

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 178**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/7084 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2015 PCT/EP2015/070635**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16096174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2015 E 15762583 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3233882**

54 Título: **Dinucleótidos cíclicos fluorados para inducción de citocinas**

30 Prioridad:

16.12.2014 EP 14307054

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**KAYLA THERAPEUTICS (100.0%)
77 avenue de Toulouse
31240 L'Union, FR**

72 Inventor/es:

**VERNEJOU, FABIENNE;
TIRABY, GÉRARD y
LIOUX, THIERRY**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 764 178 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dinucleótidos cíclicos fluorados para inducción de citocinas

5 **Sector de la técnica**

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia. En el presente documento se desvelan dinucleótidos cíclicos (CDN) de fórmulas I, II y III. La invención se refiere, en particular, a desoxirribo-CDN fluorados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son capaces de inducir la producción de interferones de tipo I en células humanas y animales. La actividad de inducción de citocinas de estos dinucleótidos cíclicos requiere la presencia del receptor celular eucariota *estimulador de genes de interferón* (STING), como se ha demostrado *in vitro*.

15 **Estado de la técnica**Inmunoterapia de la inducción de citocinas

La inmunoterapia es un área de tratamiento médico en rápida expansión en la que el sistema inmunitario de un paciente se activa, suprime o de otro modo se modula deliberadamente para beneficio terapéutico. Los agentes inmunoterapéuticos incluyen células, antígenos (p. ej., fragmentos de bacterias o virus), anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, ligandos de origen natural y moléculas sintéticas. Las citocinas son mensajeros de glucoproteínas pequeñas conocidos principalmente por su papel en la organización de la respuesta inmunitaria a través de redes de señalización complejas, aunque también realizan funciones no inmunitarias. Se han explorado exhaustivamente como agentes inmunoterapéuticos. Sin embargo, la administración directa de citocinas como inmunoterapia está limitada por numerosos factores, incluyendo la muy corta semivida de las citocinas en la sangre, que debe compensarse con dosis frecuentes y dosis altas. Un enfoque de inmunoterapia muy prometedor es la *inducción de citocinas*, por lo que el paciente es tratado con un agente inmunomodulador que desencadena la producción de una o más citocinas terapéuticamente beneficiosas en su cuerpo según sea necesario.

30 STING, citocinas y respuesta inmunitaria

Un elemento importante en la producción fisiológica de citocinas es *estimulador de genes de interferón* (STING; también conocido como *ERIS*, *MITA*, *MPYS* o *TM173*), una proteína receptora transmembrana que es primordial en la inmunidad innata. El STING humano está codificado por el gen *TMEM173*. La activación de STING conduce a la producción de interferones de tipo I (p. ej., IFN- α e IFN- β), a través de la ruta de IRF3 (factor regulador de interferón 3); y a la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , etc.), a través de la ruta del factor de transcripción oncogénico NF- κ B (factor nuclear potenciador de cadena ligera kappa de linfocitos B activados). Por otra parte, los investigadores han informado recientemente de que, en respuesta a la infección vírica, STING activa STAT6 (transductor de señal y activador de la transcripción 6) para inducir (tipo Th2), aumentar (IL-12) o disminuir (IL-10) la producción de diversas citocinas, incluyendo las quimiocinas CCL2, CCL20 y CCL26 (Chen *et al.*, 2011)

Agonistas de STING

En la actualidad se sabe que el STING humano se activa de tres maneras: mediante la unión de dinucleótidos cíclicos exógenos (3',3') (c-diGMP, c-diAMP y c-GAMP) que son liberados por bacterias o arqueas invasoras (véase (Gomelsky, 2011) y referencias en el mismo); mediante la unión de monofosfato de guanosa cíclico-monofosfato de adenosina cíclico (2',3') ((2',3')c-GAMP), un dinucleótido cíclico endógeno recientemente descubierto que es producido por la enzima GMP-AMP cíclico sintasa (cGAS; también conocido como *C6orf150* o *MB21D1*) en presencia de ADN bicatenario exógeno (p. ej., el liberado por bacterias, virus o protozoos invasores) o de ADN propio en mamíferos (véase, por ejemplo: (Ablasser *et al.*, 2013) y (Zhang *et al.*, 2013)); o mediante la unión de ligandos sintéticos, tales como análogos de los dinucleótidos cíclicos de origen natural mencionados anteriormente (véase, por ejemplo: (Dubensky, Kanne, y Leong, 2013) y (Li *et al.*, 2014)).

Modulación de STING en inmunoterapia

Inspirado por la interacción entre STING, citocinas y la respuesta inmunitaria, así como por el creciente conjunto de conocimientos sobre las implicaciones clínicas de STING y sus mutaciones, los investigadores han comenzado muy recientemente a explorar STING como una diana terapéutica para innumerables indicaciones. Se están buscando nuevos agonistas de STING como agentes terapéuticos para la salud humana y animal en áreas tales como el cáncer o las enfermedades infecciosas. Los agonistas de STING de dinucleótidos cíclicos conocidos son una clase excelente de compuestos en los que basar los análogos que podrían presentar actividades biológicas interesantes o propiedades de tipo farmacológico deseables. La presente invención comprende nuevos dinucleótidos cíclicos para uso terapéutico en la salud humana y animal.

65 Takafumi Tezuka *et al.*, "Synthesis of 2'-Modified Cyclic Bis(3'-5')diadenylic Acids (c-di-AMPs) and Their Promotion of Cell Division in a Freshwater Green Alga", CHEMISTRY LETTERS, (20121208), vol. 41, n.º 12, se refiere a tres

ácidos bis(3'-5')diadenilícos cíclicos modificados en 2' (c-di-AMP) sintetizados a partir de fosforamiditas de adenosina disponibles en el mercado y la investigación de los efectos de derivados de c-di-AMP en la división celular de *Chlamydomonas reinhardtii*, un tipo de alga verde de agua dulce.

- 5 Benjamin T. Roembke *et al.*, "A cyclic dinucleotide containing 2-aminopurine is a general fluorescent sensor for c-di-GMP and 3',3'-cGAMP", MOLECULAR BIOSYSTEMS, (20140328), vol. 10, n.º 6, se refiere a un análogo, 3',3'-cG(d2AP)MP, que es un dinucleótido cíclico que contiene 2-aminopurina (2AP).

10 El documento WO2014179335 se refiere a composiciones, métodos, kits y ensayos relacionados con el uso y/o aprovechamiento de isómeros de cGAMP, así como la estructura de la enzima cGAS.

Objeto de la invención

CDN agonistas de STING

15 Se describen algunos ejemplos de dinucleótidos cíclicos (CDN) agonistas de STING en los documentos US/2014/0329889 y WO/2014/189805. Sin embargo, los autores solo sintetizaron químicamente y probaron biológicamente un número muy pequeño de los compuestos que serían teóricamente posibles a partir de los dibujos de estructura química extremadamente generales que proporcionan. No desvelan ninguna relación de estructura-actividad detallada ni describen ningún efecto de clase de clases estructurales particulares de CDN. En consecuencia, los autores proporcionan una escasa justificación para corroborar la elección de una clase estructural de CDN sobre otra con respecto a actividad de STING real u otras propiedades (por ejemplo, propiedades de tipo farmacológico) para una aplicación relacionada con STING deseada. Más recientemente, el documento WO/2015/077354 (PCT/US2014/066436) ha explorado agonistas de STING, incluyendo CDN, todos los cuales son (2',3')-CDN en los que ambos nucleótidos contienen un resto de azúcar ribosa y los dos nucleótidos están conectados por enlaces diéster de fosforotioato.

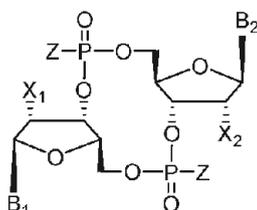
Lagunas de conocimiento sobre los CDN agonistas de STING

30 Se sabe muy poco acerca de la actividad biológica de diferentes clases estructurales de CDN. Específicamente, hay escasos precedentes de patentes sobre los efectos de clase según la clase estructural de CDN, ni existe ningún precedente de patente sobre cómo dichos efectos de clase podrían aprovecharse específicamente para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación específicas relacionadas con la actividad de STING. Dicha información será crítica para el descubrimiento y aprovechamiento de nuevos CDN agonistas de STING con propiedades deseables para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación basadas en la manipulación de la actividad de STING.

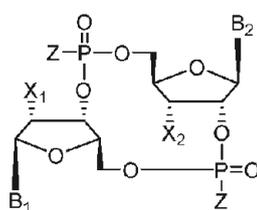
La presente invención

40 Teniendo en cuenta la escasez de relaciones de estructura-actividad señaladas para los agonistas de STING, el campo de los agonistas de STING es propicio para la invención. En este contexto, la presente invención se refiere a desoxirribo-CDN fluorados agonistas de STING que presentan efectos de clase únicos, no obvios y previamente no señalados en relación con sus correspondientes análogos no fluorados.

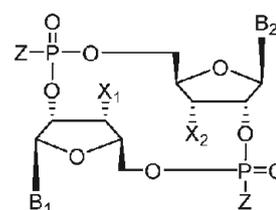
45 En el trabajo de los inventores que explora los dinucleótidos cíclicos (CDN) como compuestos inmunomoduladores y posibles agonistas de STING, inicialmente se buscó sintetizar y ensayar CDN de las siguientes fórmulas (I), (II) y (III):



Fórmula (I)



Fórmula (II)



Fórmula (III)

50 en las que:

• X₁ es H, OH o F;

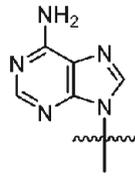
55 • X₂ es H, OH o F;

- Z es OH, OR₁, SH o SR₁, en las que:

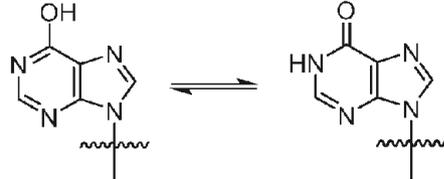
- R₁ es Na o NH₄, o
- R₁ es un grupo lábil a enzimas que proporciona OH o SH *in vivo*, tal como pivaloiloximetilo;

5

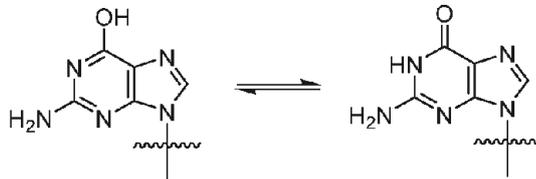
- B₁ y B₂ son bases seleccionadas entre:



Adenina,



Hipoxantina o



Guanina

10

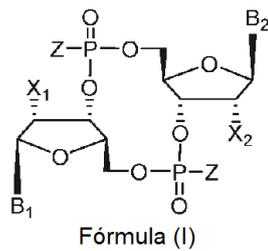
con la condición de que:

- en la Fórmula (I): X₁ y X₂ no sean OH,
- en la Fórmula (II): cuando X₁ y X₂ son OH, B₁ no sea adenina y B₂ no sea guanina, y
- en la Fórmula (III): cuando X₁ y X₂ son OH, B₁ no sea adenina, B₂ no sea guanina y Z no sea OH.

15

La presente invención proporciona varios DNC de Fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, es decir compuestos de Fórmula (I):

20



Fórmula (I)

en las que:

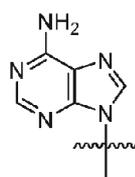
- X₁ es H o F;
- X₂ es H o F;
- Al menos uno entre X₁ y X₂ es un átomo de flúor;
- Z es OH, OR₁, SH o SR₁, en las que:

25

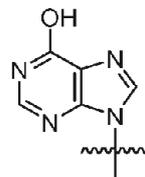
- R₁ es Na o NH₄, o
- R₁ es un grupo lábil a enzimas que proporciona OH o SH *in vivo*, tal como pivaloiloximetilo;

30

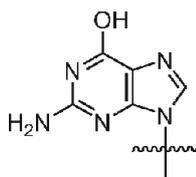
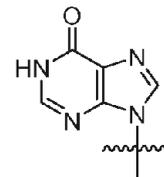
- B₁ y B₂ son bases seleccionadas entre:



Adenina,



Hipoxantina o



Guanina

y B₁ es una base diferente de B₂,

5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En la presente divulgación, la expresión "dinucleótido cíclico" (abreviado como "DNC") representa una clase de moléculas cíclicas con dos engarces de fosfodiéster, o dos engarces de diéster fosforotioato, o un engarce fosfodiéster y un engarce diéster fosforotioato, entre dos nucleósidos. Esto incluye engarces de (3',5')-(3',5') nucleótido (abreviados como (3',3')); engarces de (3',5')-(2',5') nucleótido (abreviados como (3',2')); engarces de (2',5')-(3',5') nucleótido (abreviados como (2',3')); y engarces de (2',5')-(2',5') nucleótido (abreviados como (2',2')).

10

El término "nucleósido" se refiere a una glicosilamina que comprende una base nitrogenosa y un azúcar de cinco carbonos, en el que la base nitrogenosa está enlazada al azúcar de cinco carbonos mediante un engarce beta-glicosídico.

15

El término "nucleótido" se refiere a cualquier nucleósido unido a un grupo fosfato en la posición 5', 3' o 2' del resto de azúcar.

20

Las "sales farmacéuticamente aceptables" incluyen las obtenidas a partir de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos, tales como calcio y magnesio, entre otros muchos ácidos conocidos en la técnica farmacéutica.

25

La expresión "profármaco farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo, se hidroliza u oxida, en el huésped (es decir el ser humano o sujeto animal que recibe el compuesto) para formar el compuesto de la presente invención. Los ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos lábiles biológicamente en restos funcionales del compuesto activado. Los profármacos incluyen compuestos que se pueden oxidar, reducir, aminorar, desaminar, hidroxilar, deshidroxilar, hidrolizar, deshidrolizar, alquilar, desalquilar, acilar, desacilar, fosfolizar o desfosforilar para producir el compuesto activo.

30

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado activo o inactivo de un compuesto representado por la Fórmula estructural (I) como se ha definido anteriormente en el presente documento o una cualquiera de sus realizaciones específicas, que experimenta transformación espontánea o enzimática dentro del organismo de un animal, por ejemplo un mamífero, tal como un ser humano, para liberar la forma farmacológicamente activa del compuesto. Para una revisión exhaustiva, véase (Rautio et al., 2008).

35

En particular, en el presente documento se desvelan profármacos de los compuestos representados por la Fórmula estructural (I), incluyendo una cualquiera de sus realizaciones específicas descritas anteriormente, que pueden formarse según se describe en detalle en (Hecker & Erion, 2008).

40

El profármaco de fosfato puede tomar la forma de un éster, en particular aciloxialquil ésteres (por ejemplo, pivaloiloximetil éster (POM)) o S-aciltioetil ésteres (SATE), un carbonato, un carbamato o una amida, tal como profármacos de aminoácido.

45

5 La expresión "grupo protector lábil a enzimas" representa un grupo designado para permitir una difusión pasiva de un compuesto a través de las membranas celulares o parásicas mediante enmascaramiento de carga, de modo que, una vez en el interior de la célula o en el interior del parásito, el compuesto experimenta una transformación enzimática (o desprotección) que proporciona un grupo OH o SH. Los ejemplos de grupos protectores lábiles a enzimas incluyen, por ejemplo, grupos aciloxialquilo, tales como pivaloiloximetilo (POM) o S-aciltioetilo (SATE) o grupos de aminoácidos.

10 En la presente descripción, se considera que la expresión "dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I)" también incluyen las sales farmacéuticamente aceptables o profármacos farmacéuticamente aceptables de dichos dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I).

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ o B₂ es guanina.

15 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ o B₂ es adenina.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ o B₂ son hipoxantina.

20 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ y B₂ se seleccionan independientemente entre guanina o adenina.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ o B₂ se seleccionan independientemente entre guanina o hipoxantina.

25 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ y B₂ se seleccionan independientemente entre adenina o hipoxantina.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando Z es OH.

30 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando Z es SH.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando Z es OH o SH.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando Z es SR₁, en las que:

35 i) R₁ es Na o NH₄, o

ii) R₁ es un grupo lábil a enzimas que proporciona OH o SH *in vivo*, tal como pivaloiloximetilo.

40 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ y B₂ se seleccionan independientemente entre adenina o hipoxantina y X₁ y X₂ son idénticos. Preferiblemente, X₁ y X₂ son OH o un átomo de flúor. En una realización particular, Z es OH o SH.

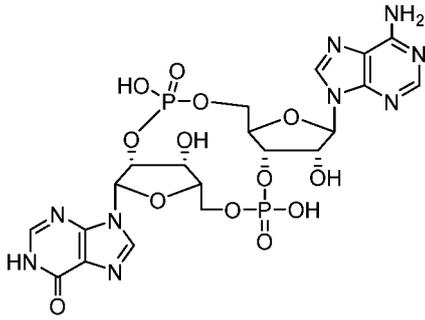
45 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ y B₂ se seleccionan independientemente entre guanina o hipoxantina y X₁ y X₂ son idénticos. Preferiblemente, X₁ y X₂ son OH o un átomo de flúor. En una realización particular, Z es OH o SH.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando B₁ y B₂ se seleccionan independientemente entre adenina o guanina y X₁ y X₂ son idénticos. Preferiblemente, X₁ y X₂ son OH o un átomo de flúor. En una realización particular, Z es OH o SH.

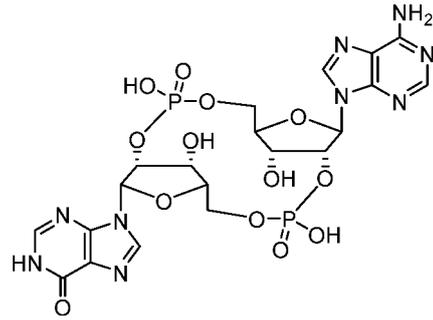
50 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando X₁ y X₂ no son un átomo de flúor.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando al menos uno entre X₁ y X₂ es un átomo de flúor. En una realización particular, X₁ y X₂ son ambos un átomo de flúor.

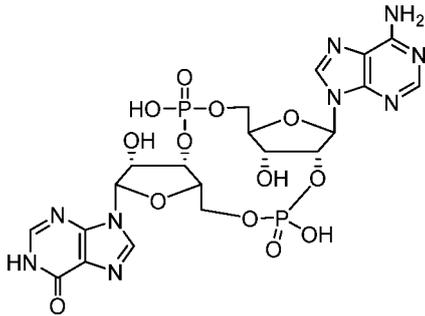
55 En el presente documento se desvelan los siguientes dinucleótidos cíclicos (cada uno de los cuales se proporciona con un código de cinco caracteres con el formato "CL####"):



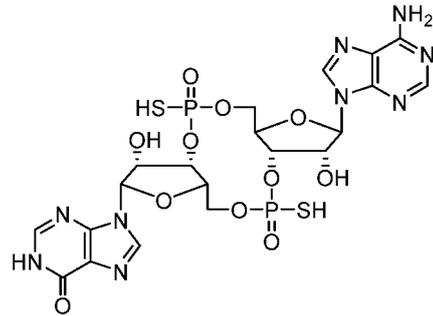
CL606
(3',2')c-AIMP



CL611
(2',2')c-AIMP



CL602
(2',3')c-AIMP

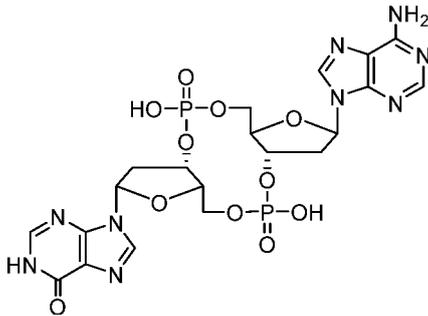


CL655
c-AIMP(S)

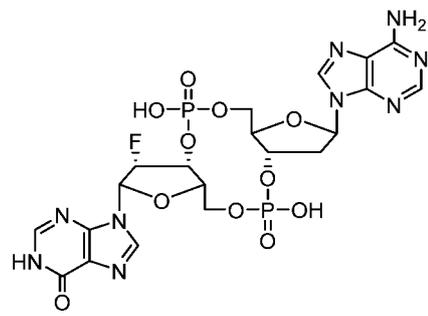
5 o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) es cuando uno o ambos nucleósidos están modificados en la posición 2'.

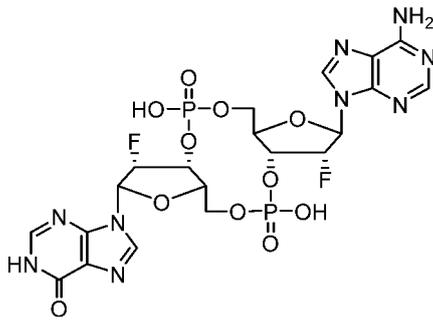
10 Esta clase comprende los siguientes compuestos, en la que CL604 no forma parte de la invención:



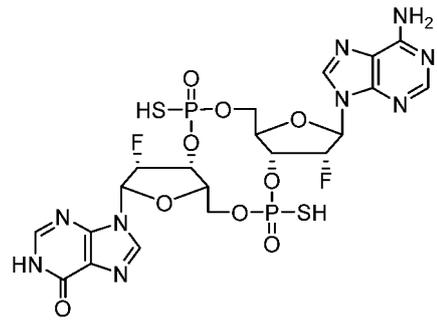
CL604
c-(dAMP-dIMP)



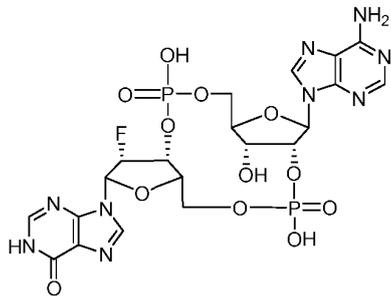
CL609
c-(dAMP-2'FdIMP)



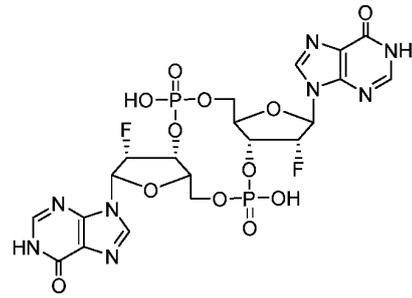
CL614
c-(2'FdAMP-2'FdIMP)



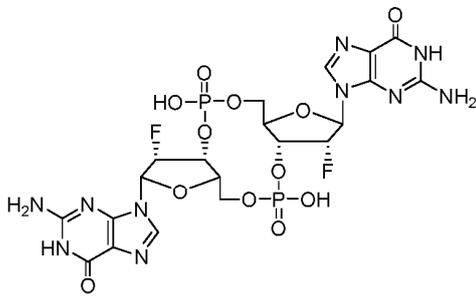
CL656
c-[2'FdAMP(S)-2'FdIMP(S)]



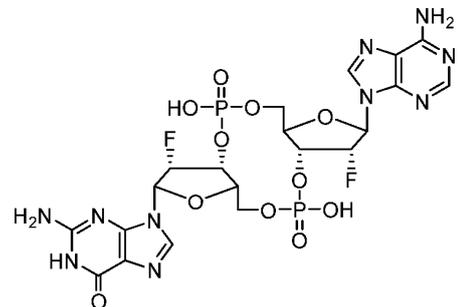
CL647
(2',3')c-(AMP-2'FdIMP)



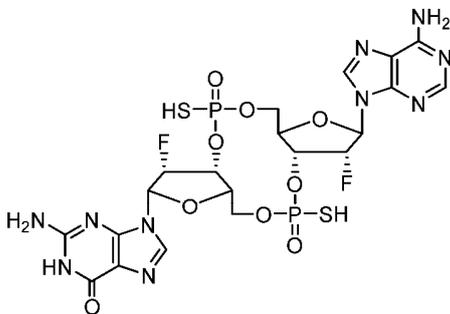
CL626
c-di(2'FdIMP)



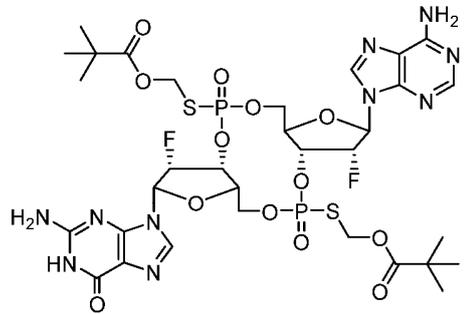
CL629
c-di(2'FdGMP)



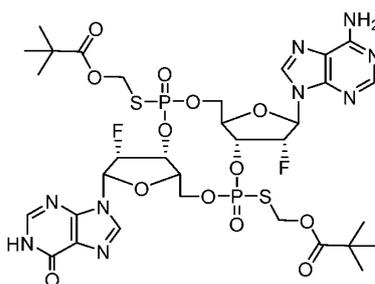
CL603
c-(2'FdGMP-2'FdAMP)



CL632
c-[2'FdGMP(S)-2'FdAMP(S)]



CL633
c-[2'FdGMP(S)-2'FdAMP(S)](POM)₂

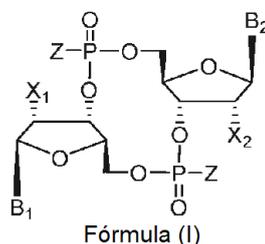


CL659

c-[2'FdAMP(S)-2'FdIMP(S)](POM)₂

Se identificó un subconjunto estructuralmente sin precedentes de estos CDN que mostraban una actividad biológica sorprendente y que nunca antes se habían señalado como agonistas de STING. Estos CDN forman la base de la presente invención y son distintos de los CDN agonistas de STING previamente señalados (véase, por ejemplo: documentos US/2014/0329889 y WO/2014/189805). Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona CDN que están definidos por todos los siguientes criterios estructurales: en primer lugar, a diferencia de los CDN de origen natural, en los que el resto de azúcar de cada nucleótido es una ribosa, en los CDN de la presente invención, el resto de azúcar de cada nucleótido es una 2'-desoxirribosa; en segundo lugar, en los CDN de la presente invención, o bien la posición 2' del resto de azúcar en ambos nucleótidos debe estar sustituida con un átomo de flúor o la posición 2' del resto de azúcar de un nucleótido debe estar sustituida con un átomo de flúor mientras que la posición 2' del resto de azúcar del otro nucleótido debe estar sustituida con un átomo de hidrógeno; en tercer lugar, en los CDN de la presente invención, la base en cada nucleótido se elige de entre guanina, adenina o hipoxantina, con la condición de que los dos nucleótidos del CDN no puedan contener la misma base.

