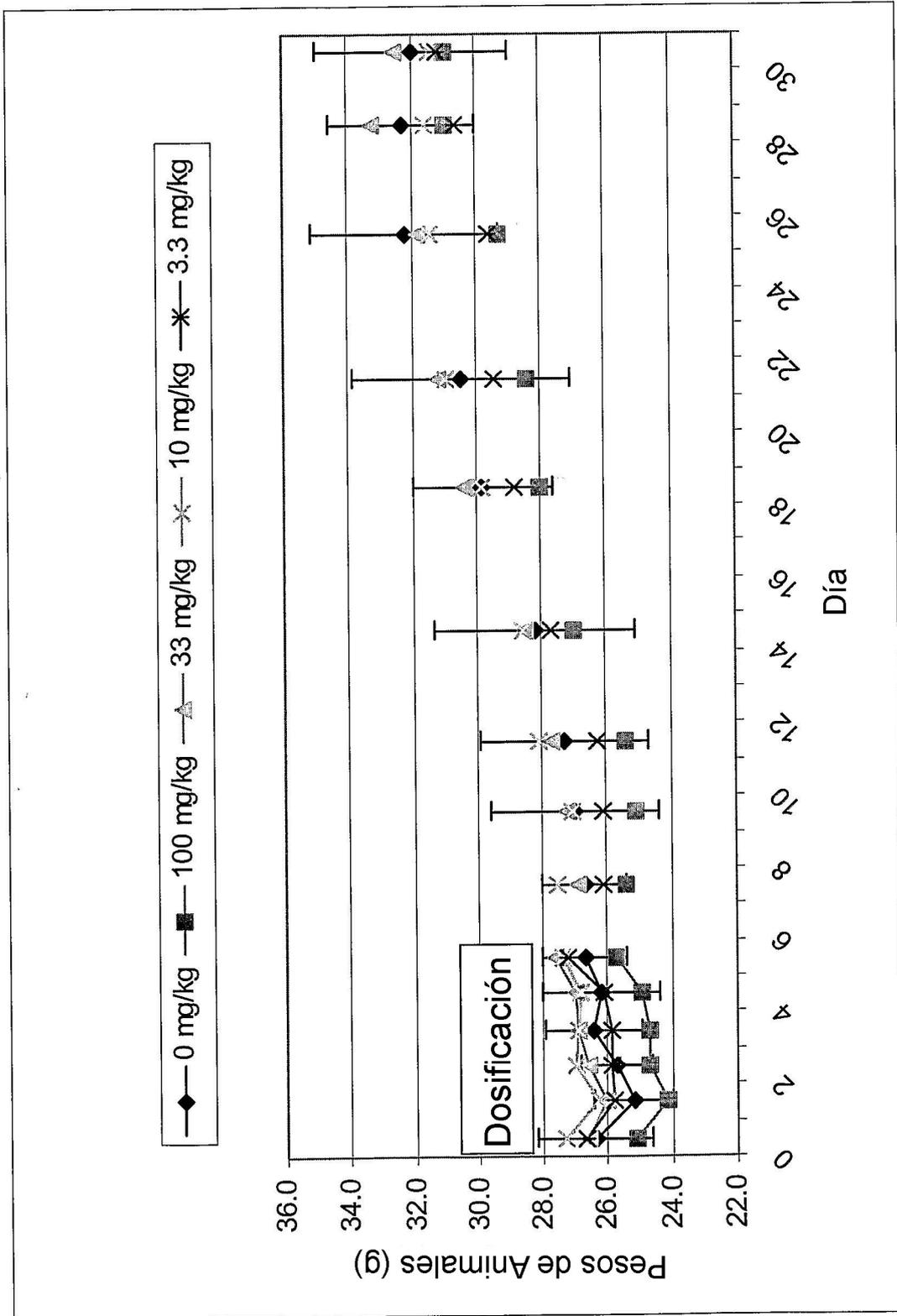


Figura 2