Por lo tanto, la presente invención proporciona varios DNC de Fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, es decir compuestos de Fórmula (I):



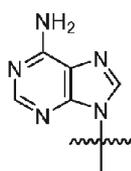
Fórmula (I)

en las que:

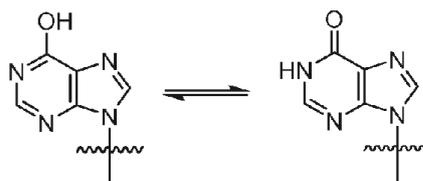
- X₁ es H o F;
- X₂ es H o F;
- Al menos uno entre X₁ y X₂ es un átomo de flúor;
- Z es OH, OR₁, SH o SR₁, en las que:

- i) R₁ es Na o NH₄, o
- ii) R₁ es un grupo lábil a enzimas que proporciona OH o SH *in vivo*, tal como pivaloiloximetilo;

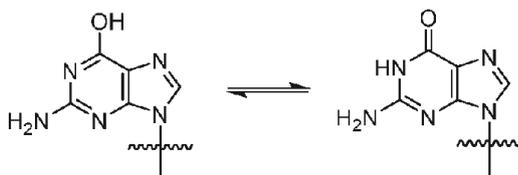
- B₁ y B₂ son bases seleccionadas entre:



Adenina,



Hipoxantina o



Guanina,

y B₁ es una base diferente de B₂,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 La expresión "B₁ es una base diferente de B₂" incluye B₁ es guanina y B₂ es adenina o B₁ es guanina y B₂ es hipoxantina o B₁ es adenina y B₂ es guanina o B₁ es adenina y B₂ es hipoxantina o B₁ es hipoxantina y B₂ es guanina o B₁ es hipoxantina y B₂ es adenina.

10 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son ambos F.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son ambos F y Z es OH.

15 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son ambos F y Z es OR₁ como se ha definido anteriormente.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son ambos F y Z es SH como se ha definido anteriormente.

20 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son ambos F y Z es SR₁ como se ha definido anteriormente.

25 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son diferentes (es decir X₁ = H y X₂ = F o X₁ = F y X₂ = H).

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son diferentes y Z es OH.

30 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son diferentes y Z es OR₁ como se ha definido anteriormente.

Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son diferentes y Z es SH como se ha definido anteriormente.

35 Una clase particular de dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente es cuando X₁ y X₂ son diferentes y Z es SR₁ como se ha definido anteriormente.

40 Los dinucleótidos cíclicos de la presente invención inducen interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias *in vitro* en células humanas, células animales y sangre humana. La actividad inductora de citocinas de estos dinucleótidos cíclicos requiere la presencia de STING, según lo confirmado por experimentos *in vitro* en células humanas o animales.

Los dinucleótidos cíclicos de la invención son agonistas del receptor STING.

45 El término "agonista" se refiere a cualquier sustancia que active un receptor biológico *in vitro* o *in vivo* para provocar

una respuesta fisiológica.

5 **"STING"** es una abreviatura de "estimulador de genes de interferón", que también se conoce como "estimulador de interferón del retículo endoplásmico (ERIS)", "mediador de la activación de IRF3 (MITA)", "MPYS" o "proteína transmembrana 173 (TM173)". STING es una proteína receptora transmembrana que en seres humanos está codificada por el gen *TMEM173*. La activación de STING por dinucleótidos cíclicos (CDN) conduce a la activación de las rutas de IRF3 y NF-κB y, en consecuencia, a la inducción de interferones de tipo I y de citocinas proinflamatorias, respectivamente. En respuesta a la infección vírica, STING activa STAT6 (transductor de señal y activador de la transcripción 6) para inducir (tipo Th2), aumentar (IL-12) o disminuir (IL-10) la producción de diversas citocinas, incluyendo las quimiocinas CCL2, CCL20 y CCL26 (Chen *et al.*, 2011).

La expresión **"agonista de STING"** se refiere en el presente documento a una sustancia que activa el receptor STING *in vitro* o *in vivo*. Según la invención, un compuesto se considera un agonista de STING si:

- 15 - induce interferones de tipo I *in vitro* en células humanas o animales que contienen STING activo; y
- no induce interferones de tipo I *in vitro* en células humanas o animales que no contienen STING activo.

20 Una prueba habitual para determinar si un ligando es un agonista de STING es incubar el ligando en una línea celular humana o animal de tipo silvestre y en la línea celular correspondiente en la que el gen codificante de STING ha sido inactivado genéticamente por supresiones de bases pequeñas o largas (p. ej., una línea celular con inactivación de STING homocigota). Un agonista de STING inducirá interferones de tipo I en las células de tipo silvestre pero no inducirá interferones de tipo I en las células en las que el gen codificante de STING ha sido inactivado.

25 Los dinucleótidos cíclicos de la invención inducen interferones de tipo I *in vitro* en células humanas o animales que contienen STING activo. Sin embargo, no inducen interferones de tipo I *in vitro* en células humanas o animales que no contienen STING activo.

30 La presente invención se refiere a dinucleótidos desoxirribocíclicos fluorados (CDN). Específicamente, se refiere a (3',3')-2'(mono o di-fluorado)-2'-desoxirribo-(CDN).

35 Los dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) en donde al menos uno entre X_1 y X_2 es un átomo de flúor, en particular X_1 y X_2 son ambos un átomo de flúor, y Z es OH inducen más actividad de interferón de tipo I y NF-κB que sus homólogos no fluorados en líneas celulares humanas y murinas.

40 Los dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) en donde al menos uno entre X_1 y X_2 es un flúor, en particular X_1 y X_2 son ambos un átomo de flúor, y Z es OH o SH presentan eliminación más lenta de la sangre después de inyección intravenosa en ratones, es decir, cinética de depuración más larga y mayor resistencia a la escisión enzimática *in vitro*; en comparación con sus CDN no fluorados correspondientes.

Formulaciones de sales o profármacos de los dinucleótidos cíclicos

45 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos, tales como calcio y magnesio, entre otros muchos ácidos conocidos en la técnica farmacéutica. La expresión "profármacos farmacéuticamente aceptables" se refiere a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo, se hidroliza u oxida, en el huésped (es decir el ser humano o sujeto animal que recibe el compuesto) para formar el compuesto de la presente invención. Los ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos lábiles biológicamente en restos funcionales del compuesto activado. Los profármacos incluyen compuestos que se pueden oxidar, reducir, aminor, desaminar, hidroxilar, deshidroxilar, hidrolizar, deshidrolizar, alquilar, desalquilar, acilar, desacilar, fosfolirar o desfosfolirar para producir el compuesto activo.

55 Los profármacos de DNC descritos en el presente documento pueden administrarse para aumentar adicionalmente la actividad, biodisponibilidad o estabilidad, o alterar de otro modo las propiedades del monofosfato de DNC.

Se conocen varios ligandos de profármacos de DNC. En general, la alquilación, acilación u otras modificaciones lipófilas en el resto fosfato, o el uso de otro análogo del nucleósido, aumentarán la estabilidad del nucleótido.

60 Algunos ejemplos de grupos sustituyentes que pueden reemplazar uno o más hidrógenos en el resto fosfato son alquilo, arilo, esteroides, carbohidratos, incluyendo, pero sin limitación, azúcares, 1,2-diacilglicerol y alcoholes. Muchos se describen en (Jones, 1995).

Uso de los compuestos de la invención

65 Otro objeto de la presente invención son los dinucleótidos cíclicos de Fórmula (I) para su uso en un tratamiento

terapéutico en seres humanos o animales.

En particular, los compuestos de la presente invención pueden usarse para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico en la salud humana o animal. Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar diferentes posibles aplicaciones de la presente invención; sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la invención.

La expresión "agente terapéutico" se refiere a una o más sustancias que se administran a un ser humano o animal para lograr algún tipo de efecto terapéutico en ese ser humano o animal, incluyendo prevenir, curar o mitigar los efectos de, la infección o enfermedad, y/o para mejorar la salud de ese ser humano o animal.

El término "monoterapia" se refiere al uso de una sola sustancia y/o estrategia para tratar a un ser humano o animal en cualquier contexto clínico o médico, a diferencia del uso de múltiples sustancias y/o estrategias para tratar a un ser humano o animal en el mismo contexto clínico o médico, independientemente de si las múltiples sustancias y/o estrategias se usan secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente.

La expresión "agente quimioterapéutico" en el presente documento se refiere a una o más sustancias químicas que se administran a un ser humano o animal para destruir tumores o ralentizar o detener el crecimiento de tumores, y/o ralentizar o detener la división de células cancerosas y/o prevenir o ralentizar la metástasis. Los agentes quimioterapéuticos se administran con frecuencia para tratar el cáncer, pero también están indicados para otras enfermedades.

El término "quimioterapia" se refiere al tratamiento médico de un ser humano o animal con uno o más agentes quimioterapéuticos (véase la definición anterior).

El término "quimioinmunoterapia" se refiere al uso combinado, ya sea secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente, de sustancias y/o estrategias de quimioterapia y sustancias y/o estrategias de inmunoterapia. La quimioinmunoterapia se emplea con frecuencia para tratar el cáncer, pero también puede emplearse para tratar otras enfermedades.

La expresión "sistema inmunitario" se refiere al conjunto, o a uno cualquiera o más componentes, de las moléculas, sustancias (p. ej., líquidos corporales), estructuras anatómicas (p. ej., células, tejidos y órganos) y procesos fisiológicos implicados en la prevención de infecciones en el cuerpo, en la protección del cuerpo durante una infección o enfermedad y/o en la asistencia al cuerpo para recuperarse después de una infección o enfermedad. Una definición completa de "sistema inmunitario" está más allá del alcance de esta patente; sin embargo, esta expresión debe ser entendida por cualquier profesional habitual en este campo.

La expresión "agente inmunitario" se refiere a cualquier sustancia endógena o exógena que pueda interactuar con uno o más componentes del sistema inmunitario. La expresión "agente inmunitario" incluye anticuerpos, antígenos, vacunas y sus componentes constituyentes, ácidos nucleicos, fármacos sintéticos, compuestos orgánicos naturales o sintéticos, citocinas, células naturales o modificadas, análogos sintéticos de los mismos y/o fragmentos de los mismos.

El término "inmunoterapia" se refiere a cualquier tratamiento médico en el que uno o más componentes del sistema inmunitario de un ser humano o animal se modulan deliberadamente para lograr directa o indirectamente algún beneficio terapéutico, incluyendo efectos sistémicos y/o locales, y efectos preventivos y/o curativos. La inmunoterapia puede implicar la administración de uno o más agentes inmunitarios (véase la definición anterior), ya sea solos o en cualquier combinación, a un sujeto humano o animal por cualquier vía (p. ej., por vía oral, por vía intravenosa, por vía dérmica, por inyección, por inhalación, etc.), ya sea de manera sistémica, local o ambas. La "inmunoterapia" puede implicar provocar, incrementar, disminuir, detener, prevenir, bloquear o modular de otro modo la producción de citocinas, y/o activar o desactivar citocinas o células inmunitarias, y/o modular los niveles de células inmunitarias, y/o administrar una o más sustancias terapéuticas o de diagnóstico a una ubicación particular en el cuerpo o a un tipo particular de célula o tejido y/o destruir células o tejidos particulares. La inmunoterapia se puede usar para lograr efectos locales, efectos sistémicos o una combinación de ambos.

El término "inmunodeprimido" describe el estado de cualquier sujeto humano o animal cuyo sistema inmunitario está funcionalmente disminuido, desactivado o comprometido de otro modo, o en el que uno o más componentes inmunitarios están funcionalmente disminuidos, desactivados o comprometidos de otro modo. La "inmunosupresión" puede ser la causa, la consecuencia o el subproducto de la enfermedad, infección, agotamiento, desnutrición, tratamiento médico o algún otro estado fisiológico o clínico.

Las expresiones "sustancia inmunomoduladora", "sustancia inmunomoduladora", "agente inmunomodulador" e "inmunomodulador", usados aquí como sinónimos, se refieren a cualquier sustancia que, tras su administración a un ser humano o animal, influye directamente en el funcionamiento del sistema inmunitario de ese ser humano o animal. Los ejemplos de inmunomoduladores habituales incluyen, pero sin limitación, antígenos, anticuerpos y fármacos de molécula pequeña.

El término "vacuna" se refiere a una preparación biológica administrada a un ser humano o animal con el fin de inducir o potenciar una respuesta específica del sistema inmunitario y/o protección contra uno o más antígenos en ese ser humano o animal.

5 El término "vacunación" se refiere al tratamiento de un ser humano o animal con una vacuna o al acto de administrar una vacuna a un ser humano o animal.

10 El término "adyuvante" se refiere a una sustancia terapéutica secundaria que se administra conjuntamente (ya sea secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente) con una sustancia terapéutica primaria para lograr algún tipo de efecto complementario, sinérgico o de otro modo beneficioso que no podría lograrse mediante el uso de la sustancia terapéutica primaria sola. Se puede usar un adyuvante junto con una vacuna, quimioterapia o alguna otra sustancia terapéutica. Los adyuvantes pueden potenciar la eficacia de la sustancia terapéutica primaria, reducir la toxicidad o los efectos secundarios de la sustancia terapéutica primaria o proporcionar algún tipo de protección al sujeto que recibe la sustancia terapéutica primaria, tal como, pero sin limitación, funcionamiento mejorado del sistema inmunitario.

20 En una realización, el dinucleótido cíclico de fórmula (I) se puede administrar como inmunoterapia a un ser humano o un animal para inducir la producción *in vivo* de una o más citocinas que son terapéuticamente beneficiosas para ese ser humano o animal. Este tipo de inmunoterapia podría usarse sola o en combinación con otras estrategias de tratamiento, ya sea secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente. Podría usarse para prevenir, curar y/o mitigar los efectos de, la infección o enfermedad en ese ser humano o animal y/o modular el sistema inmunitario de ese ser humano o animal para lograr algún otro beneficio terapéutico.

25 En una realización particular, los dinucleótidos cíclicos de la presente invención pueden usarse para inmunoterapia de inducción de citocinas de individuos inmunodeprimidos.

30 En este ejemplo, se administraría un dinucleótido cíclico de fórmula (I) a un sujeto humano o animal inmunodeprimido para inducir la producción *in vivo* de una o más citocinas que potencian directa o indirectamente el sistema inmunitario de ese ser humano o animal. Los sujetos que podrían beneficiarse de dicho tratamiento incluyen los que padecen trastornos autoinmunitarios, deficiencias o defectos del sistema inmunitario, infecciones microbianas o víricas, enfermedades infecciosas o cáncer.

35 Se desvela por tanto en el presente documento un método para inducir citocinas en individuos inmunodeprimidos, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que lo necesite un dinucleótido cíclico de fórmula (I) o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 En otra realización, los dinucleótidos cíclicos de la presente invención pueden usarse para inmunoterapia de inducción de citocinas en combinación con quimioterapia.

45 En este ejemplo, se administraría un dinucleótido cíclico de fórmula (I) junto con uno o más agentes quimioterapéuticos, secuencialmente en cualquier orden o conjuntamente, a un paciente con cáncer para detener el crecimiento de, reducir y/o destruir tumores en ese paciente. La quimioinmunoterapia resultante de la combinación de la inducción de citocinas, proporcionada por el compuesto o los compuestos de la presente invención, y citotoxicidad, proporcionada por el agente o los agentes quimioterapéuticos, podría ser menos tóxica para el paciente, provocar menos efectos secundarios en el paciente y/o presentar mayor eficacia antitumoral que los agentes quimioterapéuticos cuando se usan como monoterapia.

50 Se desvela en el presente documento un método para tratar el cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que lo necesite:

- un agente quimioterapéutico; y
- un dinucleótido cíclico de fórmula (I) o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 En otra realización, los dinucleótidos cíclicos de la presente invención pueden usarse para inmunoterapia de inducción de citocinas como terapia adyuvante de vacunas.

60 En este ejemplo, se administraría un dinucleótido cíclico de fórmula (I) a un sujeto humano o animal que haya recibido, esté recibiendo o vaya a recibir una vacuna. Los beneficios proporcionados por la presente invención podrían incluir mayor eficacia de la vacuna contra el antígeno diana, menor toxicidad de la vacuna, menores efectos secundarios adversos de la vacuna o mejor protección inmunológica del sujeto humano o animal.

Otro objeto de la presente invención son los dinucleótidos cíclicos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana, una infección vírica o un cáncer.

65 Como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a la condición fisiológica en sujetos que se caracteriza

por crecimiento o muerte celular no regulados o desregulados. El término "cáncer" incluye tumores sólidos y tumores sanguíneos, ya sea malignos o benignos.

5 En una realización preferida, el cáncer es del siguiente grupo: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colangiocelular, leucemia, cáncer de pulmón, linfoma, cáncer nasofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer urotelial.

En una realización particular, el cáncer es un tumor pancreático sólido.

10 Se desvela en el presente documento un método para tratar una infección bacteriana, una infección vírica o un cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que lo necesite un dinucleótido cíclico de fórmula (I) o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Otro objeto de la presente invención son los dinucleótidos cíclicos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una patología que puede aliviarse mediante la inducción de una respuesta inmunitaria a través de la ruta de STING.

Otro objeto de la presente invención es un kit de partes que comprende un dinucleótido cíclico de fórmula (I) y un agente quimioterapéutico para su uso en el tratamiento de tumores pancreáticos sólidos.

20 La expresión "kit de partes" en el presente documento se refiere a una preparación combinada en la que los principios activos están separados físicamente para su uso en una terapia combinada mediante la administración simultánea o administración secuencial al paciente.

25 Por lo tanto, según la presente invención, el agente quimioterapéutico y el dinucleótido cíclico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se van a administrar al paciente en una forma separada, ya sea simultáneamente, por separado o secuencialmente en cualquier orden, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico es gemcitabina.

30 **Desoxinucleósidos para la síntesis de dinucleótidos cíclicos**

Pueden usarse nucleósidos naturales, 2'-desoxi-adenosina (dA), 2'-desoxi-guanosina (dG) o 2'-desoxi-inosina (dI) para la síntesis de CDN de las fórmulas (I) y (II).

35 La 3'-desoxi-adenina, 3'-desoxi-guanosina o 3'-desoxi-inosina para CDN de las fórmulas (II) y (III) se refieren a una unidad de nucleósidos que tiene un resto de azúcar, por ejemplo, un resto ribosilo o un resto xilosilo que se modifica en la posición 3' de modo que el grupo hidroxilo (3'-OH) se reemplaza por un grupo hidrógeno.

40 **Nucleósidos sustituidos con flúor para la síntesis de CDN**

40 Dado que STING está ubicado en el retículo endoplásmico y detecta dinucleótidos cíclicos en el citoplasma, cualquier agonista de STING destinado al uso terapéutico debe ser capaz de penetrar en las células. Asimismo, una mayor captación celular de un compuesto se traduce en una mayor biodisponibilidad, que es una propiedad deseable para su uso clínico. En la presente invención, los compuestos fluorados se diseñaron para explorar la
45 posibilidad de que una mayor captación celular conferida por uno o dos átomos de flúor condujera a una mayor actividad de inducción de interferón de tipo I que la del compuesto de referencia, c-AIMP, que no contiene ningún átomo de flúor.

50 En la presente invención, sorprendentemente los inventores han descubierto que los CDN objeto, todos los cuales contienen al menos un átomo de flúor, son más activos como agonistas de STING que sus análogos no fluorados correspondientes. Específicamente, los CDN de la presente invención presentan mayor actividad de inducción de citocinas dependiente de STING en células humanas, células animales y sangre humana que sus análogos no fluorados correspondientes.

55 Cuanto más rápido se degrade enzimáticamente un fármaco en el cuerpo, más corta será su semivida y, en consecuencia, menor será su actividad. Por tanto, una propiedad deseable para los compuestos destinados al uso terapéutico es la resistencia a la degradación enzimática. Existen pruebas de escisión enzimática *in vitro* que pueden proporcionar alguna indicación de la resistencia de un compuesto dado a las enzimas habituales que degradan compuestos que son estructuralmente similares al que se está probando. En el trabajo de los inventores, les
60 sorprendió mucho descubrir otra característica distintiva más de los CDN objeto de la presente invención: estos desoxirribo-CDN fluorados mostraron uniformemente una resistencia superior a la escisión por fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD) o nucleasa P1 (NP1), en comparación con sus correspondientes ribo-CDN no fluorados.

65 **Monofluoronucleósido**

El 2'-desoxi-2'-fluoro de adenosina, guanosina o inosina para CDN de fórmula (I) y (II) se refiere a un nucleósido con una modificación en la posición 2', de modo que el grupo hidroxilo (2'-OH) se reemplaza por un grupo fluoro (2'-F).

5 Los derivados de 2'-fluoronucleósidos para la síntesis de CDN de fórmula (I) y (II) pueden prepararse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo: (Herdewijna, 1989; Thomas, 1994) y (Ross, 1997)).

El 3'-desoxi-3'-fluoro de adenosina, guanosina o inosina para CDN de fórmula (II) y (III) se refiere a un nucleósido con una modificación en la posición 3', de modo que el grupo hidroxilo (3'-OH) se reemplaza por un grupo fluoro (3'-F).

10

Enlace internucleotídico de fosforotioato

El enlace internucleotídico de fosforotioato se refiere al reemplazo de un grupo P=O con un grupo P=S e incluye enlaces internucleotídicos de fosforoditioato. Uno o ambos enlaces internucleotídicos que están presentes en los dinucleótidos cíclicos pueden ser enlaces internucleotídicos de fosforotioato.

15

El átomo de fósforo en un enlace fosfodiéster de CDN puede describirse como "pro-quiral". Una vez que se reemplaza o modifica un átomo de oxígeno sin unión del enlace fosfodiéster, se genera un enlace quiral de azúcar-fosfato. El enlace entre azúcares resultante es un enlace entre azúcares Sp o un enlace entre azúcares Rp. El reemplazo de un átomo de oxígeno sin unión en el enlace fosfodiéster natural, con un átomo de azufre para obtener un enlace de fosforotioato genera un centro quiral y, en consecuencia, proporciona diastereómeros Sp y Rp. Las moléculas en donde sustancialmente todos los átomos de fósforo en la cadena principal del azúcar son Sp o Rp se denominan en el presente documento "quiralmente puras".

20

25 Los dinucleótidos cíclicos son degradados enzimáticamente por nucleasas y/o fosfodiesterasas (véase, por ejemplo: (Li *et al.*, 2014) (Diner *et al.*, 2013) (Danilchanka y Mekalanos, 2013) (Shanahan, Gaffney, Jones, y Strobel, 2013) (Simm, Morr, Kader, Nimtz, y Romling, 2004)) y, por lo tanto, cuando se usan como agentes terapéuticos, estos compuestos pueden experimentar una semivida disminuida. Los compuestos CL655 y CL656 se eligieron para permitir una semivida máxima y posiblemente mayor actividad, *in vivo*, ya que contienen enlaces internucleotídicos de fosforotioato (también conocido como "P(S)" o "tiofosfato"). El uso de dichos enlaces es una estrategia conocida para evitar la hidrólisis enzimática (véase, por ejemplo: documento US 2014/0205653 A1). Un ejemplo de un compuesto de fosforotioato que es más resistente a la hidrólisis enzimática que su análogo de fosfodiéster es (2',3')c-G^sA^sMP o (2',3')c-GAMP(S) (código de catálogo InvivoGen: tlr-scga; Li, 2014). El enlace de fosforotioato introduce un centro quiral adicional en el átomo de fósforo, que produce un par de diastereoisómeros ([Rp] y [Sp]) en cada enlace de fosforotioato. En la presente invención, se obtuvieron CL655 y CL656 y se probaron como mezclas racémicas.

30

35

Esquemas generales para preparar compuestos activos

40 Pueden confeccionarse métodos para la preparación sencilla de dinucleótidos cíclicos o profármacos de los mismos desvelados en el presente documento como se describe a continuación en detalle, o por otros métodos conocidos para los expertos en la materia. Un experto en la materia entenderá que estos esquemas no son de ningún modo limitantes y que pueden hacerse variaciones en los detalles sin alegarse del espíritu y ámbito de la presente invención.

45

La expresión "grupo protector", como se usa en el presente documento, y a menos que se indique otra cosa, se refiere a un grupo funcional químico que se une a un átomo de oxígeno, nitrógeno o fósforo para evitar una reacción adicional de dicho átomo, o para otros propósitos. Una amplia diversidad de grupos protectores para oxígeno y para nitrógeno es conocida para los expertos en la técnica de síntesis orgánica, y se describen, por ejemplo, en (Wuts, Greene, & Greene, 2014).

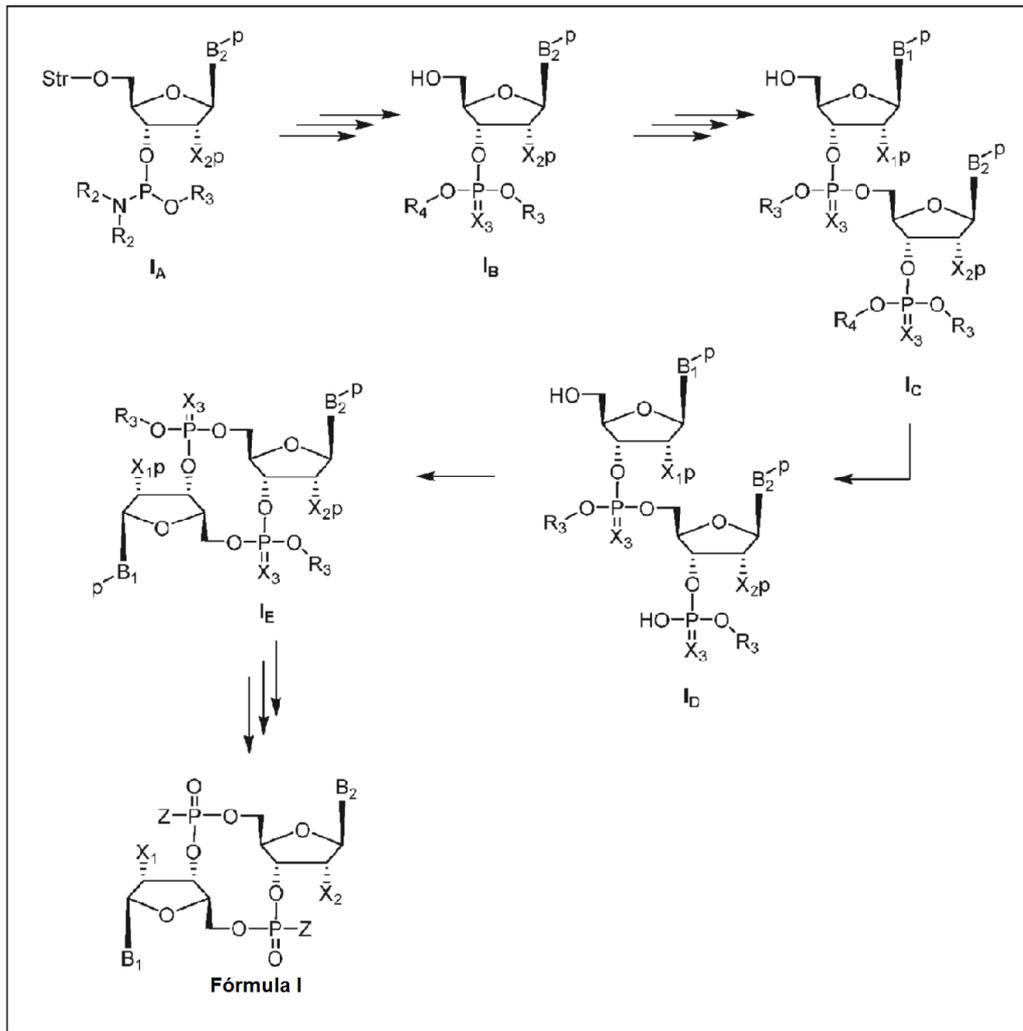
50

En general, se preparan dinucleótidos cíclicos o profármacos de los mismos de la Fórmula (I) preparando en primer lugar el nucleósido correspondiente, después preparando el grupo 5'-hidroxilo, el grupo funcional (OH) en la posición 2' o la posición 3', y después, si fuese necesario, protegiendo la amina exocíclica de la base de purina. Después, los nucleósidos protegidos adecuados se convierten en las correspondientes 3'-fosforamidita, 2'-fosforamidita, 3'-H-fosfonato o 2'-H-fosfonato, que constituyen el material de partida para la preparación de los dinucleótidos cíclicos descritos en el presente documento.

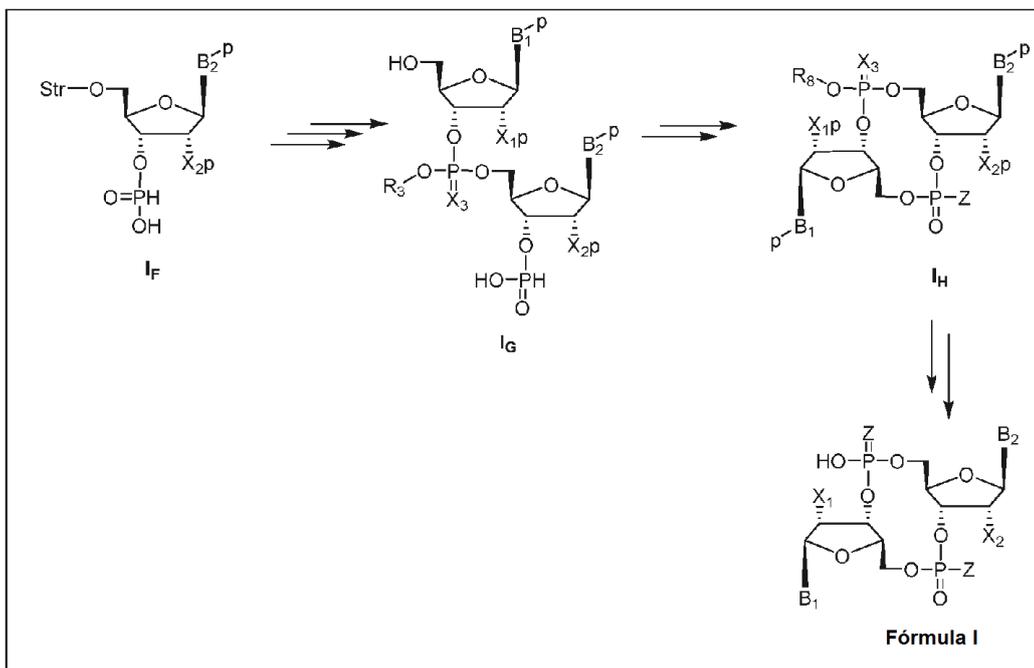
55

Los esquemas de reacción mostrados a continuación se aplican a la síntesis de DNC de Fórmula I y pueden emplearse para la síntesis de varios DNC de Fórmulas (II) y (III):

60

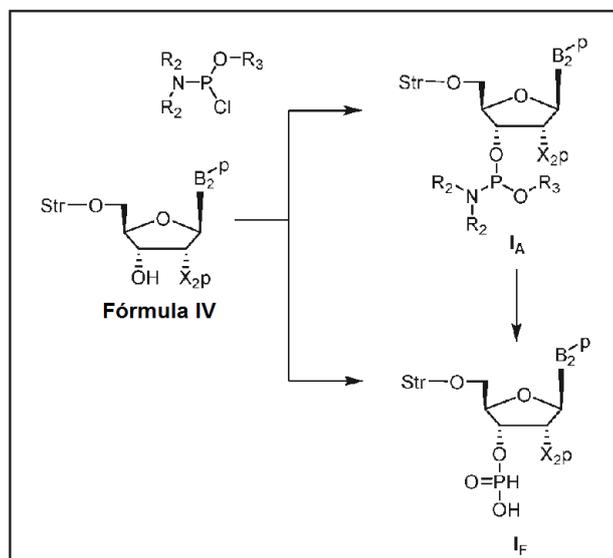


5 El **Esquema 1** es un ejemplo no limitante de la síntesis de compuestos activos de la presente invención, y en particular, un enfoque sintético para varios DNC de Fórmula (I), donde B₁, B₂, X₁, X₂ y Z se han definido anteriormente. Str es un derivado de tritilo, tal como dimetoxitritilo (DMTr), p es un grupo protector, R₂ es un grupo alquilo, tal como un grupo isopropilo, R₃ es un grupo protector, tal como cianoetilo, R₄ es un grupo protector, tal como alilo, y X₃ es O o S.



El **Esquema 2** es un ejemplo no limitante de la síntesis de compuestos activos de la presente invención, y en particular, un enfoque sintético alternativo para varios DNC de Fórmula (I), donde B₁, B₂, X₁, X₂ y Z se han definido anteriormente. Str es un derivado de tritilo, tal como dimetoxitritilo (DMTr), p es un grupo protector, R₂ es un grupo alquilo, tal como un grupo isopropilo, R₄ es un grupo protector, tal como cianoetilo, R₅ es un grupo protector, tal como alilo, y X₃ es O o S.

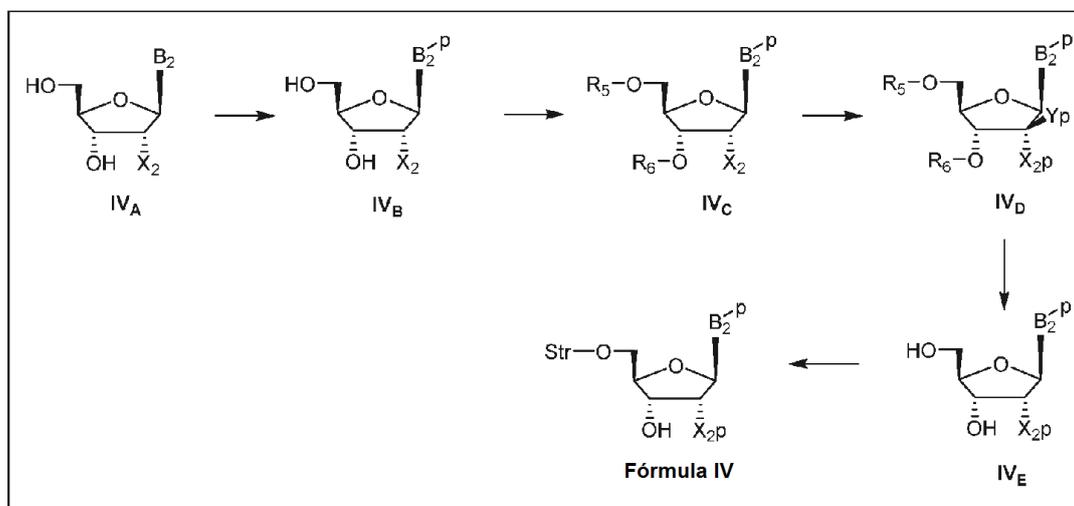
Se preparan DNC de Fórmulas (I) y (II) preparando en primer lugar fosforamidita adecuadamente protegida de Fórmula (IA) o H-fosfonato de Fórmula (IF):



El **Esquema 3** es un ejemplo no limitante de la síntesis de fosforamiditas de Fórmula (IA) y de H-fosfonatos de Fórmula (IF), donde B₂, Yp, Xp, R₇, R₈ y Str se han definido anteriormente.

Pueden sintetizarse fosforamiditas de la Fórmula (IA) y H-fosfonatos de la Fórmula (IF) preparando en primer lugar los nucleósidos adecuadamente protegidos de la Fórmula (IV), lo que puede realizarse por alguien con una habilidad habitual en la técnica. En primer lugar, la base, que tiene una amina exocíclica, se protege, y después los grupos 3'-y 5'-hidroxilo se protegen simultánea o selectivamente. Las sustituciones X₂ se protegen finalmente, usando grupos protectores, tales como TBDMS o tetrahidropirano (Thp) cuando X₂ es hidroxilo. Finalmente, los grupos protectores en los hidroxilos 3' y 5' se escinden, y a continuación el grupo 5'-hidroxilo se protege con un derivado de tritilo para

dar el nucleósido de la Fórmula (IV):



- 5 El **Esquema 4** es un ejemplo no limitante de la síntesis de nucleósido adecuadamente protegido de Fórmula (IV), donde B₂, X₂, p y Str se han definido anteriormente. R₅ y R₆ son grupos protectores.

Pueden prepararse nucleósidos de la Fórmula (IV_A) por métodos indicados en: (Chu, 2002; Rajagopalan, 2003; Schinazi, 2004; Vorbrüggen, 2001).

10

Descripción de las figuras

- 15 **FIGURA 1.** Señalización de STING en la célula. La activación de STING por dinucleótidos cíclicos (CDN) conduce a la activación de las rutas de IRF3 y NF-κB y, en consecuencia, a la inducción de interferones de tipo I y de citocinas proinflamatorias, respectivamente.

FIGURA 2. Actividad de inducción de interferón de tipo I *in vitro* en cultivos celulares THP1-Dual™: dinucleótidos cíclicos no fluorados frente a fluorados.

- 20 **FIGURA 3.** Inducción de la vía NF-κB *in vitro* en cultivos celulares THP1-Dual™: dinucleótidos cíclicos no fluorados frente a fluorados.

- 25 **FIGURA 4.** Actividad de inducción de interferón de tipo I *in vitro* en células B16 de tipo silvestre frente a con inactivación de STING. Muestra la actividad relativa de ISG54 (como una medida indirecta de la inducción de interferón de tipo I) de dinucleótidos cíclicos no fluorados frente a fluorados incubados en cultivos de células B16 de tipo silvestre (lado izquierdo del gráfico) o con inactivación de STING (lado derecho del gráfico) durante 24 h. TS: tipo silvestre; SKO: inactivación de STING (homocigoto).

- 30 **FIGURA 5.** Actividad de inducción de interferón de tipo I *in vitro* en células RAW de tipo silvestre frente a con inactivación de STING. Muestra la actividad relativa de ISG54 (como una medida indirecta de la inducción de interferón de tipo I) de dinucleótidos cíclicos no fluorados frente a fluorados incubados en cultivos de células RAW de tipo silvestre (lado izquierdo del gráfico) o con inactivación de STING (lado derecho del gráfico) durante 24 h. TS: tipo silvestre; SKO: inactivación de STING (homocigoto).

- 35 **FIGURA 6.** Actividad de inducción de interferón de tipo I de dinucleótidos cíclicos en ratones. Medición de la inducción de interferón de tipo I en sueros de ratones a las 4 h después del tratamiento.

FIGURA 7. Actividad de inducción de IL-6 de dinucleótidos cíclicos en ratones. Medición de la inducción de IL-6 en sueros de ratones a las 4 h después del tratamiento.

40

FIGURA 8. Eliminación *in vivo* de dinucleótidos cíclicos en ratones. Cambio temporal en la concentración en plasma de dinucleótidos cíclicos en ratones tratados.

FIGURA 9. Actividad de inducción de citocinas de CDN en sangre entera humana.

45

FIGURAS 10 A-D. Resistencia de distintos CDN a la escisión por las enzimas SVPD y NP1 a lo largo del tiempo, supervisada por HPLC. Compárese CL614 y CL656 con c-AIMP, para resistencia a SVPD (A) o NP1 (B).

Compárese CL603 y CL656 con c-GAMP, para resistencia a SVPD (C) o NP1 (D).

FIGURA 11. Actividad *in vitro* de distintos CDN en células THP-1 Dual™ antes y después de incubación con las enzimas SVPD y NP1.

5

La invención se ilustrará por los siguientes ejemplos no limitantes.

Descripción detallada de la invención

10 Ejemplos

Los compuestos específicos que son representativos de esta invención se prepararon como para los siguientes ejemplos y se ofrecen a modo de ilustración para ayudar en la comprensión de la invención. No debe interpretarse que estos limitan de ningún modo la invención expuesta en la reivindicaciones que les siguen posteriormente. Cualquier compuesto que se encuentre fuera del ámbito de las reivindicaciones está destinado únicamente a fines ilustrativos así como comparativos. Los presentes compuestos también pueden utilizarse como intermedios en ejemplos posteriores para producir compuestos de la presente invención adicionales. No se ha intentado necesariamente optimizar los rendimientos obtenidos en cualquiera de las reacciones. Un experto en la materia sabría cómo aumentar tales rendimientos a través de variaciones rutinarias en los tiempos de reacción, temperaturas, disolventes, reactivos y otros parámetros de síntesis químicas.

20

La presente invención se ilustra adicionalmente en el Ejemplo 1, que muestra métodos preparativos para sintetizar varios DNC, y en el Ejemplo 2, que muestra métodos para la evaluación biológica de estos DNC. Alguien con una habilidad habitual en la técnica entenderá que estos ejemplos no son de ningún modo limitantes y que pueden hacerse variaciones en los detalles sin alejarse del ámbito de la presente invención.

25

Los términos utilizados para describir la invención se usan comúnmente y son conocidos para los expertos en la materia. Como se usa en el presente documento, las siguientes abreviaturas tienen los significados indicados:

30

°C para grados Celsius; A para adenosina; ACN para acetonitrilo; ac. para acuoso; CDCl₃ para cloroformo deuterado; C₁₈ para sílice enlazado a cadena de carbono de octadecilo; d para doblete; dA para desoxiadenosina; dd para doblete de dobletes; dl para desoxiinosina; D₂O para óxido de deuterio; DCA para ácido dicloroacético; DCM para diclorometano; DMSO-d₆ para dimetilsulfóxido deuterado; DMTrCl para cloruro de 4;4'-dimetoxitritilo; equiv. para equivalente; EN para ionización por electronebulización; Et₂O para éter dietílico; EtOAc para acetato de etilo; EtOH para etanol; Et₃N·3HF para trifluorhidrato de trietilamina; g para gramos; ¹H para protón; h para horas; Hz para hercios; HPLC para cromatografía líquida de alto rendimiento; I para inosina; IFN para interferón; IFN-α para interferón alfa; IFN-β para interferón beta; iPrOH para isopropanol; IRF3 para factor 3 regulador de interferón; ISG (o ISG54) para genes estimulados por interferón; ISRE para elemento de respuesta estimulado por interferón; i.v. para intravenoso; CL para cromatografía líquida; m para multiplete; M para molar; m/z para relación masa a carga; MeOH para metanol; mg para miligramos; MgSO₄ para sulfato de magnesio; MHz para megahercio; min para minutos; ml para mililitros; mmol para milimoles; mol/l para mol/litro; EM para espectrometría de masas; NaHCO₃ para bicarbonato sódico; NaHSO₃ para tiosulfato sódico; NH₄OH para hidróxido de amonio; NF-κB para factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; RMN para resonancia magnética nuclear; PADS para disulfuro de fenilacetilo; ppm para partes por millón; PPTS para p-toluenosulfonato de piridinio; ta para temperatura ambiente; SEAP para fosfatasa alcalina embrionaria secretada; s para singlete; sa para singlete amplio; t para triplete; SKO para homocigotos con el gen de STING desactivado; STING para estimulador de genes de interferón; TBAF para fluoruro de tetra-n-butilamonio; THF para tetrahidrofurano; TBDMSCl para cloruro de terbutildimetilsililo; TEAA para acetato de trietilamonio; TFA para ácido trifluoroacético; TIPSCI2 para 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano; TS para tipo silvestre; µg para microgramo; µl para microlitro; µm para micrómetro; δ para desplazamiento químico.

50

Se adquirieron disolventes anhidros y reactivos adecuados para la síntesis de nucleósidos y nucleótidos y se manipularon en una atmósfera seca de argón o nitrógeno usando una técnica anhidra. Se realizaron ciclaciones y reacciones de acoplamiento de amidita en piridina o acetonitrilo anhidro en una atmósfera seca de argón o nitrógeno. Los materiales de partida para todas las reacciones en piridina seca se secaron mediante concentración (tres veces) a partir de piridina. Se realizó cromatografía ultrarrápida preparativa de gel de sílice usando sílice de alto grado de pureza Fluka 60 Å o Merck Grade 9385 usando gradientes de metanol en diclorometano. Se realizó EM analítica de CL/EN en un sistema Agilent 1290 Infinity UHPLC acoplado a un detector de matriz de diodos (DAD) Agilent 1260 Infinity y un espectrómetro de masas Agilent 6130 Quadrupole equipado con una fuente de ionización por electronebulización (IEN) y controlado por el software Chemstation. El sistema de CL se equipó con una columna Aquity CSH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm, usando gradientes de formiato de amonio 10 mM y acetonitrilo a un flujo de 300 µl/min. La longitud de onda de detección UV fue 254 nm. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modos de IEN positivo y negativo. La HPLC preparativa se realizó en un sistema preparativo Waters 150Q HPLC controlando a 254 nm en una columna SunFire Prep C18, 5 µm OBD 30 x 150 mm, usando gradientes de formiato de amonio 10 mM y acetonitrilo a un caudal de 60 ml/min. Los espectros de RMN ¹H se adquirieron en un Bruker 300 MHz (Fourier 300) a temperatura ambiente y se indican en ppm campo abajo. Se emplearon tamicos moleculares (TM) 3Å después de secar el producto suministrado comercialmente a 250 °C durante 12 h al vacío. Las

65

fosforamiditas de nucleosido comerciales fueron suministradas por Chemgenes.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no están destinados de ningún modo a limitar el ámbito de la invención. Cualquier compuesto que se encuentre fuera del ámbito de las reivindicaciones está destinado únicamente a fines ilustrativos así como comparativos.

Ejemplo 1: síntesis de los compuestos de la invención, ejemplo 1.a: protocolo general para la preparación de fosfotriéster:

10 La fosforamidita adecuadamente protegida o fosforamidita disponible en el mercado se coevaporó tres veces con ACN seco, y el sólido resultante se disolvió en una solución de Activator42® (0,1 mol/l, 2 equiv.) en presencia de tamices moleculares 3Å. A la solución se añadió alcohol (2 equiv.) y la mezcla resultante se agitó durante 30 min.

Para engarce de fosfotriéster:

15 Se añadió hidroperóxido de *tert*-butilo en decano (5,5 M, 2 equiv.) a la mezcla, que se agitó durante 40 min. La solución se filtró y los tamices moleculares se lavaron con DCM. El filtrado se concentró al vacío.

Para engarce de triéster fosforotioato:

20 La mezcla se concentró al vacío y el residuo se disolvió en una solución 0,2 M de PADS (2,5 equiv.) en piridina seca. La mezcla se agitó a ta durante 45 min. La solución se filtró y los tamices moleculares se lavaron con DCM. El filtrado se concentró al vacío y se coevaporó tres veces con ACN.

25 El residuo se trató con una solución de DCA/DCM (3 %) en presencia de agua (10 equiv.) durante 15 min. La reacción se interrumpió con la adición de MeOH y piridina. Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a [M-H]⁻ y/o [M+H]⁺.

30 Ejemplo 1.B: Protocolo general para la preparación de H-fosfonato:

La fosforamidita adecuadamente protegida o fosforamidita comercial se disolvió en una solución de ACN. A la solución se añadieron agua (2 equiv.) y TFA de piridinio (1,2 equiv.) y la mezcla se agitó durante 15 min. Después, los disolventes se retiraron al vacío. El residuo se trató con una solución de DCA/DCM (3 %) en presencia de agua (10 equiv.) durante 15 min. La reacción se interrumpió con la adición de MeOH y piridina. Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a [M-H]⁻ y/o [M+H]⁺.

40 Ejemplo 1.C: Protocolo par a la síntesis de dinucleótido:

A una solución del compuesto del Ejemplo 1.A o un compuesto adecuadamente protegido en una solución de Activator42® (0,1 mol/l, 2 equiv.) en presencia de tamices moleculares 3Å se añadió en una porción una fosforamidita adecuadamente protegida o fosforamidita comercial. La mezcla se agitó durante 30 min.

45 Para engarce de fosfotriéster:

Se añadió hidroperóxido de *tert*-butilo en decano (5,5 M, 2 equiv.) a la mezcla, que se agitó durante 40 min. La solución se filtró y los tamices moleculares se lavaron con DCM. El filtrado se concentró al vacío.

50 Para engarce de triéster fosforotioato:

La mezcla se concentró al vacío y el residuo se disolvió en una solución 0,2 M de PADS (2,5 equiv.) en piridina seca. La mezcla se agitó a ta durante 45 min. La solución se filtró y los tamices moleculares se lavaron con DCM. El filtrado se concentró al vacío y se coevaporó tres veces con ACN.

55 El residuo se trató con una solución de DCA/DCM (3 %) en presencia de agua (10 equiv.) durante 15 min. La reacción se interrumpió mediante la adición de MeOH y piridina. Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a [M-H]⁻ y/o [M+H]⁺.

60 Ejemplo 1.D: Protocolo alternativo para la síntesis de dinucleótido:

A una solución del compuesto del Ejemplo 1.B en una solución de Activator42® (0,1 mol/l, 2 equiv.) en presencia de tamices moleculares 3Å se añadió en una porción una fosforamidita adecuadamente protegida o fosforamidita comercial. La mezcla se agitó durante 30 min.

Para engarce de fosfotriéster:

Se añadió hidroperóxido de *tert*-butilo en decano (5,5 M, 2 equiv.) a la mezcla, que se agitó durante 40 min. La solución se filtró y los tamices moleculares se lavaron con DCM. El filtrado se concentró al vacío.

5

Para engarce de triéster fosforotioato:

La mezcla se concentró al vacío y el residuo se disolvió en una solución 0,2 M de PADS (2,5 equiv.) en piridina seca. La mezcla se agitó a ta durante 45 min. La solución se filtró y los tamices moleculares se lavaron con DCM. El filtrado se concentró al vacío y se coevaporó tres veces con ACN.

10

El residuo se trató con una solución de DCA/DCM (3 %) en presencia de agua (10 equiv.) durante 15 min. La reacción se interrumpió con la adición de MeOH y piridina. Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

15

Ejemplo 1.E: Protocolo para retirar grupo alilo:

A una solución de dinucleótido del Ejemplo 1.C en acetona se añadió yoduro sódico (10 equiv.), y la suspensión resultante se agitó a la temperatura de reflujo durante 2 h. El precipitado incoloro resultante se recogió por filtración y se lavó con acetona enfriada. Este precipitado es altamente higroscópico y, por tanto, se usó inmediatamente en el siguiente procedimiento. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

20

Ejemplo 1.F: Protocolo alternativo para retirar grupo alilo:

A una solución del dinucleótido del Ejemplo 1.C en THF seco se añadió N-metilnilina (3 equiv.) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,2 equiv.). La suspensión resultante se agitó a ta durante 15 min. Después, el disolvente se retiró al vacío y el residuo se trituró con éter dietílico. El precipitado incoloro resultante se recogió por filtración y se lavó con éter dietílico enfriado. El precipitado se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

30

Ejemplo 1.G: Protocolo para la ciclación del dinucleótido:

El sólido obtenido en el Ejemplo 1.E o 1.F se coevaporó tres veces con piridina seca y después, ACN seco. El residuo se suspendió en THF y a la mezcla heterogénea resultante se añadieron sucesivamente N-metilimidazol (10 equiv.) y cloruro de 2,4,6-triisopropilbencenosulfonilo (10 equiv.). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 h a 36 h. Después, el disolvente se retiró al vacío y el residuo se trituró con EtOAc. El precipitado incoloro resultante se recogió por filtración y se lavó con EtOAc enfriado. Este precipitado se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

35

40

Ejemplo 1.H: Protocolo alternativo para la ciclación del dinucleótido:

El sólido obtenido del Ejemplo 1.E o 1.F se coevaporó tres veces con piridina seca. El residuo se suspendió en piridina seca y a la solución resultante se le añadió 1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) (5 equiv.). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 h a 18 h. Después, el disolvente se retiró al vacío, y el producto resultante se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

45

50

Ejemplo 1.1: Protocolo alternativo para la ciclación del dinucleótido:

El sólido obtenido en el Ejemplo 1.D un compuesto adecuadamente protegido se coevaporó tres veces con piridina seca. El residuo se suspendió en piridina seca y a la solución resultante se le añadió 5,5-dimetil-2-oxo-2-cloro-1,3,2-dioxafosfinano (DMOCP) (3 equiv.). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 h a 18 h.

55

Para engarce de fosfodiéster:

Se añadieron yodo (1,3 equiv.) y agua (30 equiv.) a la mezcla. Después de 10 min, se añadió NaHSO₃ ac. (0,15 %) hasta que se observó una decoloración completa, y después se añadió NaHCO₃ ac. La capa acuosa se extrajo tres veces con una mezcla 1:1 (v/v) de EtOAc/Et₂O. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y después se concentraron al vacío.

60

Para engarce de triéster fosforotioato:

65

Se añadió azufre elemental (5 equiv.). La mezcla se agitó a ta durante 45 min. Después, la mezcla se concentró al vacío y se coevaporó tres veces con tolueno, se precipitó en ACN para retirar el exceso de azufre y se concentró a sequedad.

- 5 El residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

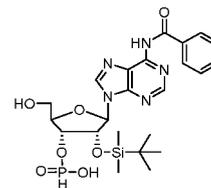
Ejemplo 1.J: Protocolo para la desprotección y purificación de dinucleótidos cíclicos:

- 10 El dinucleótido cíclico protegido del Ejemplo 1.G, 1.H o 1.I se trató con una solución de metilamina en EtOH (33 %), y la mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se secó al vacío. El material secado se mezcló con $Et_3N \cdot 3HF$ (25 equiv.) y se agitó a 25 °C durante 6 h. A esta mezcla se añadió una solución tampón 1 M de formiato amónico y la mezcla se agitó vigorosamente a entre 30 °C y 40 °C durante 10 min. El precipitado resultante se filtró y el filtrado se sometió a HPLC preparativa usando una columna C_{18} Sunfire (19 x 150 mm, 5 μm) y formiato amónico/ACN como eluyente. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se combinaron y se liofilizaron. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

Ejemplo 1.K: Protocolo para la desprotección y purificación de dinucleótidos cíclicos:

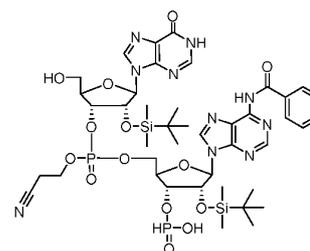
- 20 El dinucleótido cíclico protegido del Ejemplo 1.G, 1.H o 1.I se trató con una solución de metilamina en EtOH (33 %) y la mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se sometió a HPLC preparativa usando una columna C_{18} Sunfire (19 x 150 mm, 5 μm) y formiato amónico/ACN como eluyente. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se combinaron y se liofilizaron. La estructura del compuesto se confirmó por análisis de CL-EN/EM con iones a $[M-H]^-$ y/o $[M+H]^+$.