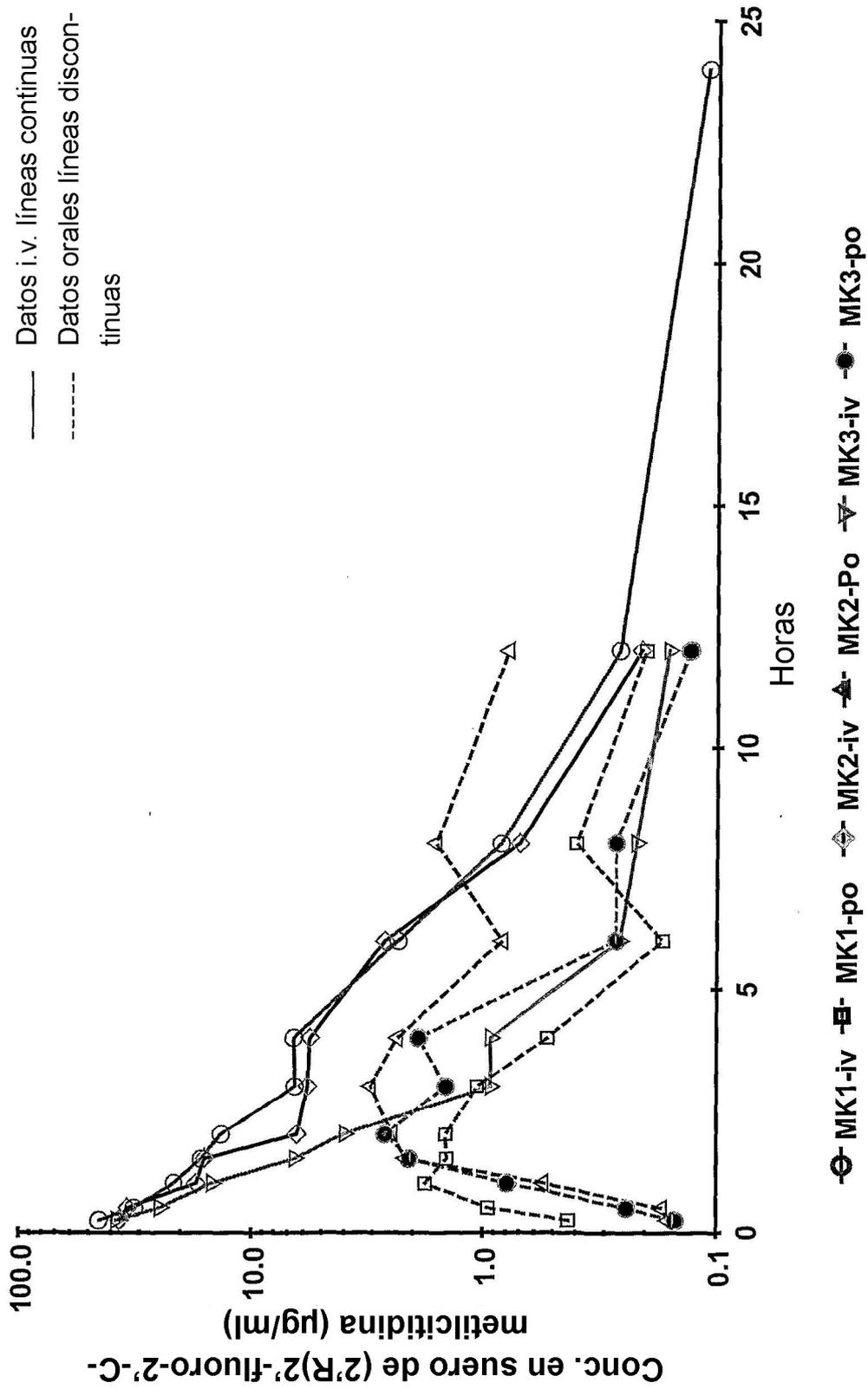


Figura 3