Intermedio 1: 2'-O(TBDMS)-3'-O(H-fosfonato)-N⁶(Bz)adenosina



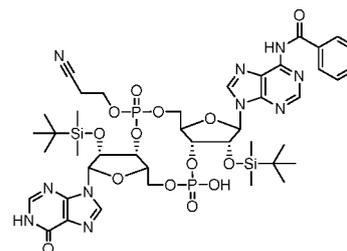
- 30 El intermedio 1 se preparó a partir del fosforamidita de adenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.B para proporcionar 6,20 g (rendimiento del 93 %) del intermedio 1. CL-EM: Tr = 4,41 min, m/z = 550 $[M+H]^+$, m/z = 548 $[M-H]^-$.

Intermedio 2: [2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosfotriéster-inosina]-(3', 5')-[2'-O(TBDMS)-3'-O(H-fosfonato)-N⁶(Bz)adenosina]



- 35 El intermedio 2 se preparó a partir del intermedio 1 y la fosforamidita de inosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.D para proporcionar 8,04 g (rendimiento del 68 %) del intermedio 2. CL-EM: Tr = 5,22 min, m/z = 1048 $[M+H]^+$, m/z = 1046 $[M-H]^-$.

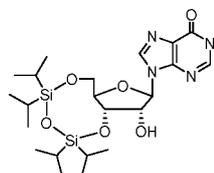
Intermedio 3: (3',3')cíclico-[2'-O(TBDMS)-3'-O(fosfodiéster)-N⁶(Bz)adenosina]-[2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosfotriéster-inosina]



El intermedio 3 se preparó a partir del intermedio 2 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.1 para proporcionar 8,04 g (rendimiento del 68 %) del intermedio 3. CL-EM: Tr = 5,41 min, m/z = 1046 [M+H]⁺, m/z = 1044 [M-H]⁻.

5

Intermedio 4: (5',3')-O(TIPS)inosina

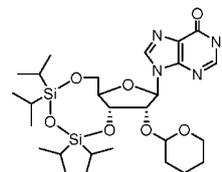


A una solución de inosina (10,0 g, 37,2 mmol) en piridina seca (200 ml) se añadió TIPSCl₂ (14,1 g, 44,7 mmol). La solución se agitó durante 18 h a ta. Después, la reacción se interrumpió mediante la adición de MeOH (50 ml) y los disolventes se retiraron al vacío. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con NaHCO₃ ac. saturado, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y después se concentró al vacío. El compuesto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente, para dar 13,5 g (rendimiento del 70 %) del intermedio 4. CL-EM: Tr = 5,32 min, m/z = 511 [M+H]⁺, m/z = 509 [M-H]⁻. RMN ¹H (CDCl₃-d₇, 300 MHz) δ (ppm) 13,04 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 5,99 (s, 1H), 4,93 (t, 1H), 4,50 (d, 1H), 4,11 (m, 3H), 1,83 (m, 4H), 1,09 (m, 32H).

10

15

Intermedio 5: (5',3')-O(TIPS)-2'-O(Thp)inosina

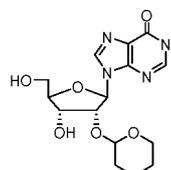


A una solución del intermedio 4 (5 g, 9,79 mmol) en DCM seco (75 ml) se añadieron 3,4-dihidro-2H-pirano (24,7 g, 293,7 mmol) y PPTS (7,38 g, 29,37 mmol). La solución se agitó durante 18 h a ta. Después, la reacción se interrumpió con una solución saturada de NaHCO₃. Las diferentes capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y después se concentró al vacío. El compuesto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente, para dar 4,71 g (rendimiento del 80 %) del intermedio 5. CL-EM: Tr = 6,72 min, m/z = 595 [M+H]⁺, m/z = 593 [M-H]⁻. RMN ¹H (CDCl₃-d₇, 300 MHz) δ (ppm) 12,89 (d, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 8,04 (d, 1H), 6,05 (d, 1H), 5,07 (t, 1H), 4,76 (m, 1H), 4,53 (m, 2H), 4,40-4,05 (m, 5H), 1,85-1,55 (m, 10H), 1,04 (m, 32H).

20

25

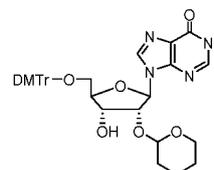
Intermedio 6: 2'-O(Thp)inosina



A una solución del intermedio 5 (4,71 g, 7,92 mmol) en THF (100 ml) se añadió TBAF sobre gel de sílice (10,56 g, 15,84 mmol). La solución se agitó durante 3 h a ta. Después, la reacción se filtró, el gel de sílice se lavó con THF y el filtrado se concentró al vacío. El compuesto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice,

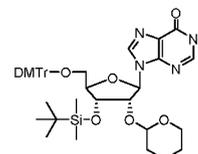
usando DCM/MeOH como eluyente, para dar 2,7 g (rendimiento del 96 %) del intermedio 6. CL-EM: Tr = 4,32 min, m/z = 353 [M+H]⁺, m/z = 351 [M-H]⁻.

Intermedio 7: 5'-O(DMTr)-2'-O(Thp) inosina



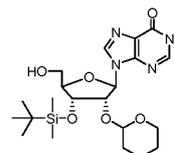
- 5 A una solución del intermedio 6 (2,70 g, 7,66 mmol) en piridina seca (40 ml) se añadió gota a gota una solución de DMTrCl (2,17 g, 6,42 mmol) en DCM (5 ml). La solución estuvo a ta durante 2 h. Después, la reacción se interrumpió mediante la adición de NaHCO₃ ac. al 5 % (110 ml), la capa acuosa se extrajo tres veces con DCM. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y después se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando piridina al 1 % en DCM/MeOH como eluyente, para dar 4,78 g (rendimiento del 95 %) del intermedio 7. CL-EM: Tr = 6,80 min, m/z = 655 [M+H]⁺, m/z = 653 [M-H]⁻. RMN ¹H (CDCl₃-d₁, 300 MHz) δ (ppm) 12,80 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,73 (m, 2H), 7,24 (m, 9H), 6,20 (d, 1H), 5,07 (t, 1H), 4,83 (m, 1H), 4,35 (m, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,45-3,30 (m, 4H), 1,77-1,56 (m, 6H).

Intermedio 8: 5'-O(DMTr)-3'-O(TBDMS)-2'-O(Thp)inosina



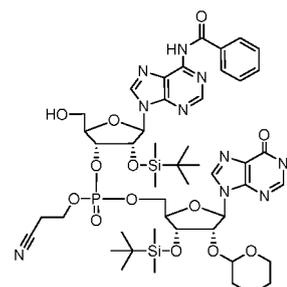
- 15 A una solución del intermedio 7 (4,78 g, 7,30 mmol) en piridina seca (40 ml) se añadieron imidazol (1,29 g, 18,98 mmol) y TBDMSCl (1,43 g, 9,49 mmol), la reacción se agitó durante 18 h a ta. Después, la reacción se diluyó con DCM (100 ml), la solución se lavó con NaHCO₃ ac. saturado, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y después se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando piridina al 1 % en DCM/MeOH como eluyente, para dar 5,12 g (rendimiento del 91 %) del intermedio 8. CL-EM: Tr = 8,15 min, m/z = 769 [M+H]⁺, m/z = 767 [M-H]⁻. RMN ¹H (CDCl₃-d₁, 300 MHz) δ (ppm) 12,70 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,40 (m, 2H), 7,26 (m, 11H), 6,09 (d, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,16 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,45-3,26 (m, 4H), 1,61-1,37 (m, 8H), 0,81 (s, 9H), 0,09 (dd, 6H).

Intermedio 9: 3'-O(TBDMS)-2'-O(Thp)inosina



- 25 El intermedio 8 (4,93 g, 6,41 mmol) se disolvió en una solución de ZnBr₂ (0,5 M) en DCM/iPrOH (1/1) (40 ml, 19,3 mmol). La solución se agitó durante 40 min a ta. La reacción se neutralizó con una solución 1 N de NaHCO₃. Las diferentes capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y después se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, usando DCM/MeOH como eluyente para dar 2,68 g (rendimiento del 90 %) del intermedio 9. CL-EM: Tr = 6,22 min, m/z = 467 [M+H]⁺, m/z = 465 [M-H]⁻.

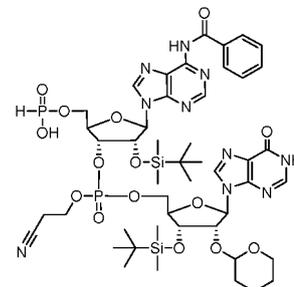
Intermedio 10: [2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)adenosina]-(3',5')-[3'-O(TBDMS)-2'-O(Thp)inosina]



El intermedio 10 se preparó a partir del intermedio 9 y la fosforamidita de adenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para dar 1,9 g (rendimiento del 64 %) del intermedio 10. Tr = 6,99 min, m/z = 1068 [M+H]⁺, m/z = 1066 [M-H]⁻.

5

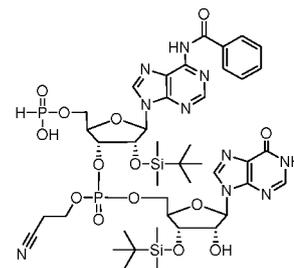
Intermedio 11: [5'-O(H-fosfonato)-2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)adenosina]-(3',5')-[3'-O(TBDMS)-2'-O(Thp)inosina]



A una solución del intermedio 10 (1,9 g, 1,78 mmol) en piridina seca (20 ml) se añadió difenilfosfito (1,25 g, 5,34 mmol). La reacción se agitó durante 2 h a ta. A la reacción se añadió una solución de TEAA 0,1 M (53 ml, 5,34 mmol). La reacción se agitó durante 45 min a ta. Después, los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se disolvió en DCM (100 ml). La capa orgánica se lavó con una solución ac. de NaHCO₃ (5 %), agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y después se concentró al vacío para dar 2,0 g (rendimiento del 99 %) del intermedio 11 en bruto. Este intermedio se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM: Tr = 6,06 min, m/z = 1132 [M+H]⁺, m/z = 1130 [M-H]⁻.

10

Intermedio 12: [5'-O(H-fosfonato)-2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)adenosina]-(3',5')-[3'-O(TBDMS)inosina]

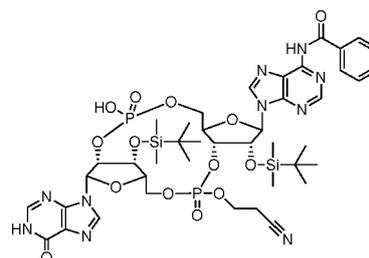


15

El intermedio 11 (2,0 g, 2,12 mmol) se trató con una solución de DCA al 10 % en DCM (50 ml). La reacción se agitó durante 2 h a ta. Después, la reacción se neutralizó mediante la adición de piridina (17 ml). Los disolventes se retiraron al vacío para dar 2,2 g (rendimiento del 100 %) del intermedio 12 en bruto. Este intermedio se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM: Tr = 7,38 min, m/z = 1048 [M+H]⁺, m/z = 1046 [M-H]⁻.

20

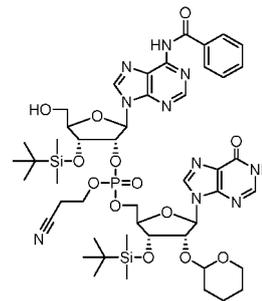
Intermedio 13: (3',2')Cíclico-[2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)adenosina]-[2'-O(fosfodiéster)-3'-O(TBDMS)inosina]



El intermedio 13 se preparó a partir del intermedio 12 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.1 para proporcionar 1,73 g (rendimiento del 83 %) del intermedio 13. CL-EM: Tr = 7,20 min, m/z = 1046 [M+H]⁺, m/z = 1044 [M-H]⁻.

25

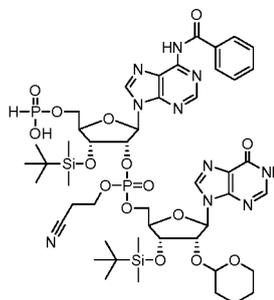
Intermedio 14: [3'-O(TBDMS)-2'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)adenosina]-
(3',5')-[3'-O(TBDMS)-2'-O(Thp)inosina]



El intermedio 14 se preparó a partir del intermedio 9 y la fosforamidita de adenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 1,9 g (rendimiento del 60 %) del intermedio 14. Tr = 7,08 min, m/z = 1068 [M+H]⁺, m/z = 1066 [M-H]⁻.

5

Intermedio 15: [5'-O(H-fosfonato)-3'-O(TBDMS)-2'-O(CE)fosfotriéster-
N⁶(Bz)adenosina]-(3',5')-[3'-O(TBDMS)-2'-
O(Thp)inosina]



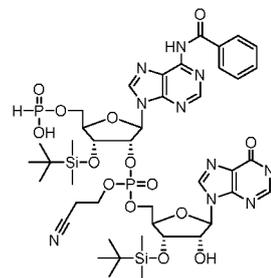
A una solución del intermedio 14 (1,9 g, 1,78 mmol) en piridina seca (20 ml) se añadió difenilfosfito (1,25 g, 5,34 mmol). La reacción se agitó a ta durante 2 h. A la reacción se añadió una solución de TEAA 0,1 M (53 ml, 5,34 mmol).

10

La reacción se agitó durante 45 min a ta. Después, los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se disolvió en DCM (100 ml). La capa orgánica se lavó con una solución ac. de NaHCO₃ (5 %), agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y después se concentró al vacío para dar 2,0 g (rendimiento del 99 %) del intermedio 15 en bruto. Este intermedio se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM: Tr = 6,11 min, m/z = 1132 [M+H]⁺, m/z = 1130 [M-H]⁻.

15

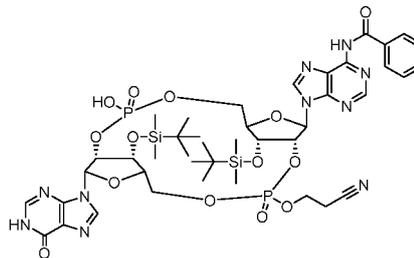
Intermedio 16: [5'-O(H-fosfonato)-2'-O(TBDMS)-3'-
O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)adenosina]-(3',5')-[3'-
O(TBDMS)inosina]



El intermedio 15 (2,0 g, 1,76 mmol) se trató con una solución de DCA al 10 % en DCM (50 ml, 85,0 mmol). La reacción se agitó a ta durante 2 h. Después, la reacción se neutralizó mediante la adición de piridina (17 ml, 177,0 mmol). Los disolventes se retiraron al vacío para dar 1,8 g (rendimiento del 100 %) del intermedio 16 en bruto. Este intermedio se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM: Tr = 5,39 min, m/z = 1048 [M+H]⁺, m/z = 1046 [M-H]⁻.

20

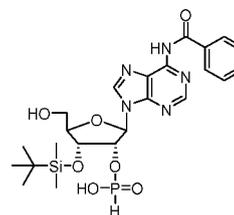
Intermedio 17: (2',2')Cíclico-[3'-O(TBDMS)-2'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)adenosina]-[2'-O(fosfodiéster)-3'-O(TBDMS)inosina]



El intermedio 17 se preparó a partir del intermedio 16 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.1 para proporcionar 1,5 g (rendimiento del 75 %) del intermedio 17. CL-EM: Tr = 5,41 min, m/z = 1046 [M+H]⁺, m/z = 1044 [M-H]⁻.

5

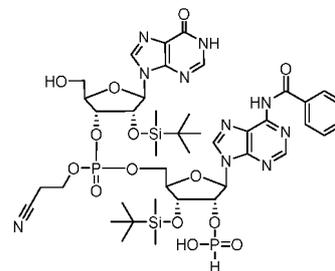
Intermedio 18: 3'-O(TBDMS)-2'-O(H-fosfonato)-N⁶(Bz)adenosina



El intermedio 18 se preparó a partir del fosforamidita de adenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.B para proporcionar 1,1 g (rendimiento del 94 %) del intermedio 18. CL-EM: Tr = 4,47 min, m/z = 550 [M+H]⁺, m/z = 548 [M-H]⁻.

10

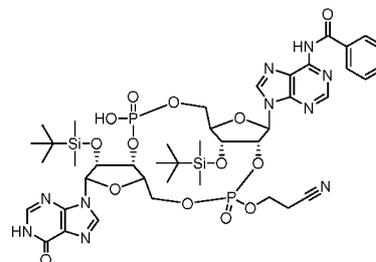
Intermedio 19: [2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosfotriéster-inosina]-[(3',5')-3'-O(TBDMS)-2'-O(H-fosfonato)-N⁶(Bz)adenosina]



El intermedio 19 se preparó a partir del intermedio 18 y fosforamidita de inosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.D para proporcionar 410 mg (rendimiento del 44 %) del intermedio 19. Tr = 4,70 min, m/z = 1048 [M+H]⁺, m/z = 1046 [M-H]⁻.

15

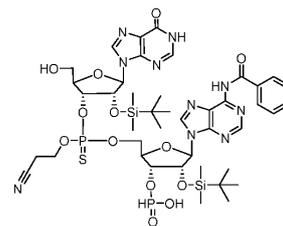
Intermedio 20: (2',3')cíclico-[3'-O(TBDMS)-2'-O(fosfodiéster)-N⁶(Bz)adenosina]-[2'-O(TBDMS)-3'-O(fosfodiéster)-inosina]



El intermedio 20 se preparó a partir del intermedio 19 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.1 para proporcionar 364 mg (rendimiento del 89 %) del intermedio 20. CL-EM: Tr = 5,66 min, m/z = 1046 [M+H]⁺, m/z = 1044 [M-H]⁻.

20

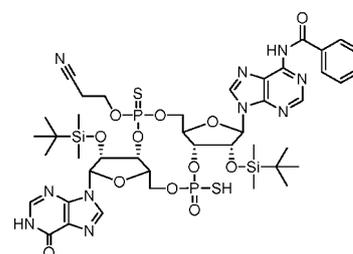
Intermedio 21: [2'-O(TBDMS)-3'-O(CE)fosforotioato-triéster-
inosina]-(3',5')-[2'-O(TBDMS)-3'-O(H-fosfonato)-
N⁶(Bz)adenosina]



El intermedio 21 se preparó a partir del intermedio 1 y la fosforamidita de inosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.D para proporcionar 1,05 g (rendimiento del 65 %) del intermedio 21. CL-EM: Tr = 5,42 y 5,52 min, m/z = 1064 [M+H]⁺, m/z = 1062 [M-H]⁻.

5

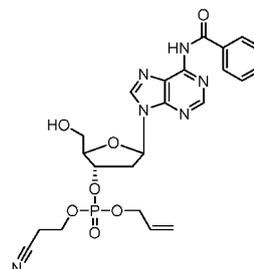
Intermedio 22: (3',3')Cíclico-[2'-O(TBDMS)-3'-O(fosforotioato-
diéster)-N⁶(Bz)adenosina]-[2'-O(TBDMS)-3'-
O(CE)fosforotioato-triéster-inosina]



El intermedio 22 se preparó a partir del intermedio 21 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.1 para proporcionar 579 mg (rendimiento del 55 %) del intermedio 22. CL-EM: Tr = 5,61 y 5,71 min, m/z = 1078 [M+H]⁺, m/z = 1076 [M-H]⁻.

10

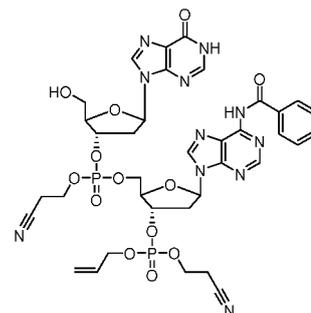
Intermedio 23: 3'-O[(Alilo,CE)fosfotriéster]-N⁶(Bz)-2'-desoxiadenosina



El intermedio 23 se preparó a partir de la fosforamidita de 2'-desoxiadenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.A para proporcionar 1,84 g (rendimiento del 95 %) del intermedio 23. CL-EM: Tr = 4,31 min, m/z = 529 [M+H]⁺, m/z = 527 [M-H]⁻.

15

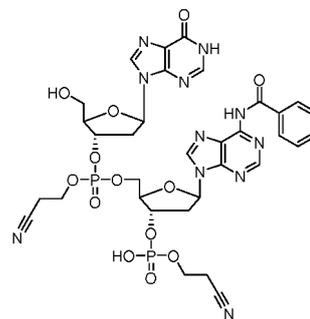
Intermedio 24: [3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxilosina]-(3',5')-[3'-
O(Alilo,CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)-2'-desoxiadenosina]



El intermedio 24 se preparó a partir del intermedio 23 y fosforamidita de 2'-desoxiinosina disponible en el mercado

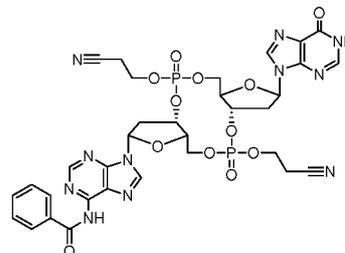
usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 500 mg (rendimiento del 32 %) del intermedio 24. Tr = 5,28 min, m/z = 896 [M+H]⁺, m/z = 894 [M-H]⁻.

Intermedio 25: [3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxiinosina]-(3',5')-[3'-O(CE)fosfodiéster-N⁶(Bz)-2'-desoxiadenosina]



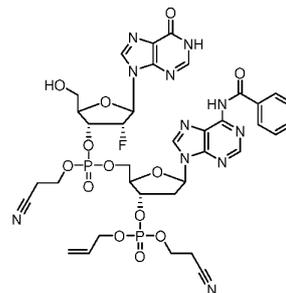
- 5 El intermedio 25 se preparó a partir del intermedio 24 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.E para proporcionar 390 mg (rendimiento del 83 %) del intermedio 25. CL-EM: Tr = 3,35 min, m/z = 856 [M+H]⁺, m/z = 854 [M-H]⁻.

Intermedio 26: (3',3')Cíclico-[3'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)-2'-desoxiadenosina]-[3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxilinosina]



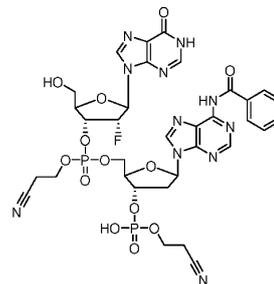
- 10 El intermedio 26 se preparó a partir del intermedio 25 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.G para proporcionar 0,38 g (rendimiento del 99 %) del intermedio 26. CL-EM: Tr = 3,91 min, m/z = 838 [M+H]⁺, m/z = 836 [M-H]⁻.

Intermedio 27: [3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-(3',5')-[3'-O(Alilo,CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)-2'-desoxiadenosina]



- 15 El intermedio 27 se preparó a partir del intermedio 23 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluorinosina usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 3,16 g (rendimiento del 62 %) del intermedio 27. Tr = 4,27 min, m/z = 914 [M+H]⁺, m/z = 912 [M-H]⁻.

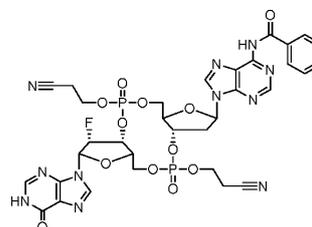
Intermedio 28: [3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-(3',5')-[3'-O(CE)fosfodiéster-N⁶(Bz)-2'-desoxiadenosina]



El intermedio 28 se preparó a partir del intermedio 27 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.E para proporcionar 1,10 g (rendimiento del 69 %) del intermedio 28. CL-EM: Tr = 3,52 min, m/z = 874 [M+H]⁺, m/z = 872 [M-H]⁻.

5

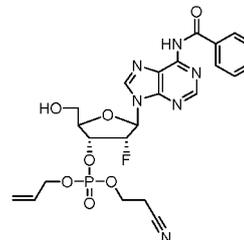
Intermedio 29: (3',3')Cíclico-[3'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)2'-desoxiadenosina]-[3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]



El intermedio 29 se preparó a partir del intermedio 28 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.H para proporcionar 1,01 g (rendimiento del 99 %) del intermedio 29. CL-EM: Tr = 4,23 y 4,07 min, m/z = 856 [M+H]⁺, m/z = 854 [M-H]⁻.

10

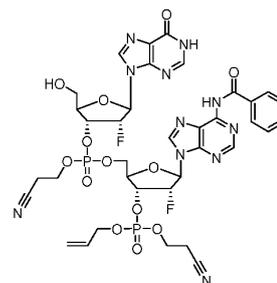
Intermedio 30: 3'-O(Alilo,CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina



El intermedio 30 se preparó a partir de la fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.A para proporcionar 2,68 g (rendimiento del 85 %) del intermedio 30. CL-EM: Tr = 4,50 min, m/z = 547 [M+H]⁺, m/z = 545 [M-H]⁻.

15

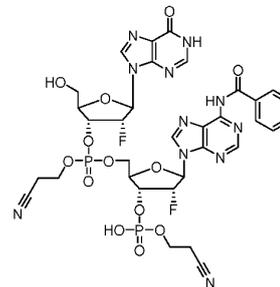
Intermedio 31: [3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-(3',5')-[3'-O(Alilo,CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina]



El intermedio 31 se preparó a partir del intermedio 30 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluorinosina comercial usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 2,53 g (rendimiento del 55 %) del intermedio

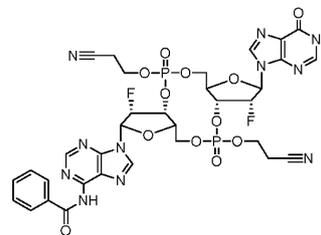
31. Tr = 4,39 min, m/z = 932 [M+H]⁺, m/z = 930 [M-H]⁻.

Intermedio 32: [3'-O(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-(3',5')-[3'-O-(CE)fosfodiéster-N⁶(Bz)-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina]



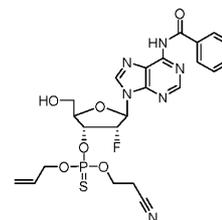
5 El intermedio 32 se preparó a partir del intermedio 31 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.E para proporcionar 4,4 g (rendimiento del 92 %) del intermedio 32. CL-EM: Tr = 3,58 y 3,59 min, m/z = 892 [M+H]⁺, m/z = 891 [M-H]⁻.

Intermedio 33: (3',3')Cíclico-[3'-O(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)2'-desoxi-2'-fluoroadenosina]-[3'-O-(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]



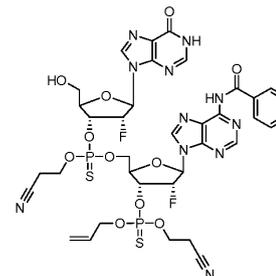
10 El intermedio 33 se preparó a partir del intermedio 32 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.G para proporcionar 1,40 g (rendimiento del 99 %) del intermedio 33. CL-EM: Tr = 4,21 y 4,42 min, m/z = 874 [M+H]⁺, m/z = 872 [M-H]⁻.

Intermedio 34: 3'-O(Alilo,CE)fosforotioato-triéster-N⁶(Bz)-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina



15 El intermedio 34 se preparó a partir de la fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.A para proporcionar 647 mg (rendimiento del 55 %) del intermedio 34. CL-EM: Tr = 5,06 min, m/z = 563 [M+H]⁺, m/z = 561 [M-H]⁻.

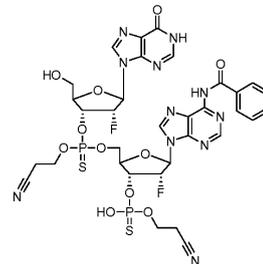
Intermedio 35: [3'-O(CE)fosforotioato-triéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-(3',5')-[3'-O(Alilo,CE)fosforotioato-triéster-N⁶(Bz)-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina]



El intermedio 35 se preparó a partir del intermedio 34 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroinosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 447 mg (rendimiento del 35 %) del intermedio 35. Tr = 6,20 min, m/z = 964 [M+H]⁺, m/z = 962 [M-H]⁻.

5

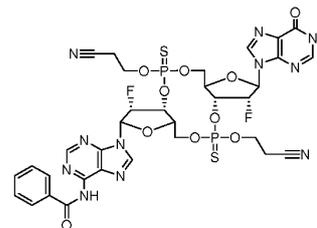
Intermedio 36: [3'-O(CE)fosforotioato-triéster-2'-desoxi-2'-fluoroinosina]-
(3',5')-[3'-O-(CE)fosforotioato-diéster-N⁶(Bz)-2'-desoxi-2'-
fluoroadenosina]



El intermedio 36 se preparó a partir del intermedio 35 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.E para proporcionar 232 mg (rendimiento del 43 %) del intermedio 36. CL-EM: Tr = 4,25 y 4,55 min, m/z = 924 [M+H]⁺, m/z = 922 [M-H]⁻.

10

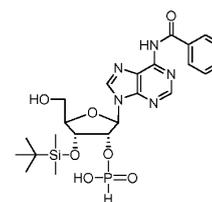
Intermedio 37: (3',3')Cíclico-[3'-O(CE)fosforotioato-triéster-N⁶(Bz)2'-
desoxi-2'-fluoroadenosina]-[3'-O-(CE)fosforotioato-
triéster-2'-desoxi-2'-fluoroinosina]



El intermedio 37 se preparó a partir del intermedio 36 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.G para proporcionar 35 mg (rendimiento del 36 %) del intermedio 37. CL-EM: Tr = 5,00 y 5,32 min, m/z = 906 [M+H]⁺, m/z = 904 [M-H]⁻.

15

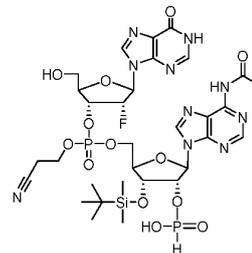
Intermedio 38: 2'-O-(H-fosfonato)-3'-O-TBDMS-N⁶(Bz)-adenosina



El intermedio 38 se preparó a partir de la 2'-fosforamidita de adenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.B para proporcionar 1,81 g (rendimiento del 95 %) del intermedio 38. CL-EM: Tr = 4,53 min, m/z = 550 [M+H]⁺, m/z = 548 [M-H]⁻.

20

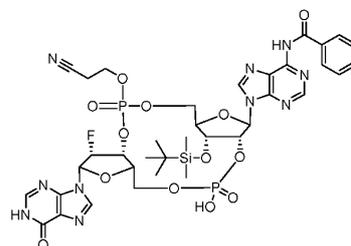
Intermedio 39: [3'-O-(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-
(3',5')-[2'-O-(H-fosfonato)-3'-O-TBDMS-N⁶(Bz)-
adenosina]



El intermedio 39 se preparó a partir del intermedio 38 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluorinosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.D para proporcionar 340 mg (rendimiento del 55 %) del intermedio 39. Tr = 4,28 min, m/z = 935 [M+H]⁺, m/z = 933 [M-H]⁻.

5

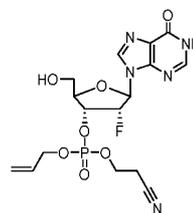
Intermedio 40: Cíclico-(2',3')-[2'-O-(CE)fosfotriéster-3'-O-TBDMS-
N⁶(Bz)adenosina]-[3'-O-(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-
2'-fluorinosina]



El intermedio 40 se preparó a partir del intermedio 39 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.I para proporcionar 340 mg (rendimiento del 95 %) del intermedio 40. CL-EM: Tr = 4,44 min, m/z = 933 [M+H]⁺, m/z = 931 [M-H]⁻.

10

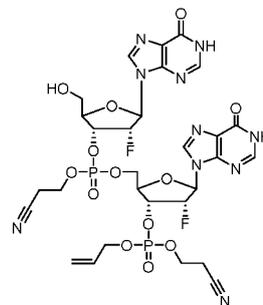
Intermedio 41: 3'-O-(Alilo,CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina



El intermedio 41 se preparó a partir de la fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluorinosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.A para proporcionar 600 mg (rendimiento del 98 %) del intermedio 41. CL-EM: Tr = 3,78 min, m/z = 444 [M+H]⁺, m/z = 442 [M-H]⁻.

15

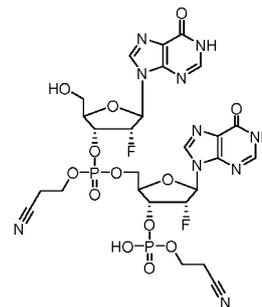
Intermedio 42: [3'-O-(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-(3',5')-[3'-
O-(Alilo, CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]



El intermedio 42 se preparó a partir del intermedio 41 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluorinosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 610 mg (rendimiento del 55 %) del intermedio 42. Tr = 5,50 min, m/z = 829 [M+H]⁺, m/z = 827 [M-H]⁻.

20

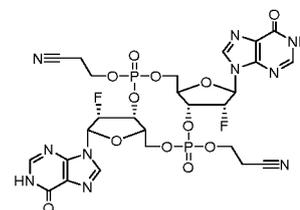
Intermedio 43: [3'-O-(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-(3',5')-[3'-O-(CE)fosfodiéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]



El intermedio 43 se preparó a partir del intermedio 42 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.F para proporcionar 580 mg (rendimiento del 90 %) del intermedio 43. CL-EM: Tr = 3,40 min, m/z = 789 [M+H]⁺, m/z = 787 [M-H]⁻.

5

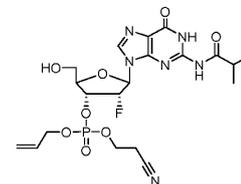
Intermedio 44: Cíclico-(3',3')-[3'-O-(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]-[3'-O-(CE)fosfotriéster-2'-desoxi-2'-fluorinosina]



El intermedio 44 se preparó a partir del intermedio 43 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.H para proporcionar 500 mg (rendimiento del 99 %) del intermedio 44. CL-EM: Tr = 3,86 min, m/z = 771 [M+H]⁺, m/z = 769 [M-H]⁻.

10

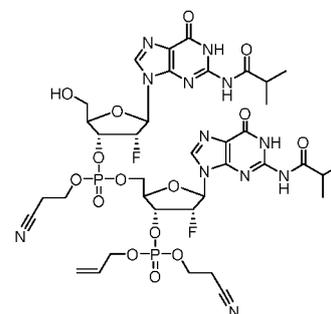
Intermedio 45: 3'-O-(Alilo,CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina



El intermedio 45 se preparó a partir de la fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.A para proporcionar 3,75 g (rendimiento del 60 %) del intermedio 45. CL-EM: Tr = 4,25 min, m/z = 529 [M+H]⁺, m/z = 527 [M-H]⁻.

15

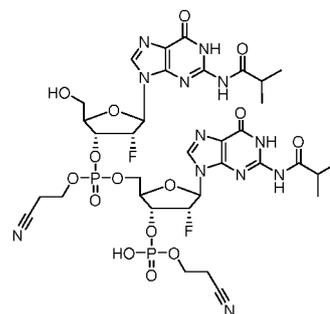
Intermedio 46: [3'-O-(CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]-(3',5')-[3'-O-(Alilo,CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



El intermedio 46 se preparó a partir del intermedio 45 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 1,07 g (rendimiento del 67 %) del intermedio 46. Tr = 4,80 min, m/z = 999 [M+H]⁺, m/z = 997 [M-H]⁻.

20

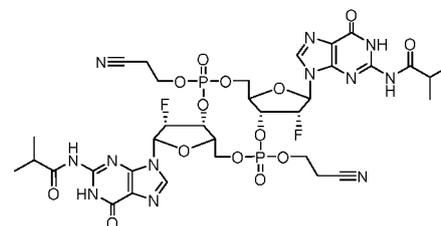
Intermedio 47: [3'-O-(CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'fluoroguanosina]-(3',5')-[3'-O-(CE)fosfodiéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



El intermedio 47 se preparó a partir del intermedio 46 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.F para proporcionar 610 mg (rendimiento del 99 %) del intermedio 47. CL-EM: Tr = 4,05 min, m/z = 959 [M+H]⁺, m/z = 957 [M-H]⁻.

5

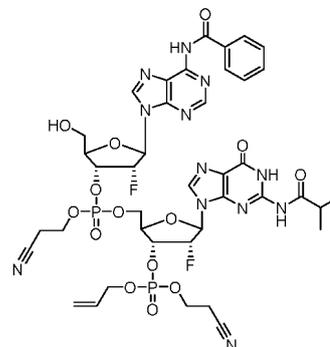
Intermedio 48: Cíclico-(3',3')-[3'-O-(CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]-[3'-O-(CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



El intermedio 48 se preparó a partir del intermedio 47 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.H para proporcionar 580 mg (rendimiento del 96 %) del intermedio 48. CL-EM: Tr = 4,77 min, m/z = 941 [M+H]⁺, m/z = 939 [M-H]⁻.

10

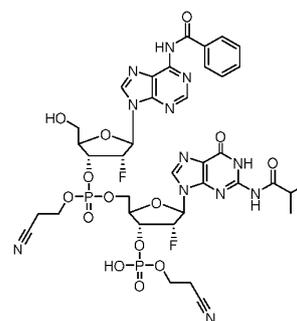
Intermedio 49: [3'-O-(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)2'-desoxi-2'fluoroadenosina]-(3',5')-[3'-O-(Alilo,CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



El intermedio 49 se preparó a partir del intermedio 45 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 4,96 g (rendimiento del 68 %) del intermedio 49. Tr = 4,98 min, m/z = 1017 [M+H]⁺, m/z = 1015 [M-H]⁻.

15

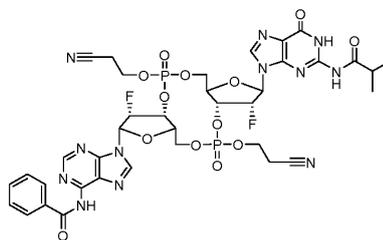
Intermedio 50: [3'-O-(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)2'-desoxi-2'fluoroadenosina]-(3',5')-[3'-O-(CE)fosfodiéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



El intermedio 50 se preparó a partir del intermedio 47 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.E

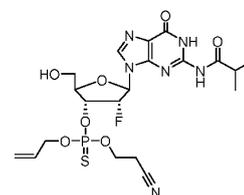
para proporcionar 4,4 g (rendimiento del 92 %) del intermedio 50. CL-EM: Tr = 4,36 min, m/z = 977 [M+H]⁺, m/z = 975 [M-H]⁻.

Intermedio 51: Cíclico-(3',3')-[3'-O-(CE)fosfotriéster-N⁶(Bz)2'-desoxi-2'fluoroadenosina]-[3'-O-(CE)fosfotriéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



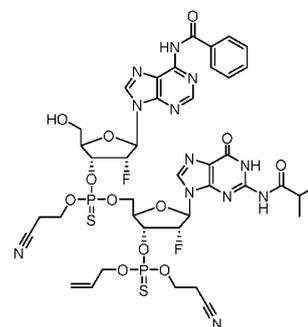
- 5 El intermedio 51 se preparó a partir del intermedio 50 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.G para proporcionar 4,30 g (rendimiento del 99 %) del intermedio 51. CL-EM: Tr = 5,72 min, m/z = 838 [M+H]⁺, m/z = 836 [M-H]⁻.

Intermedio 52: 3'-O-(Alilo,CE)fosforotioato-triéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina



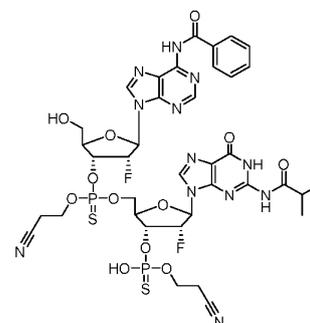
- 10 El intermedio 52 se preparó a partir de la fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.A para proporcionar 632 mg (rendimiento del 50 %) del intermedio 52. CL-EM: Tr = 5,86 min, m/z = 545 [M+H]⁺, m/z = 543 [M-H]⁻.

Intermedio 53: [3'-O-(CE)fosforotioato-triéster-N⁶(Bz)2'-desoxi-2'fluoroadenosina]-(3',5')-[3'-O-(Alilo,CE)fosforotioato-triéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



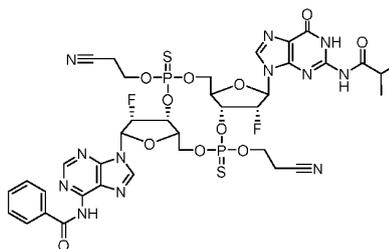
- 15 El intermedio 53 se preparó a partir del intermedio 52 y fosforamidita de 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina disponible en el mercado usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.C para proporcionar 310 mg (rendimiento del 25 %) del intermedio 53. Tr = 6,60 min, m/z = 1049 [M+H]⁺, m/z = 1047 [M-H]⁻.

Intermedio 54: [3'-O-(CE)fosforotioato-triéster-N⁶(Bz)2'-desoxi-2'fluoroadenosina]-(3',5')-[3'-O-(CE)fosforotioato-diéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



- 20 El intermedio 54 se preparó a partir del intermedio 53 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.E para proporcionar 100 mg (rendimiento del 33 %) del intermedio 54. CL-EM: Tr = 4,58 y 4,70 min, m/z = 1009 [M+H]⁺, m/z = 1007 [M-H]⁻.

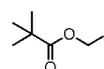
Intermedio 55: Cíclico-(3',3')-[3'-O-(CE)fosforotioato-triéster-N⁶(Bz)2'-desoxi-2'fluoroadenosina]-[3'-O-(CE)fosforotioato-triéster-N²(iB)-2'-desoxi-2'-fluoroguanosina]



El intermedio 55 se preparó a partir del intermedio 54 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.G para proporcionar 75 mg (rendimiento del 76 %) del intermedio 55. CL-EM: Tr = 5,32 y 5,54 min, m/z = 991 [M+H]⁺, m/z = 989 [M-H]⁻.

5

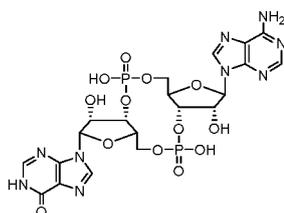
Intermedio 56: Pivalato de yodometilo



Una solución de pivalato de clorometilo (1,0 g, 6,64 mmol) en ACN seco (15 ml) se trató con yoduro sódico (1,9 g, 13,28 mmol). La mezcla se agitó a TA durante una noche en la oscuridad. Después, el disolvente se retiró al vacío y el residuo se disolvió en DCM. La solución se lavó con agua, una solución al 5 % de NaHSO₃ y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 1,22 g del intermedio 53 en bruto, que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN ¹H (CDCl₃-d₁, 300 MHz) δ (ppm) 5,86 (s, 2H), 1,12 (s, 9H).

10

Ejemplo 1.1:

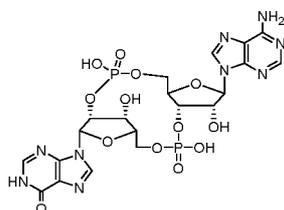


c-AIMF

El Ejemplo 1.1 se preparó a partir del intermedio 3 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.J para proporcionar 2,4 g (rendimiento del 60 %) del ejemplo 1.1. CL-EM: Tr = 2,72 min, m/z = 660 [M+H]⁺, m/z = 658 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,34 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 5,94 (s, 2H), 5,06-4,80 (m, 4H), 4,42 (m, 4H), 4,03 (m, 2H).

15

Ejemplo 1.2:



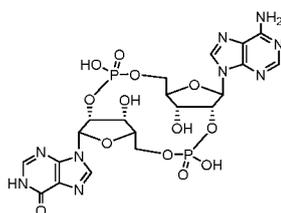
(3',2')c-AIMP
CL606

El Ejemplo 1.2 se preparó a partir del intermedio 13 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.J para proporcionar 22,5 mg (rendimiento del 21 %) del Ejemplo 1.2. CL-EM: Tr = 2,46 min, m/z = 660 [M+H]⁺, m/z = 658 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,27 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 5,99 (s, 2H), 4,95 (m, 2H), 4,86 (m, 1H), 4,42 (m, 4H), 4,05 (m, 2H).

20

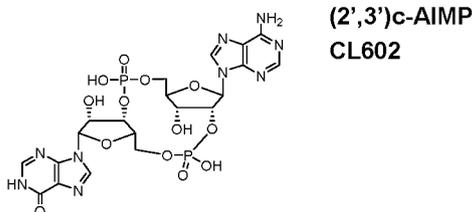
25

Ejemplo 1.3:

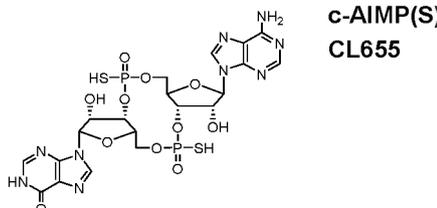


(2',2')c-AIMP
CL611

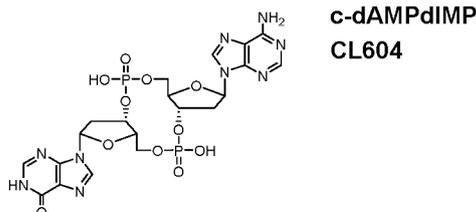
El Ejemplo 1.3 se preparó a partir del intermedio 17 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.J para proporcionar 17,5 mg (rendimiento del 22 %) del Ejemplo 1.3. CL-EM: Tr = 1,35 min, m/z = 660 [M+H]⁺, m/z = 658 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,44 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 6,20 (d, 1H), 6,07 (d, 1H), 5,22 (m, 1H), 4,91 (m, 1H), 4,79 (m, 2H), 4,63 (m, 1H), 4,56 (m, 1H), 4,22 (m, 2H), 4,07 (m, 2H).

Ejemplo 1.4:

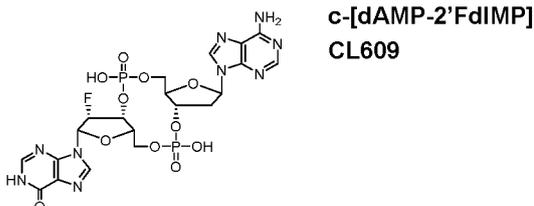
El Ejemplo 1.4 se preparó a partir del intermedio 20 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.J para proporcionar 50 mg (rendimiento del 19 %) del Ejemplo 1.4. CL-EM: Tr = 1,53 min, m/z = 660 [M+H]⁺, m/z = 658 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,50 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 6,24 (d, 1H), 6,08 (s, 1H), 5,20 (m, 1H), 4,83-4,73 (m, 2H), 4,58 (d, 1H), 4,40 (m, 2H), 4,26 (m, 2H), 4,04 (m, 2H).

Ejemplo 1.5:

El Ejemplo 1.5 se preparó a partir del intermedio 22 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.J para proporcionar 7 mg (rendimiento del 20 %) del Ejemplo 1.5. CL-EM: Tr = 3,45 min, m/z = 692 [M+H]⁺, m/z = 690 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,54 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 6,65 (dd, 1H), 6,15 (dd, 1H), 4,60-4,50 (m, 4H), 4,45 (m, 4H), 4,05 (m, 2H).

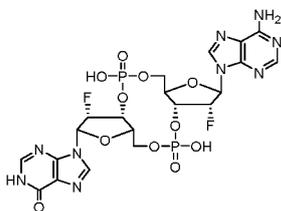
Ejemplo 1.6:

El Ejemplo 1.6 se preparó a partir del intermedio 26 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 90 mg (rendimiento del 31 %) del Ejemplo 1.6. CL-EM: Tr = 2,47 min, m/z = 628 [M+H]⁺, m/z = 626 [M-H]⁻. RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm) 8,37 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,26 (sa, 2H), 6,28 (m, 2H), 4,68 (m, 2H), 4,08 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 2,83 (m, 2H).

Ejemplo 1.7:

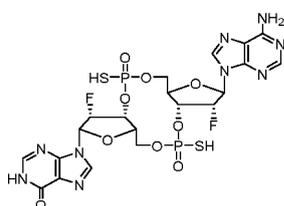
El Ejemplo 1.7 se preparó a partir del intermedio 29 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 40 mg (rendimiento del 21 %) del Ejemplo 1.7. CL-EM: Tr = 1,97 min, m/z = 646 [M+H]⁺, m/z = 644

[M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,29 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 6,25 (m, 2H), 5,54 (m, 1H), 5,07 (m, 2H), 4,37 (m, 4H), 4,06 (m, 2H).

Ejemplo 1.8:

c-(2'FdAMP)-(2'FdIMP)
CL614

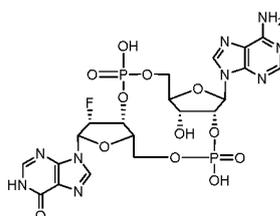
- 5 El Ejemplo 1.8 se preparó a partir del intermedio 33 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 104 mg (rendimiento del 10 %) del Ejemplo 1.8. CL-EM: Tr = 2,78 min, m/z = 664 [M+H]⁺, m/z = 662 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,37 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 6,23 (m, 2H), 5,45 (m, 2H), 5,39 (m, 1H), 4,95 (m, 2H), 4,50 (m, 2H), 4,06 (m, 2H).

Ejemplo 1.9:

c-[(2'FdAMP(S))-2'FdIMP(S)]
CL656

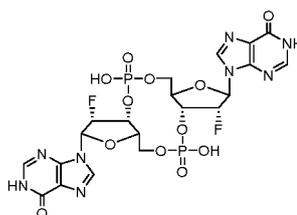
- 10 El Ejemplo 1.9 se preparó a partir del intermedio 37 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 10 mg (rendimiento del 18 %) del Ejemplo 1.9. CL-EM: Tr = 3,41 min, m/z = 696 [M+H]⁺, m/z = 694 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,55 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 6,63 (dd, 1H), 6,15 (dd, 1H), 5,16-4,95 (m, 4H), 4,52 (m, 4H), 4,07 (m, 2H).

15

Ejemplo 1.10:

(2',3')c-(AMP-2'FdIMP)
CL647

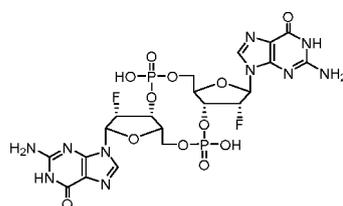
- 20 El Ejemplo 1.10 se preparó a partir del intermedio 40 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.J para proporcionar 50 mg (rendimiento del 19 %) del Ejemplo 1.10. CL-EM: Tr = 2,25 min, m/z = 662 [M+H]⁺, m/z = 660 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,58 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 6,65 (d, 1H), 6,16 (d, 1H), 4,50 (m, 2H), 5,15 (m, 2H), 4,41 (m, 4H), 4,02 (m, 1H), 3,73 (m, 1H).

Ejemplo 1.11:

c-di(2'FdIMP)
CL626

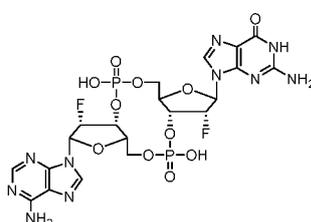
- 25 El Ejemplo 1.11 se preparó a partir del intermedio 44 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 157 mg (rendimiento del 35 %) del Ejemplo 1.11. CL-EM: Tr = 1,48 min, m/z = 665 [M+H]⁺, m/z = 663 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,34 (s, 2H), 8,08 (s, 2H), 7,85 (s, 2H), 6,21 (m, 2H), 5,66 (m, 1H), 5,49

(m, 1H), 5,20 (m, 2H), 4,97 (m, 4H), 4,06 (m, 2H).

Ejemplo 1.12:

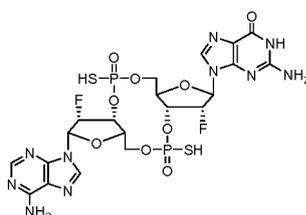
c-di(2'FdGMP)
CL629

- 5 El Ejemplo 1.12 se preparó a partir del intermedio 48 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 15 mg (rendimiento del 5 %) del Ejemplo 1.12. CL-EM: Tr = 1,58 min, m/z = 695 [M+H]⁺, m/z = 693 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,70 (s, 2H), 6,05 (d, 2H), 5,06-4,05 (m, 8H), 4,08 (m, 2H).

Ejemplo 1.13:

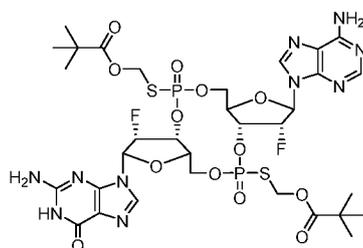
c-(2'FdGMP-2'FdAMP)
CL603

- 10 El Ejemplo 1.13 se preparó a partir del intermedio 51 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 320 mg (rendimiento del 31 %) del Ejemplo 1.13. CL-EM: Tr = 2,48 min, m/z = 679 [M+H]⁺, m/z = 677 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,17 (s, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 6,09 (d, 1H), 5,94 (d, 1H), 5,62 (m, 1H), 5,50 (m, 1H), 5,15 (m, 2H), 4,42 (m, 4H), 4,03 (m, 2H).

Ejemplo 1.14:

c-[2'FdGMP(S)-2'FdAMP(S)]
CL632

- 15 El Ejemplo 1.14 se preparó a partir del intermedio 55 usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.K para proporcionar 15 mg (rendimiento del 28 %) del Ejemplo 1.14. CL-EM: Tr = 2,66 min, m/z = 711 [M+H]⁺, m/z = 709 [M-H]⁻. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) 8,58 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 6,65 (d, 1H), 6,19 (d, 1H), 4,94 (d, 1H), 4,62-4,50 (m, 4H), 4,42 (m, 4H), 4,03 (m, 2H).

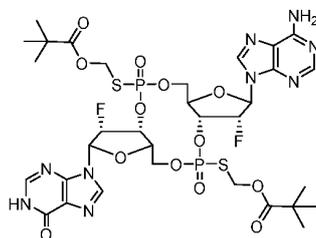
Ejemplo 1.15:

c-[2'FdGMP(S)-2'FdAMP(S)](POM)₂
CL633

- 20 A una solución del Ejemplo 1.14 (7 mg, 9,85 μmol) en agua (200 μl) se añadió gota a gota una solución del intermedio 56 (19 mg, 79,0 μmol) en acetona (500 μl). La mezcla se agitó durante una noche en la oscuridad. Después, la mezcla se neutralizó con una solución saturada de Na₂S₂O₃ (15 μl) y a continuación se diluyó con agua (10 ml). La capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc (3 x 10 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar 4 mg (rendimiento del 45 %) del Ejemplo 1.15. CL-EM: Tr = 4,11 min, m/z = 907 [M+H]⁺, m/z = 905 [M-H]⁻. RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm)
- 25

8,61 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 6,70 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 4,70-4,50 (m, 4H), 4,42 (m, 4H), 4,03 (m, 2H), 3,77 (s, 4H), 1,20 (s, 18H).

Ejemplo 1.16:



c-[2'FdIMP(S)-2'FdAMP(S)](POM)₂
CL659

- 5 A una solución del Ejemplo 1.9 (5 mg, 7,19 μ mol) en agua (200 μ l) se añadió gota a gota una solución del intermedio 56 (17 mg, 70 μ mol) en acetona (500 μ l). La mezcla se agitó durante una noche en la oscuridad. Después, la mezcla se neutralizó con una solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (15 μ l) y a continuación se diluyó con agua (10 ml). La capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc (3 x 10 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar 5 mg (rendimiento del 78 %) del Ejemplo 1.16. CL-EM: Tr = 4,55 min, m/z = 892 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z = 890 $[\text{M}-\text{H}]^-$. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm) 8,61 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 6,70 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 4,70-4,50 (m, 4H), 4,42 (m, 4H), 4,03 (m, 2H), 3,77 (s, 4H), 1,20 (s, 18H).

Ejemplo 2: ensayos biológicos

- 15 Los inventores han determinado que varios dinucleótidos cíclicos de la presente invención inducen la producción de múltiples citocinas en células humanas o animales. Específicamente, estos dinucleótidos cíclicos inducen la producción de interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias. Se señala aquí que la actividad de inducción de citocinas *in vitro* de un conjunto representativo de estos dinucleótidos cíclicos requiere la presencia del receptor celular eucariota *estimulador de genes de interferón* (STING).

20

Inducción de citocinas *in vitro*

Las actividades de inducción de citocinas de dinucleótidos cíclicos no fluorados frente a fluorados desvelados en la presente invención se han demostrado usando diferentes líneas celulares indicadoras. Las líneas celulares y los experimentos se explican a continuación.

25

Líneas celulares

Todas las líneas celulares se obtuvieron de InvivoGen. Se describen aquí y se proporcionan con su código de catálogo InvivoGen correspondiente.

30

THP1-Dual™ (código de catálogo InvivoGen: thpd-nfis): Estas células se obtuvieron de la línea celular monocítica humana THP-1 mediante la integración estable de dos construcciones indicadoras inducibles. Permiten el estudio simultáneo de las dos rutas principales de señalización para STING: la ruta de NF- κ B, supervisando la actividad de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP); y la ruta de IRF, evaluando la actividad de una luciferasa secretada (Lucia).

35

Ambas proteínas indicadoras se pueden medir fácilmente en el sobrenadante de cultivo celular cuando se usa QUANTI-Blue™ (código de catálogo InvivoGen: rep-qb1), un reactivo de detección de SEAP que se vuelve morado/azul en presencia de SEAP (cuantificado midiendo la densidad óptica de 620 nm a 655 nm) y QUANTI-Luc™ (InvivoGen; código de catálogo: rep-qlc1), un ensayo enzimático luminométrico que mide la expresión de luciferasa para informar sobre la expresión de ISG54 (como un indicador de la producción de IFN- α/β).

40

Líneas celulares Lucia ISG: Cada una de las siguientes dos líneas celulares expresa un gen indicador de luciferasa (Lucia) secretado bajo el control de un promotor inducible por IRF. Este promotor compuesto comprende cinco elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) fusionados con un promotor mínimo del gen de ISG54 humano, que no responde a activadores de las rutas de NF- κ B o AP-1. Por lo tanto, estas células permiten la supervisión de la ruta de IRF basada en la actividad luciferasa (Lucia). En la presente invención, se usa supervisión de la ruta de IRF para medir la actividad agonista de STING de los dinucleótidos cíclicos objeto.

45

1. **RAW-Lucia™ ISG** (código de catálogo InvivoGen: rawl-isg): Estas células se generaron a partir de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 murina.

50

2. **RAW-Lucia™ ISG-KO-STING** (código de catálogo InvivoGen: rawl-kostg): Estas células se generaron a partir de la línea celular RAW-Lucia™ ISG54 (véase anteriormente), mediante inactivación homocigota estable del gen

55

de STING.

Líneas celulares B16 Blue™ ISG54: Cada una de las siguientes dos líneas celulares expresa un gen indicador de SEAP bajo un promotor: el indicador I-ISG54, que comprende el promotor de ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico. La estimulación de estas células con interferones, o inductores de interferones de tipo I o de la ruta de NF-κB, desencadena la activación del promotor de I-ISG54 (y, en consecuencia, la producción de SEAP) o del promotor mínimo de IFN-β (y, en consecuencia, la producción de TNF-α). Los niveles de SEAP en el sobrenadante se pueden determinar fácilmente usando QUANTI-Blue™ (código de catálogo InvivoGen: rep-qb1), un reactivo que se vuelve morado/azul en presencia de SEAP, midiendo la densidad óptica de 620 nm a 655 nm.

1. **B16-Blue™ ISG** (código de catálogo InvivoGen: bb-ifnabg): Estas células se obtienen de la línea celular de melanoma murino B16 F1. La producción de interferones de tipo I en estas células se mide usando QUANTI-Blue™.

2. **B16-Blue™ ISG-KO-STING** (código de catálogo InvivoGen: bb-kostg): Estas células se generaron a partir de la línea celular B16-Blue™ ISG (véase anteriormente), mediante inactivación homocigota estable del gen de STING. La producción de interferones de tipo I en estas células se mide usando QUANTI-Blue™.

Líneas celulares HEK-Blue™: Las siguientes tres líneas celulares también se usaron para la evaluación biológica de los CDN.

1. **HEK-Blue™ IFN-α/β-KO-STING:** Estas células se obtienen de células HEK-Blue™ IFN-α/β (código de catálogo InvivoGen: hkb-ifnab), en las que el gen de STING se ha desactivado. Las células HEK-Blue™ IFN-α/β permiten la detección de IFN bioactivos de tipo I humano mediante supervisión de la activación de la ruta de ISGF3. Estas células se generaron mediante transfección estable de células HEK293 con los genes humanos STAT2 e IRF9 para obtener una ruta de señalización de IFN de tipo I completamente activa. Los otros genes de la ruta (IFNAR1, IFNAR2, JAK1, TyK2 y STAT1) se expresan de manera natural en cantidades suficientes. Las células se transfectaron adicionalmente con un gen indicador de SEAP bajo el control de un promotor de ISG54 inducible por IFN-α/β. La estimulación de las células HEK-Blue™ IFN-α/β con IFN-α o IFN-β humano activa la ruta de JAK/STAT/ISGF3 y posteriormente induce la producción de SEAP. La producción de interferones de tipo I en estas células se mide usando QUANTI-Blue™.

2. **HEK-Blue™ IL-1R** (código de catálogo InvivoGen: hkb-il1r): Las células HEK-Blue™ IL-1R se diseñaron para detectar IL-1β humana y murina bioactiva mediante supervisión de la activación de las rutas de NF-κB y AP-1. Adicionalmente, estas células detectan IL-1β bioactiva de monos cynomolgus, perros y ratas. De hecho, las células HEK-Blue™ IL-1R pueden detectar IL-1α e IL-1 β, ya que estas citocinas se unen al mismo receptor, IL-1R. Estas células proceden de las células HEK-Blue™ IL-1β (código de catálogo InvivoGen: hkb-il1b), en las que se bloquea la respuesta de TNF-α. Por lo tanto, las células HEK-Blue™ IL-1R responden específicamente a IL-1. Estas células expresan de manera endógena el receptor de IL-1 humano y se transfectaron de manera estable con el receptor de IL-1 murino, haciéndolos muy sensibles a IL-1β tanto humana como murina. Las células HEK-Blue™ IL-1R expresan un gen indicador de SEAP bajo el control de un promotor mínimo de IFN-β fusionado con cinco sitios de unión de NF-κB y cinco de AP-1. La unión de IL-1 β a IL-1R en la superficie de células HEK-Blue™ IL-1R desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación de NF-κB y la posterior producción de SEAP. La producción de IL-1 β en estas células se mide usando QUANTI-Blue™.

3. **HEK-Blue™ TNF-α** (código de catálogo InvivoGen: hkb-tnfmyd): Las células HEK-Blue™ TNF-α permiten la detección de TNF-α humano y murino bioactivo mediante supervisión de la activación de la ruta de NF-κB. Estas células se generaron por transfección estable de células HEK293 con un gen indicador de SEAP bajo el control de un promotor mínimo de IFN-β fusionado con cinco sitios de unión de NF-κB y cinco de AP-1. Además, se hicieron adicionalmente insensibles a IL-1 β al inactivar el gen de MyD88. La estimulación de células HEK-Blue™ TNF-α con TNF-α desencadena la activación del promotor inducible por NF-κB y la producción de SEAP. La producción de TNF-α en estas células se mide usando QUANTI-Blue™.

Quantificación de IL-6 en experimentos

La interleucina-6 se cuantificó usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) según las instrucciones del fabricante (R&D Systems).

En cultivos celulares

En diversos experimentos en los que diferentes cultivos celulares se incubaron por separado con un dinucleótido cíclico, los dinucleótidos cíclicos indujeron la producción de interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias en esas células, según lo determinado indirectamente por un ensayo indicador de ISG54 (gen estimulado por interferón) (Fensterl, White, Yamashita, y Sen, 2008). Estos experimentos se realizaron como se describe a continuación.

Ejemplo 2.1: Medición de la inducción de citocinas en cultivos celulares tratados

- **Líneas celulares indicadoras de citocinas usadas:** THP1-Dual™
- **Dinucleótidos cíclicos probados:** CL609, CL614, CL656, CL647, CL629, CL626, CL603, CL632 y CL633
- **Compuesto de referencia:** c-AIMP (fabricado por InvivoGen), c-diGMP (código de catálogo InvivoGen: tlr-cdg), c-diIMP (código de catálogo InvivoGen: tlr-cdi) y c-GAMP (código de catálogo InvivoGen: tlr-cga)
- **Actividades evaluadas:** Inducción de IFN de tipo I e inducción de la ruta de NF-κB.

A cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano se añadieron 20 µl de una solución de dinucleótido cíclico (100 µg/ml en agua estéril), seguido de 180 µl de una suspensión de una sola línea celular (THP1-Dual™: *aprox.* 100.000 células por pocillo). La placa se incubó durante 18 h a 24 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. El nivel de IFN-α/β se cuantificó indirectamente usando QUANTI-Luc™, que se preparó y se usó según las instrucciones del fabricante. La actividad de NF-κB se cuantificó indirectamente usando QUANTI-Blue™, que se preparó y se usó según las instrucciones del fabricante.

Los resultados de este experimento se muestran en las **figuras 2 y 3**, que revelan tres hallazgos importantes: en primer lugar, que todos los dinucleótidos cíclicos probados inducen interferones de tipo I en células THP1-Dual™ (Fig. 2); en segundo lugar, que todos ellos inducen la ruta de NF-κB en estas células (Fig. 3); y, por último, que para ambas de estas actividades la mayoría de los dinucleótidos cíclicos fluorados son más activos que los compuestos de referencia correspondientes (c-AIMP, c-diGMP, c-diIMP y c-GAMP).

La actividad de inducción de citocinas depende de STING

Los dinucleótidos cíclicos desvelados en la presente invención no inducen la producción de citocinas *in vitro* en el sobrenadante de células que carecen del receptor STING.

En un experimento en el que las células indicadoras de tipo silvestre (TS) y las células indicadoras con inactivación homocigota de STING (STING KO) se incubaron por separado con el dinucleótido cíclico durante 18 h a 24 h, el dinucleótido cíclico indujo la producción de interferones de tipo I en las células TS pero no en las células STING KO. Este hallazgo demostró que STING es necesario para la actividad de inducción de citocinas del dinucleótido cíclico *in vitro* en células. Estos experimentos se realizaron como se describe a continuación:

Ejemplo 2.2: Medición de la inducción de citocinas en células de tipo silvestre o con inactivación de STING tratadas con CDN

- **Líneas celulares indicadoras de citocinas usadas:** B16-Blue™ ISG y RAW-Lucia™ ISG
- **Dinucleótidos cíclicos probados:** CL609, CL614, CL656, CL647, CL629, CL626, CL603, CL632 y CL633
- **Compuesto de referencia:** c-AIMP (fabricado por InvivoGen), c-diGMP (código de catálogo InvivoGen: tlr-cdg), c-diIMP (código de catálogo InvivoGen: tlr-cdi) y c-GAMP (código de catálogo InvivoGen: tlr-cga)
- **Líneas celulares usadas:** RAW-Lucia™ ISG, RAW-Lucia™ ISG-KO-STING, B16-Blue™ ISG y B16-Blue™ ISG-KOSTING (según el experimento).

Estos experimentos se realizaron como se ha descrito en el ejemplo 2.1.

Los resultados de este experimento se muestran en las **figuras 4 y 5**, que revelan tres hallazgos importantes. En primer lugar, cada uno de los dinucleótidos cíclicos probados induce la producción de interferones de tipo I en células B16 TS (Fig. 4) y RAW TS (Fig. 5). En segundo lugar, ninguno de los compuestos presenta esta actividad en células B16 con inactivación de STING (Fig. 4) o RAW con inactivación de STING (Fig. 5), indicando de este modo que esta actividad requiere la presencia de STING. Por último, la mayoría de los dinucleótidos cíclicos fluorados son más activos que los compuestos de referencia correspondientes (c-AIMP, c-diGMP, c-diIMP y c-GAMP).

Inducción de citocinas *in vivo*

Los dinucleótidos cíclicos desvelados en la presente invención inducen citocinas *in vivo* en ratones.

Ejemplo 2.3: Medición de la inducción de citocinas en ratones tratados con CDN

- **Especies evaluadas:** ratón
- **Dinucleótidos cíclicos probados:** CL604, CL606, CL609, CL611 y CL614
- **Compuesto de referencia:** c-AIMP y solución salina
- **Citocinas evaluadas:** IFN-α/β (usando células indicadoras RAW ISG54) e IL-6 (por ELISA).

Veintiún ratones (Swiss; hembra; edad media: 8 semanas) se dividieron en siete grupos de tres: un grupo actuó como control (solución salina) y los otros seis grupos fueron tratados cada uno con un dinucleótido cíclico (c-AIMP, CL604, CL606, CL609, CL611 o CL614). El día -7, se recogieron muestras de sangre para determinar los niveles basales de citocinas de todos los ratones y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El día 1, los ratones fueron tratados con 200 µl de suero fisiológico (que contenía NaCl al 0,9 %) o 200 µl de una solución de un dinucleótido

cíclico (dosis: 10 mg/kg) en suero fisiológico (que contenía NaCl al 0,9 %), mediante inyección intravenosa (i.v.). Se recogieron muestras de sangre de los ratones a las 4 h después de la inyección y después se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Se midió la inducción de citocinas en los sueros de las muestras de sangre.

- 5 Los resultados de este experimento se muestran en las **figuras 6 y 7**, que revelan dos hallazgos importantes: en primer lugar, a la dosis indicada, en las primeras 4 h después del tratamiento, todos los dinucleótidos cíclicos probados excepto CL611 indujeron fuertemente interferones de tipo I (Fig. 6) en ratones; y, en segundo lugar, todos los dinucleótidos cíclicos excepto CL611 indujeron IL-6 (Fig. 7).

10 **Ejemplo 2.4: Medición de la eliminación *in vivo* de CDN en ratones**

Los inventores han medido la eliminación *in vivo* de dinucleótidos cíclicos representativos de la presente invención en ratones.

- 15 • **Dinucleótidos cíclicos probados:** CL603, CL609, CL614, CL626 y CL656
• **Compuestos de referencia:** c-AIMP (fabricado por InvivoGen).

Treinta ratones (C57BL/6) se dividieron en seis grupos de cinco. Dentro de cada grupo, cada ratón se trató con un dinucleótido cíclico diferente (50 mg/kg; embolada i.v.). Cada grupo de ratones se sacrificó en un punto temporal diferente después del tratamiento: ya sea 2 min, 5 min, 15 min, 30 min o 1 h. Justo antes del sacrificio, se recogió una muestra de sangre (500 µl). Las muestras de sangre se recogieron en tubos de heparina y después se centrifugaron. El sobrenadante (plasma) se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Antes del análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (HLPC/MS), las muestras de plasma se procesaron de la siguiente manera:

25 Plasma: cada muestra se trató con metanol en una proporción de 1:4, se agitó y se filtró (0,22 µm). Se inyectó un µl de la muestra procesada en la columna de HPLC/MS.

30 Se utilizó el siguiente gradiente de HPLC (A: formiato de amonio 10 mM; B: acetonitrilo; tiempo total: 6 min): 100 % de A durante 1 min; seguido de 100 % de A a 100 % de B en 4 min; seguido de 100 % de B durante 1 min. Cada dinucleótido cíclico se eluyó en un momento diferente y se detectó midiendo la absorbancia a 254 nm.

Los resultados de este experimento se muestran en la **figura 8**, lo que revela que los dinucleótidos cíclicos fluorados se retuvieron en la sangre de los ratones durante más tiempo que los dinucleótidos cíclicos no fluorados.

35 **Ejemplo 2.5: Comparación de CDN fluorados y no fluorados por su capacidad para inducir citocinas *in vitro* en sangre entera de donantes humanos sanos**

- 40 • Líneas celulares indicadoras usadas: HEK-Blue™ IFN-α/β-KO-STING, HEK-Blue™ IL-1R y HEK-Blue™ TNF-α
• CDN objeto probados: CL603, CL632, CL614 y CL656
• CDN de referencia (no fluorados) probados: c-GAMP, 2',3'-c-GAMP, c-AIMP y c-AIMP(S)
• Actividades evaluadas: Inducción de IFN de tipo I (HEK-Blue™ IFN-α/β-KO-STING), inducción de IL-1 (HEK-Blue IL-1R) e inducción de TNF-α (HEK-Blue TNF-α).

45 Adquisición y manipulación de muestras de sangre humana

Se obtuvieron veinte muestras de sangre humana de donantes sanos en el banco de sangre de San Diego (3636 Gateway Center Ave, Suite 100; San Diego, CA 92102; Estados Unidos; www.sandiegobloodbank.org). En resumen, las muestras se recolectaron mediante punción venosa en tubos de heparina de sodio (tapa verde) en el momento de la donación y después se almacenaron a 4 °C hasta su recogida. Los tubos fueron recogidos el día de su recolección, se almacenaron en hielo durante el transporte y posteriormente se probaron con los CDN el mismo día.

Tratamiento y análisis de muestras de sangre humana

55 Cada muestra de sangre se diluyó (1:1) en medio RPMI y se dividió en alícuotas en placas de 96 pocillos (pocillos de 180 µl) que contenían cada CDN a seis concentraciones diferentes (30 µg/ml, 10 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0,3 µg/ml y 0,1 µg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 18 a 20 horas. Al día siguiente se recogieron los sobrenadantes, se transfirieron a los pocillos correspondientes de placas de 96 pocillos de fondo redondo y se almacenaron a -80 °C. Al día siguiente, se preparó una nueva placa de 96 pocillos para cada una de las tres líneas celulares indicadoras probadas, de la siguiente manera: se añadieron 10 µl de sobrenadante de la placa anterior (que contenía los CDN incubados y el plasma) al pocillo correspondiente en la nueva placa de células indicadoras. Después, se añadió una alícuota de 180 µl de células de la línea celular indicadora deseada, previamente recogida en medio que contenía suero inactivado por calor y contada, a cada pocillo (aproximadamente 50.000 células/pocillo) y la placa se incubó durante aproximadamente 20 horas. La actividad de inducción de citocinas deseada se determinó usando el ensayo QUANTI-Blue™, como se ha descrito anteriormente. En resumen, se transfirieron 20 µl de sobrenadante de la placa previamente incubada al pocillo correspondiente de una nueva

placa de 96 pocillos en la que se habían añadido previamente 180 µl de reactivo QUANTI-Blue™.

Los resultados de este experimento se resumen en la **figura 9**, que ilustra tres actividades de inducción de citocinas (IFN de tipo I, IL-1 y TNF-α) para CDN fluorados representativos de la presente invención y para CDN de referencia relacionados. Los valores mostrados son promedios totales para los 20 donantes en el intervalo completo de concentraciones probado (30 µg/ml, 10 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,1 µg/ml y 0,03 µg/ml). La actividad de los CDN se expresa en términos de "concentración activa" (definida aquí como el CDN que proporciona un valor de intensidad de SEAP de al menos 0,5 a la concentración indicada), desde la más baja de las siete concentraciones probadas (0,03 µg/ml) hasta la concentración más alta probada (30 µg/ml). La figura revela dos hallazgos principales: en primer lugar, que dentro del intervalo de concentraciones probado, cada uno de los CDN probados induce cada una de las citocinas evaluadas; y, en segundo lugar, que para cada actividad de inducción de citocinas, cada CDN fluorado es más activo que su análogo no fluorado correspondiente (compárese CL603 con c-GAMP; CL614 con c-AIMP; y CL656 con c-AIMP[s]).

Ejemplo 2.6: Comparación de desoxirribo-CDN fluorados y ribo-CDN no fluorados por su resistencia a la escisión enzimática por SVPD o NP1, según lo supervisado por UHPLC-MS

- Enzimas usadas: fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD) y nucleasa P1 (NP1)
- CDN objeto probados: CL603, CL632, CL614 y CL656
- CDN de referencia (no fluorados) probados: c-GAMP y c-AIMP
- Propiedad evaluada: resistencia a la escisión enzimática

Se incubó cada CDN con una de las dos enzimas que se sabe que escinden ácidos nucleicos y CDN y después se buscaron señales de degradación por UHPLC a lo largo del tiempo, midiendo la disminución en el área del pico correspondiente al CDN (identificado según MS). Específicamente, se evaluó la resistencia de los CDN a la fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD) y la nucleasa P1 (NP1), ambas de las cuales pueden degradar los CDN al escindir los enlaces de nucleótidos de fosfodiéster. El experimento se realizó de la siguiente manera:

Cada CDN (7 µg) se incubó por separado con una solución (21 µl) de una de las enzimas (160 µg de SVPD en tampón de PBS que contenía MgCl₂ 0,6 mM; o 2,5 mU de NP1 en tampón de acetato 30 mM que contenía ZnCl₂ 2 mM [pH 5,3]) o con agua (como control) en un baño de agua a 37 °C. Se recogieron alícuotas de la mezcla de reacción en diversos puntos temporales de 0 a 120 horas, se calentaron a 100 °C durante 2 min y después se congelaron a 0 °C. Finalmente, se inyectaron 10 µl de cada alícuota directamente en la HPLC (Agilent 1290 Infinity UHPLC equipada con un detector UV; columna: Waters Acquity UPLC CSH C₁₈ 1,7 µm [2,1 mm x 50 mm; caudal: 0,3 ml/min]; detección a 254 nm; temperatura del automuestreador: 25 °C) para análisis. Se usó el siguiente gradiente: 100 % de A (formiato de amonio acuoso 10 mM) durante 1 minuto; después 100 % de A a 100 % de B (acetonitrilo) durante 5 minutos.

El porcentaje de absorbancia de CDN en cada punto temporal se calculó dividiendo el área de pico correspondiente al CDN original, entre la suma de todas las áreas de pico en el cromatograma y multiplicando después por 100.

Los resultados de este experimento se muestran en las **figuras 10 A-D**, que revelan dos hallazgos importantes: en primer lugar, que los desoxirribo-CDN fluorados de la presente invención son más resistentes a la degradación enzimática por cualquiera de las enzimas que sus correspondientes análogos de ribo-CDN no fluorados (en las figuras 10A y 10B, compárese CL656 o CL614 con c-AIMP y en las Figuras 10C y 10D, compárese CL603 o CL632 con c-GAMP); en segundo lugar; que entre los desoxirribo-CDN fluorados de la presente invención, los que contienen dos enlaces diéster de fosforotioato (CL656 y CL632) son más resistentes a SVPD que sus análogos correspondientes que contienen dos enlaces fosfodiéster (CL614 y CL603, respectivamente).

Ejemplo 2.7: Comparación de la actividad *in vitro* de desoxirribo-CDN fluorados y ribo-CDN no fluorados antes y después de la exposición de estos CDN a SVPD o NP1

- Líneas celulares indicadoras usadas: THP1-Dual™
- CDN objeto probados: CL603, CL632, CL614 y CL656
- CDN de referencia (no fluorados) probados: c-GAMP y c-AIMP
- Actividades evaluadas: Inducción de IFN de tipo I

En este experimento, cuatro desoxirribo-CDN fluorados representativos de la presente invención (CL603, CL632, CL614 y CL656) y sus análogos de ribo-CDN no fluorados correspondientes (c-GAMP y c-AIMP, respectivamente) se compararon por su estabilidad relativa a la escisión por dos enzimas de escisión de CDN conocidas: fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD) y nucleasa P1 (NP1). Se realizó como se describe a continuación.

Cada CDN (7 µg) se incubó con SVPD, NP1 o agua (como control), como se ha descrito en el Ejemplo 2.6, en un baño de agua a 37 °C durante 2 horas y después durante 10 minutos a 100 °C. Las soluciones resultantes se enfriaron hasta temperatura ambiente. Después, se incubó por separado una alícuota (20 µl) de cada solución con células THP1-Dual™ (180 µl; concentración: 100.000 células/pocillo), como se ha descrito en el Ejemplo 2.1. La

expresión de ISG54 (como indicador de la producción de IFN- α/β) se cuantificó con QUANTI-Luc™, como se ha explicado anteriormente.

5 Los resultados de este experimento se muestran en la **figura 11**, que revela dos hallazgos importantes: en primer lugar, antes de la incubación con cualquiera de las enzimas, o después de la incubación solo con agua (control), todos los CDN indujeron la expresión de ISG54 en las células; y, en segundo lugar, después de la incubación con cualquiera de las enzimas, las soluciones correspondientes a los ribo-CDN no fluorados perdieron por completo esta actividad, mientras que los correspondientes a los desoxirribo-CDN fluorados conservaron en gran medida esta actividad. Estos hallazgos indican que los desoxirribo-CDN fluorados son más resistentes a la escisión enzimática por SVPD o NP1 que sus riboanálogos no fluorados correspondientes.

Efectos de clase de los dinucleótidos desoxirribocíclicos fluorados

15 Los inventores determinaron que, en comparación con sus ribo-CDN no fluorados correspondientes, los desoxirribo-CDN fluorados de la presente invención presentan sorprendentemente efectos de clase únicos, no obvios y previamente no señalados que podrían aprovecharse para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico e investigación que implican la manipulación de la actividad de STING. Por ejemplo, los CDN fluorados son más activos, como han comprobado los inventores *in vitro* midiendo la inducción de citocinas en diferentes líneas celulares y en sangre entera. Por otra parte, se eliminan más lentamente *in vivo*, como han determinado los inventores en ratones. Por último, presentan resistencia superior a la escisión enzimática.

Referencias

Referencias de patente:

- 25 1. US 2015/0056224 A1
2. US 2014/0329889 A1
30 3. WO 2015/077354 A1
4. WO 2014/189805 A1

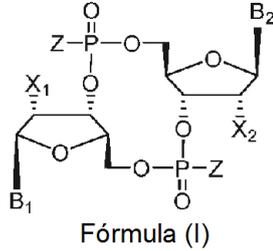
Referencias que no son patentes:

- 35 1. Ablasser, A., Goldeck, M., Caviar, T., Deimling, T., Witte, G., Rohl, I., Hornung, V. (2013). cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, 498(7454), 380-384.
2. Chen, H., Sun, H., You, F., Sun, W., Zhou, X., Chen, L., Jiang, Z. (2011). Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell*, 147(2), 436-446.
40 3. Chu, C. K. (2002). *Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy*: Elsevier.
4. Danilchanka, O., y Mekalanos, J. J. (2013). Cyclic dinucleotides and the innate immune response. *Cell*, 154(5), 962-970.
5. Diner, E. J., Burdette, D. L., Wilson, S. C., Monroe, K. M., Kellenberger, C. A., Hyodo, M., Vance, R. E. (2013). The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep*, 3(5), 1355-1361.
45 6. Dubensky, T. W., Jr., Kanne, D. B., y Leong, M. L. (2013). Rationale, progress and development of vaccines utilizing STING-activating cyclic dinucleotide adjuvants. *TherAdv Vaccines*, 1(4), 131-143.
7. Fensterl, V., White, C. L., Yamashita, M., y Sen, G. C. (2008). Novel characteristics of the function and induction of murine p56 family proteins. *J Virol*, 82(22), 11045-11053.
50 8. Gomelsky, M. (2011). cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all! *Mol Microbiol*, 79(3), 562-565.
9. Hecker, S. J., y Erion, M. D. (2008). Prodrugs of phosphates and phosphonates. *J Med Chem*, 51(8), 2328-2345.
10. Herdewijna, P. V. A. A. a. K. L. (1989). Synthesis of Nucleosides Fluorinated in the Sugar Moiety. The Application of Diethylaminosulfur Trifluoride to the Synthesis of Fluorinated Nucleosides. *Nucleosides and Nucleotides*, 8(1), 65-96.
11. Jones, R. B., N. (1995). Nucleotide prodrugs. *Antiviral Research*, 27(1-2), 1-17.
12. Li, L., Yin, Q., Kuss, P., Maliga, Z., Millan, J. L., Wu, H., y Mitchison, T. J. (2014). Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat Chem Biol*, 10(12), 1043-1048.
60 13. Rajagopalan, P. B., F. D; Chu, C. K.; Tennant, B. C; Baldwin, B. H. (2003). *Antiviral Nucleosides: Chiral Synthesis and Chemotherapy*: Elsevier.
14. Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Jarvinen, T., y Savolainen, J. (2008). Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov*, 7(3), 255-270.
15. Ross, B. S. S., R.H.; Sprankle, K.G.; y Vasquez, G. (1997). An Efficient and Scalable Synthesis of Arabinosylguanine and 2'-Deoxy-2'-Fluoro-guanosine. *Nucleosides and Nucleotides*, 16(7-9), 1645-1647.
65 16. Schinazi, R. F. L. D. C. (2004). *Frontiers in Nucleosides & Nucleic Acids*: IHL Press.

17. Shanahan, C. A., Gaffney, B. L., Jones, R. A., y Strobel, S. A. (2013). Identification of c-di-GMP derivatives resistant to an EAL domain phosphodiesterase. *Biochemistry*, 52(2), 365-377.
18. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., y Romling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, 53(4), 1123-1134.
- 5 19. Thomas, H. J., Tiwaria, K.N.; Clayton, S.J.; Secrist J.A.; y Montgomery J.A. (1994). Synthesis and Biologic Activity of Purine 2'-Deoxy-2'-fluoro-ribonucleosides. *Nucleosides and Nucleotides*, 13(1-3), 309-323.
20. Vorbruggen, H., y Ruh-Pohlentz, C. (2001). *Handbook of Nucleoside Synthesis*. Nueva York: Wiley.
21. Wuts, P. G. M., Greene, T. W., y Greene, T. W. (2014). *Greene's protective groups in organic synthesis* (quinta edición / ed.). Hoboken, Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- 10 22. Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Zhang, X., Sun, L., Chen, C., y Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell*, 51(2), 226-235.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de dinucleótido cíclico de Fórmula (I):



5

en la que:

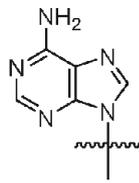
10

- X₁ es H o F;
- X₂ es H o F;
- Al menos uno entre X₁ y X₂ es un átomo de flúor;
- Z es OH, OR₁, SH o SR₁, en la que:

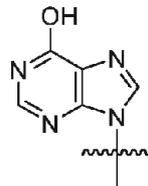
15

- i) R₁ es Na o NH₄, o
- ii) R₁ es un grupo lábil a enzimas que proporciona OH o SH *in vivo*, tal como pivaloiloximetilo;

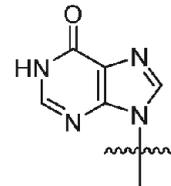
- B₁ y B₂ son bases seleccionadas entre:



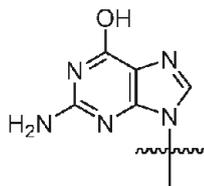
Adenina,



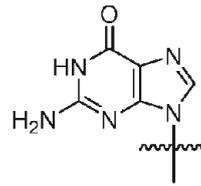
Hipoxantina o



20



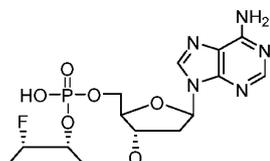
Guanina,



y B₁ es una base diferente de B₂,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

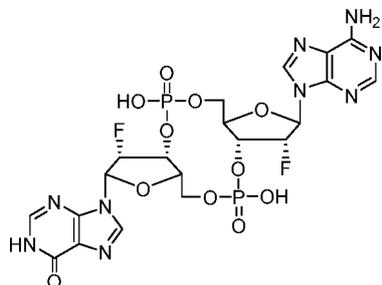
25

2. El dinucleótido cíclico de Fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho dinucleótido cíclico se selecciona entre los siguientes compuestos:



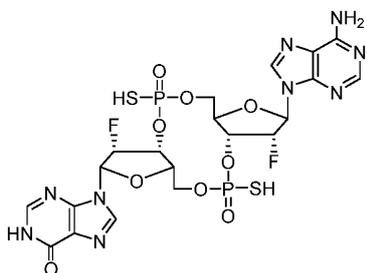
c-(dAMP-2'FdIMP)

CL609



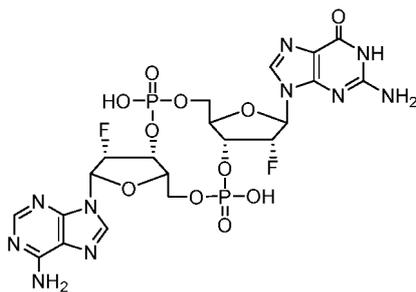
c-(2'FdAMP-2'FdIMP)

CL614



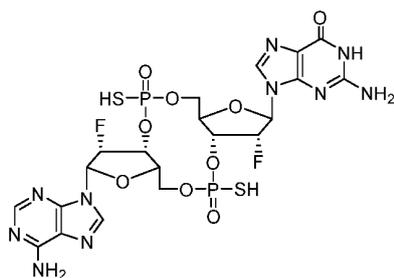
c-[2'FdAMP(S)-2'FdIMP(S)]

CL656



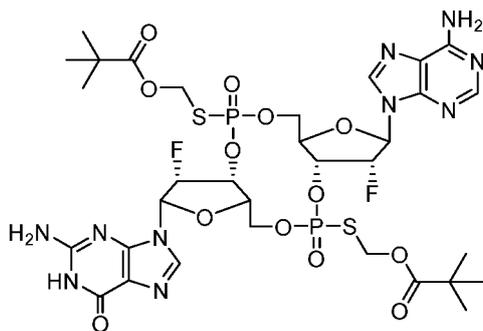
c-(2' FdGMP-2'FdAMP)

CL603



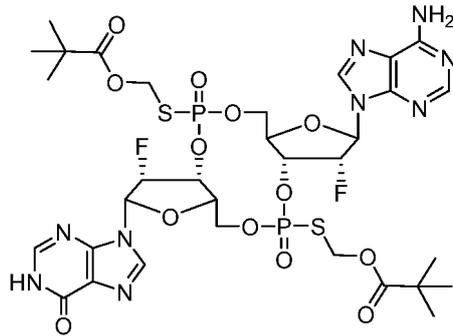
c-[2' FdGMP(S)-2'FdAMP(S)]

CL632



c-[2'FdGMP(S)-2'FdAMP(S)](POM)₂

CL633



c-[2'FdAMP(S)-2'FdIMP(S)](POM)₂

CL659.

3. El dinucleótido cíclico de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho dinucleótido cíclico es un agonista del receptor denominado "estimulador de genes de interferón" (STING).
- 5 4. Una composición farmacéutica que comprende un dinucleótido cíclico de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Un dinucleótido cíclico de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en un tratamiento terapéutico en seres humanos o animales.
- 10 6. Un dinucleótido cíclico de fórmula (I) para su uso según la reivindicación 5 en el tratamiento de un cáncer, en particular tumores pancreáticos sólidos, una infección bacteriana o una infección vírica.
7. Un dinucleótido cíclico de fórmula (I) para su uso según la reivindicación 5 como adyuvante de vacuna.
- 15 8. Un kit de partes que comprende un dinucleótido cíclico de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un agente quimioterapéutico para su uso en el tratamiento de tumores pancreáticos sólidos.
9. El kit de partes según la reivindicación 8, en donde dicho agente quimioterapéutico es gemcitabina.
- 20

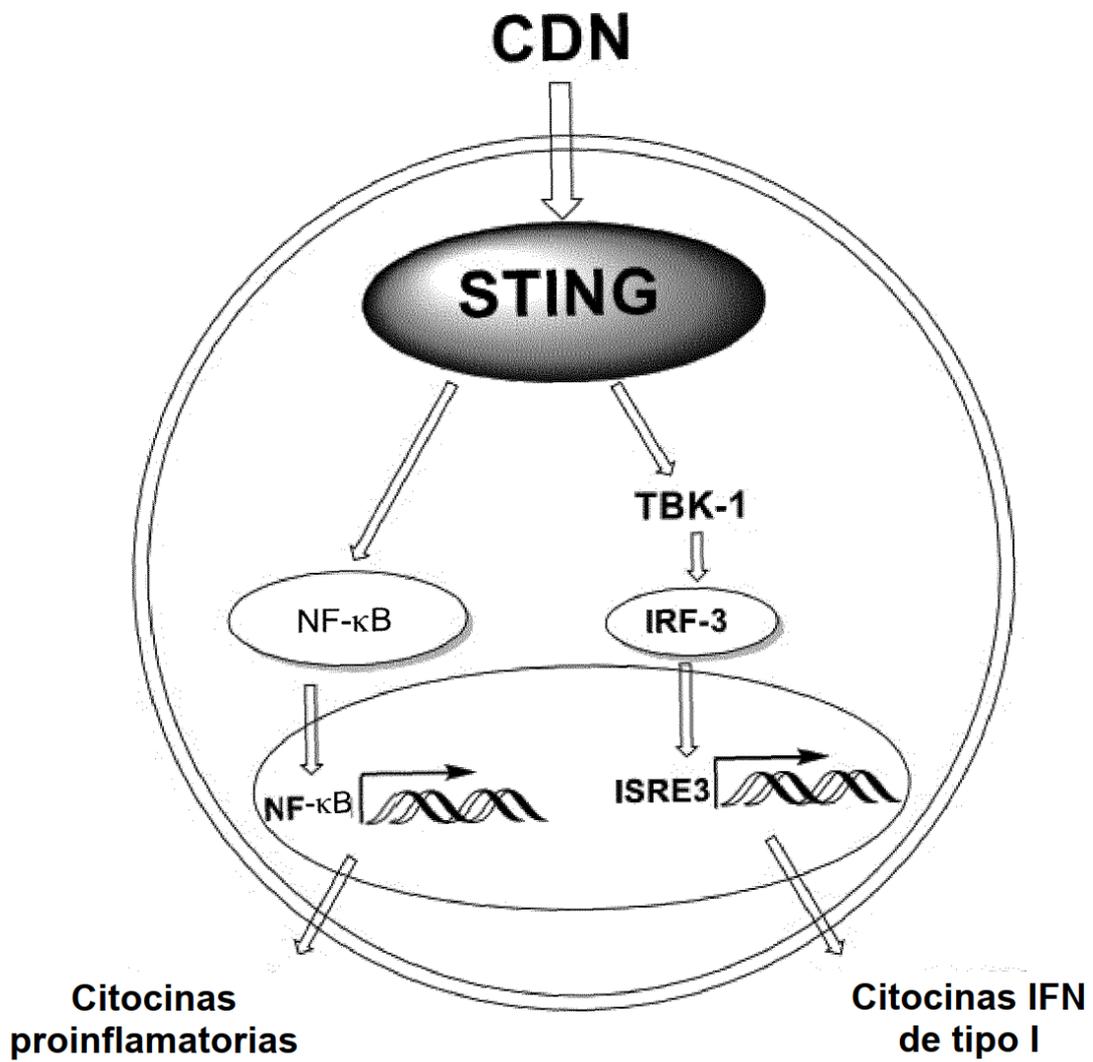


FIGURA 1

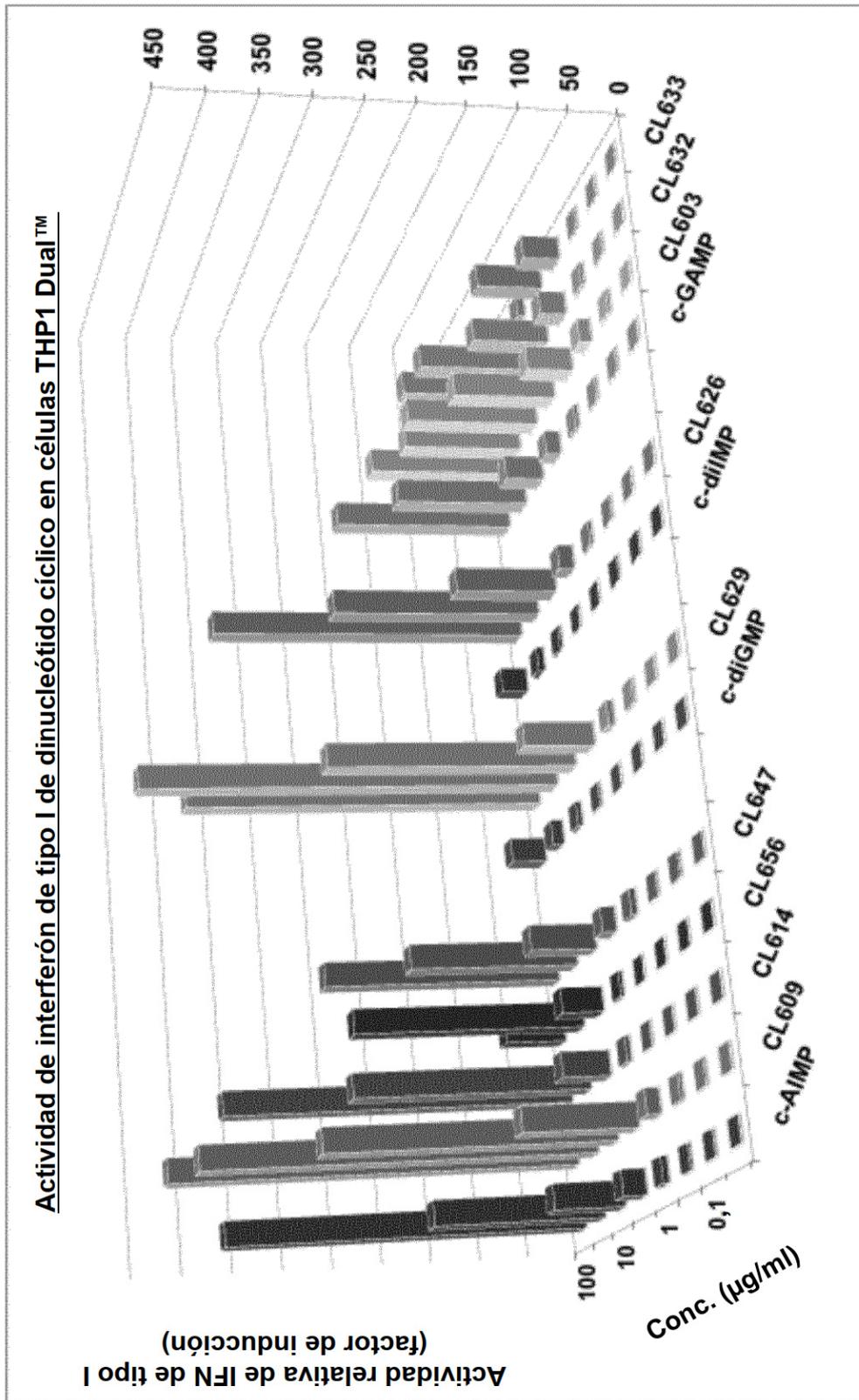


FIGURA 2

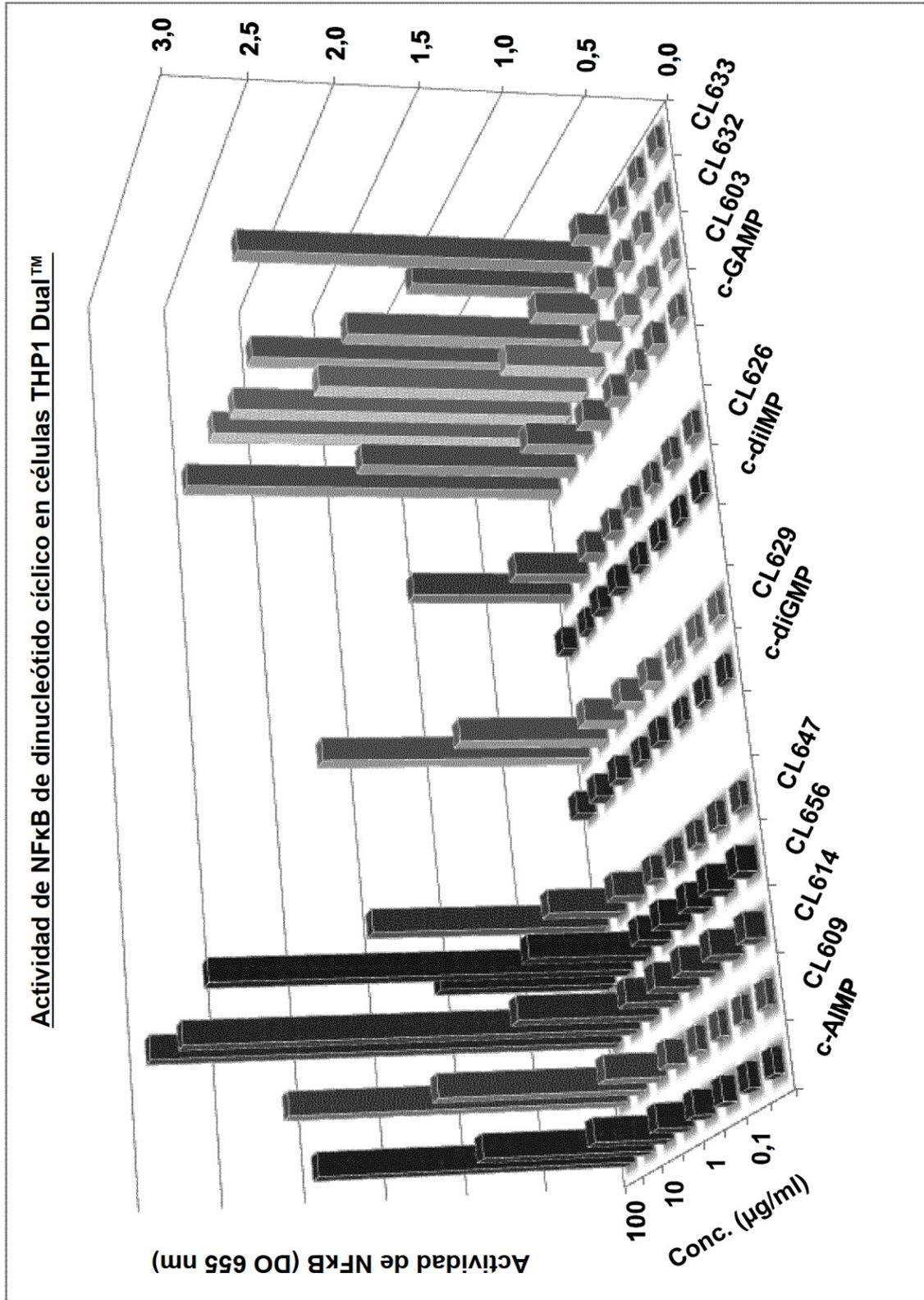


FIGURA 3

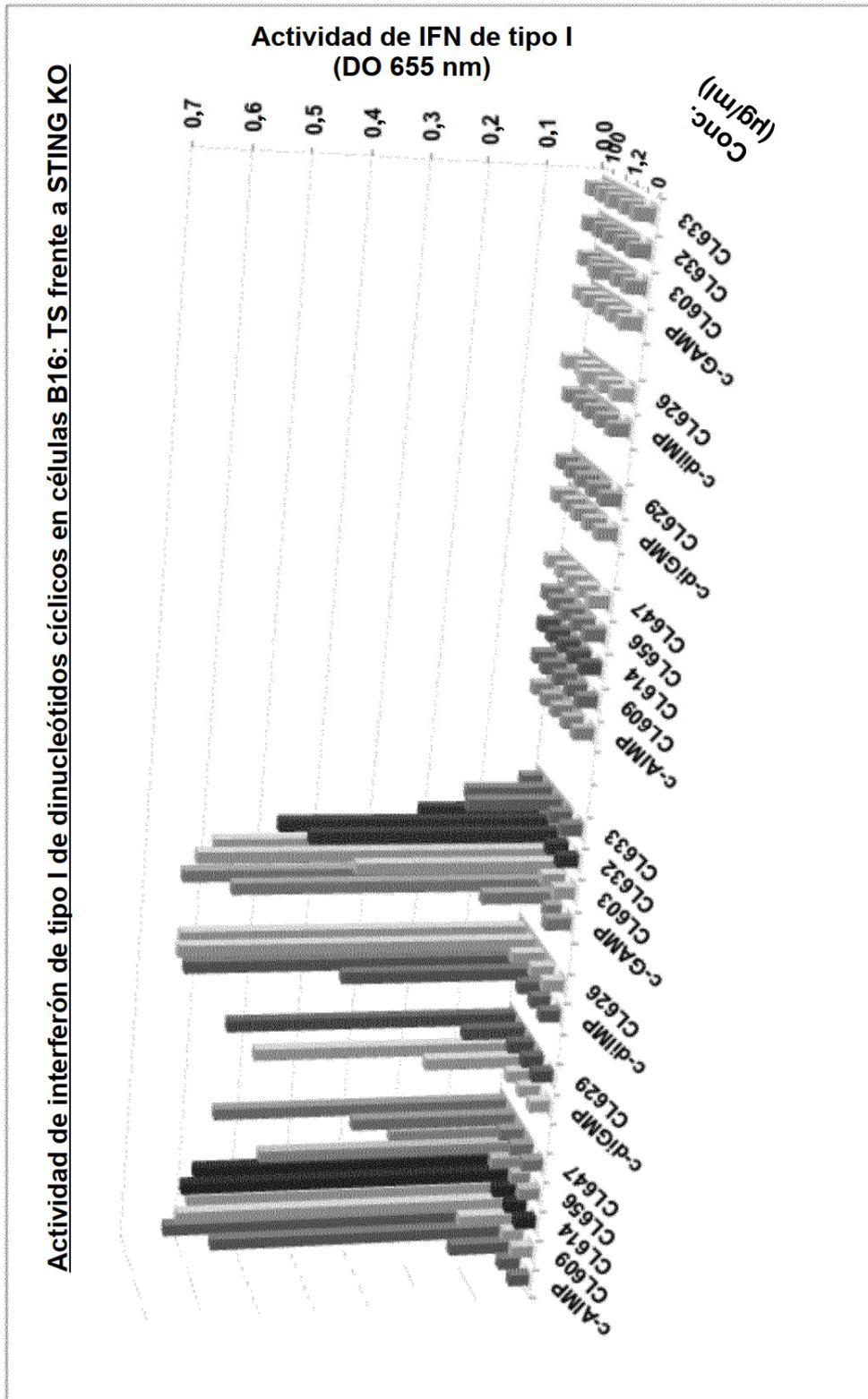


FIGURA 4

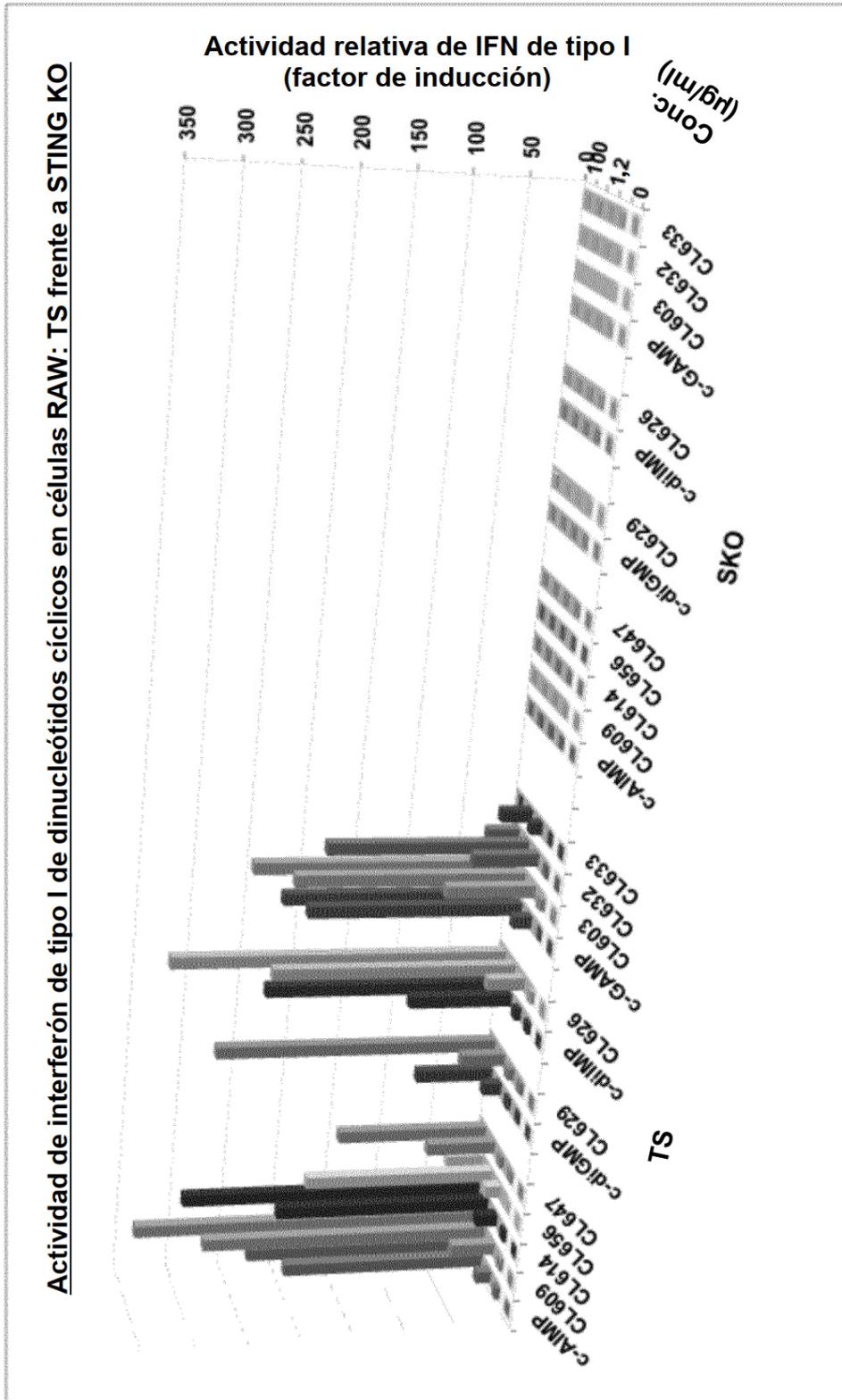


FIGURA 5

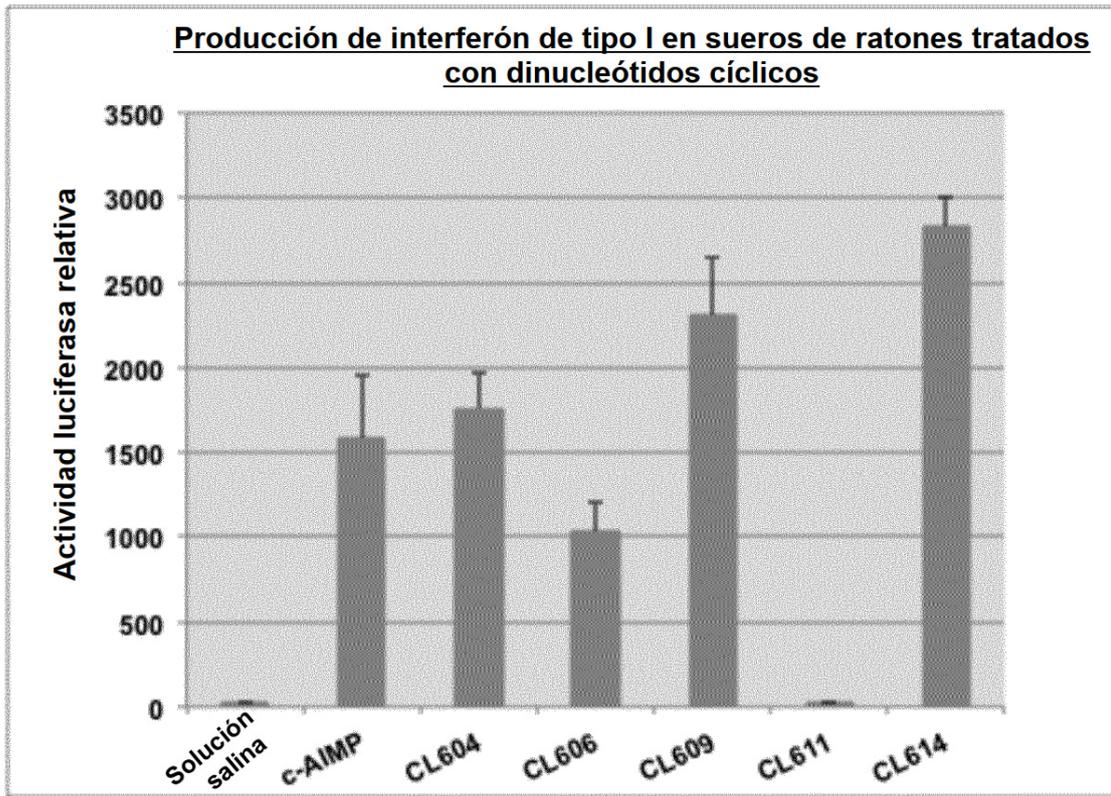


FIGURA 6

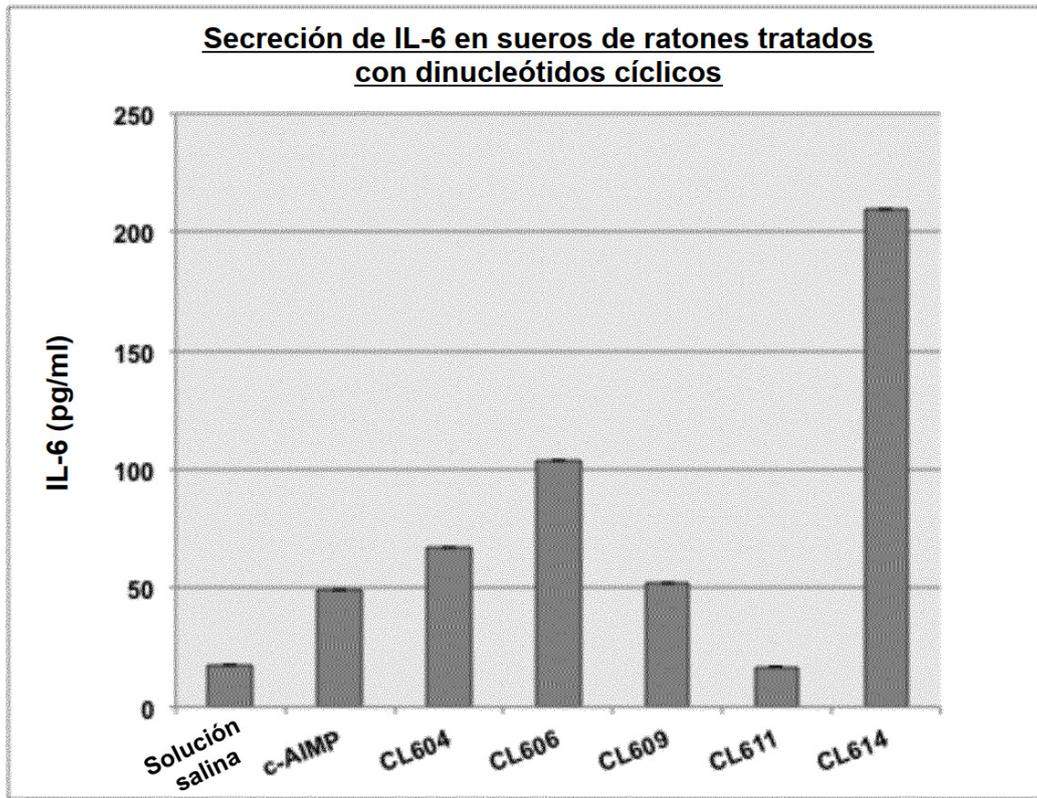


FIGURA 7

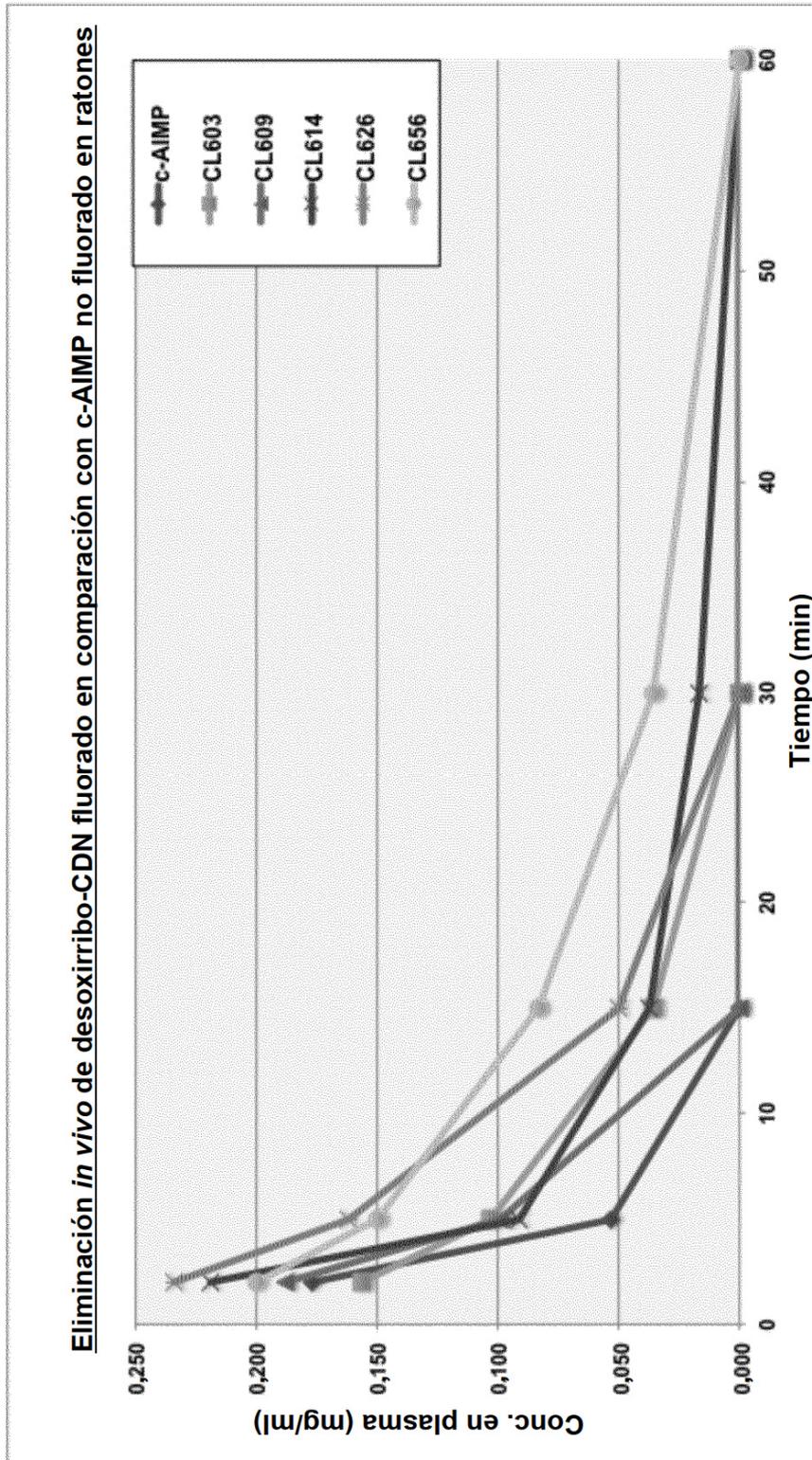


FIGURA 8

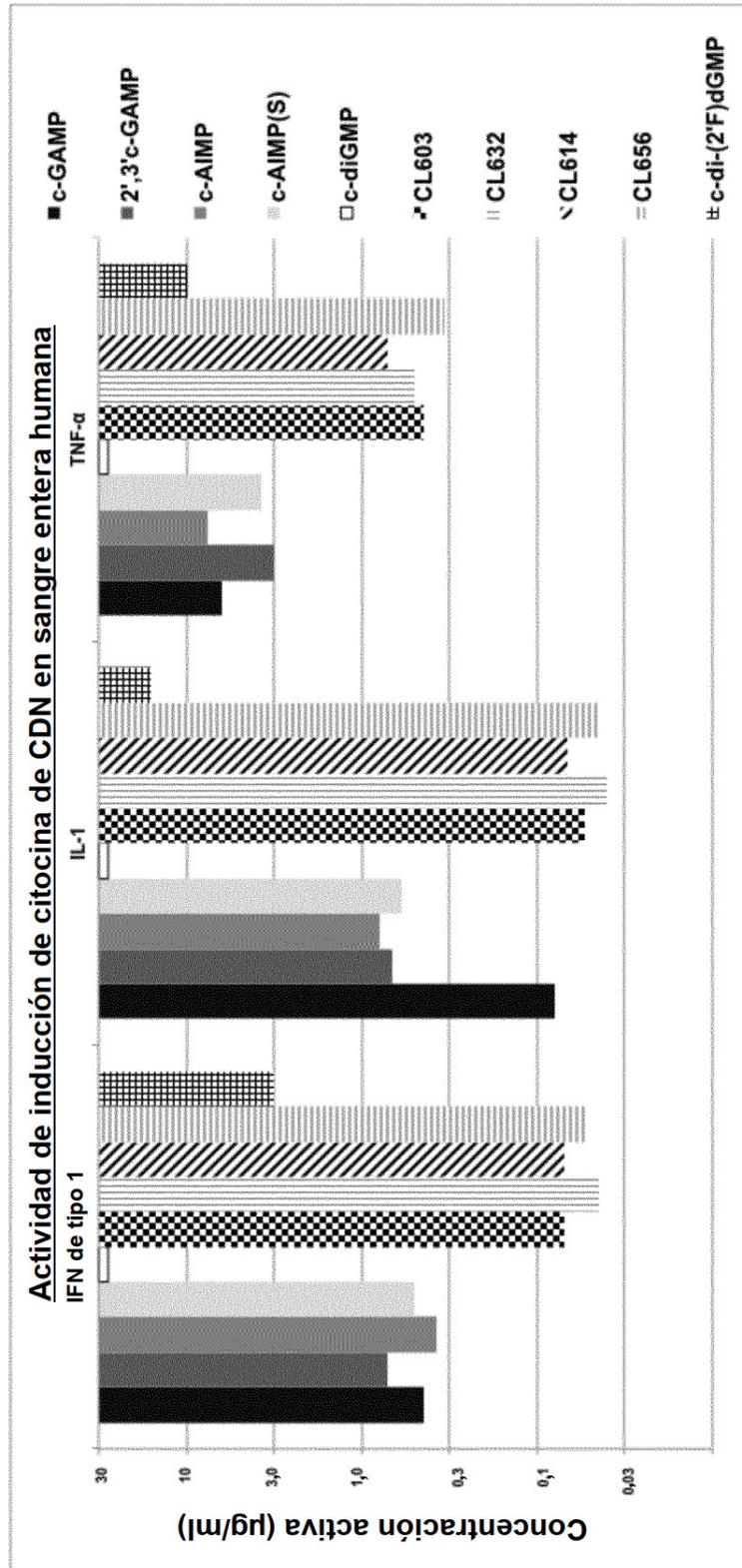


FIGURA 9

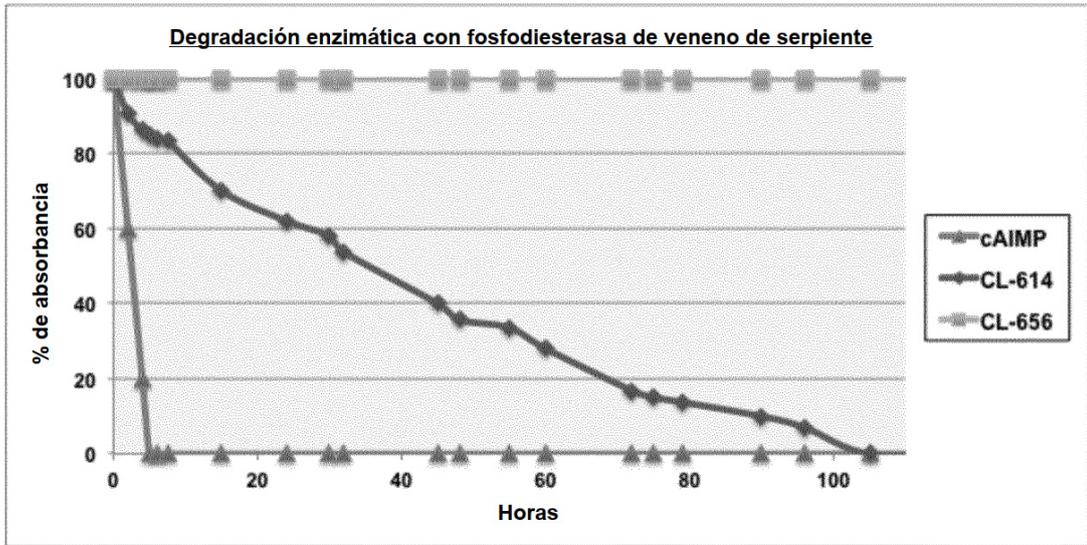


FIGURA 10A

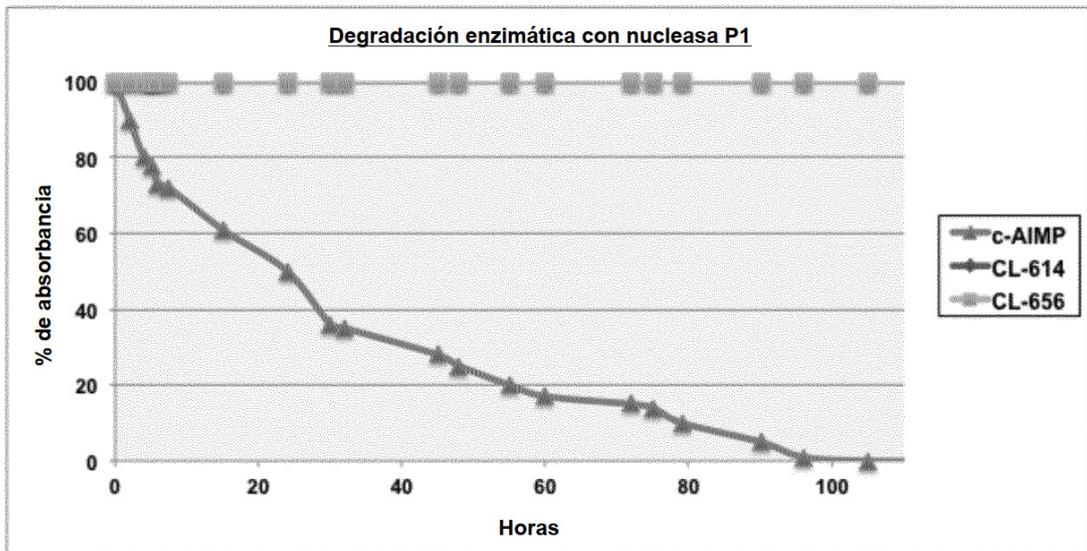


FIGURA 10B

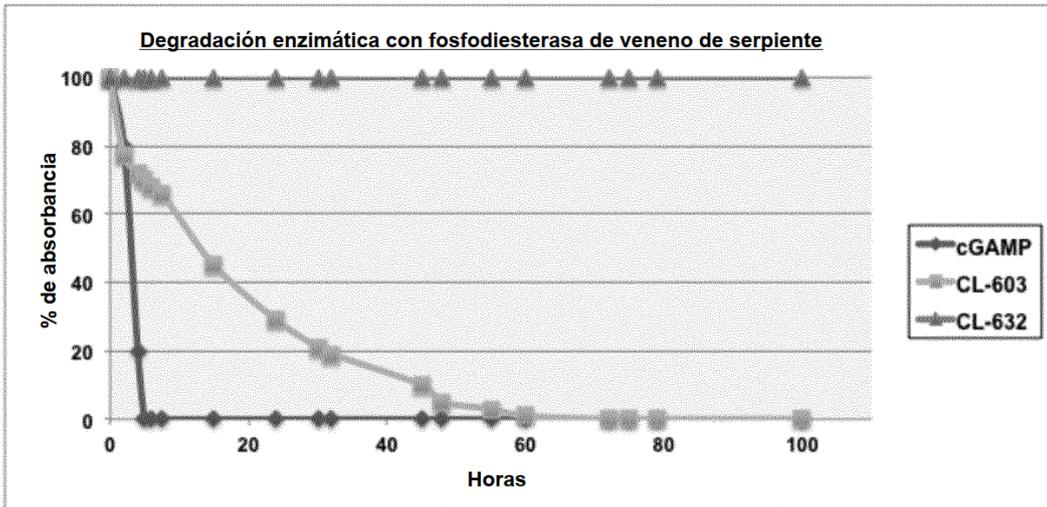


FIGURA 10C

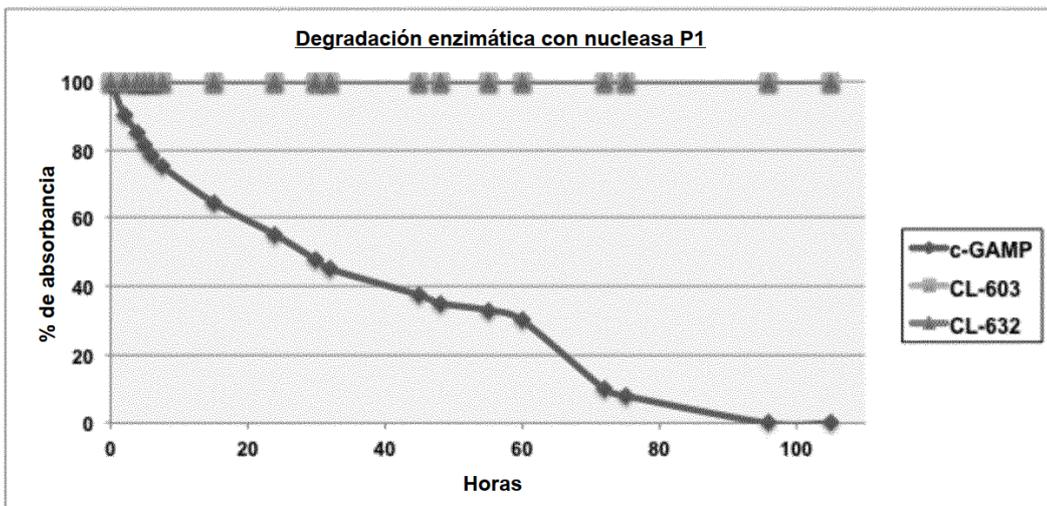


FIGURA 10D

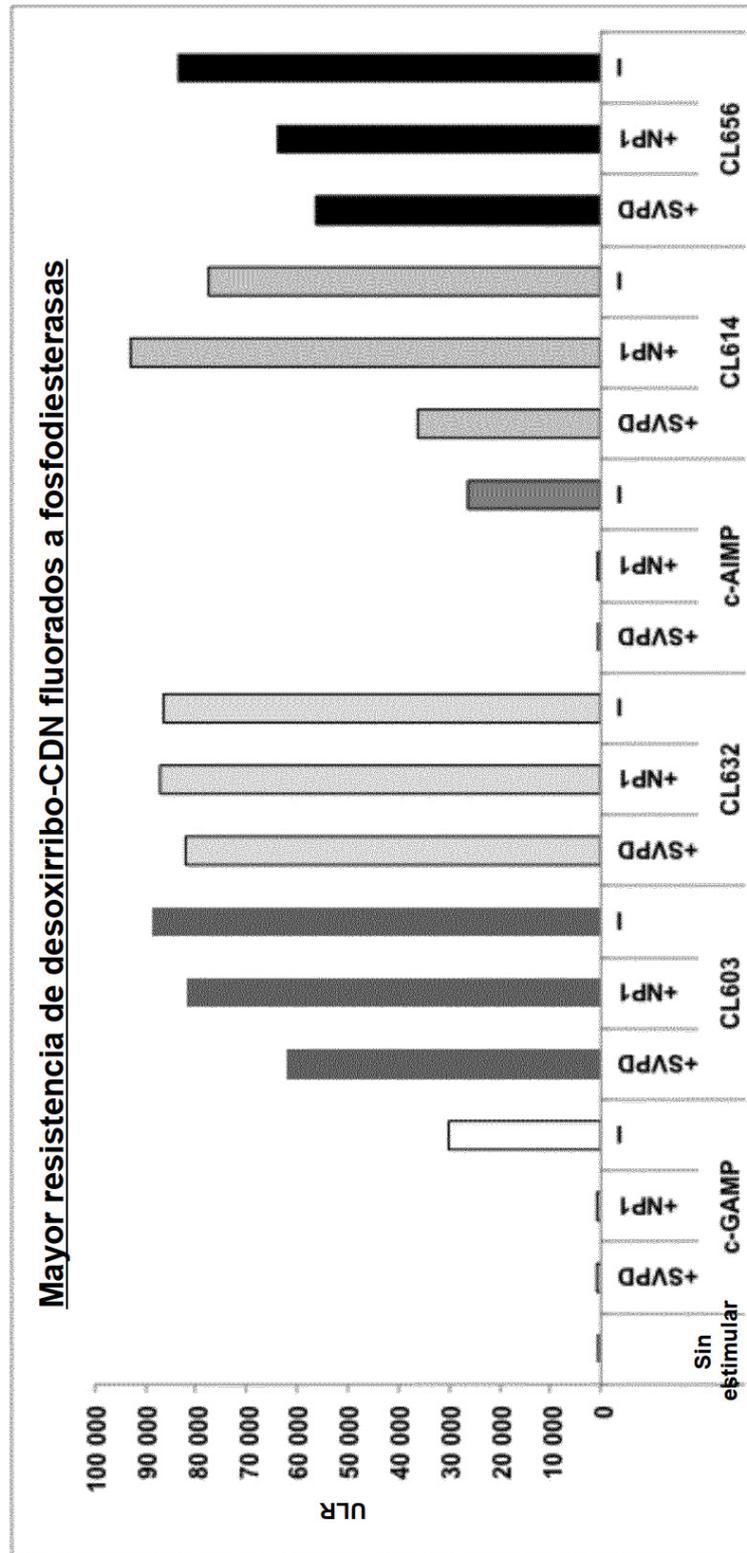


FIGURA 11