



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 542**

51 Int. Cl.:
C07D 411/04 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04018075 .4**
86 Fecha de presentación : **19.04.1995**
87 Número de publicación de la solicitud: **1473294**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2004**

54 Título: **1,3-oxatíolanos sustituidos con propiedades antivirales.**

30 Prioridad: **20.04.1994 US 230317**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **Shire BioChem Inc.**
2250, Boul. Alfred-Nobel Bur. 500
Ville St-Laurent, Québec H4S 2C9, CA

72 Inventor/es: **Mansour, Tarek S. y**
Jin, Haolun

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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).

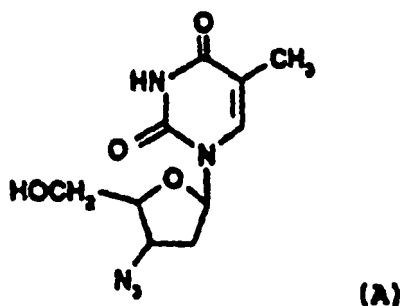
DESCRIPCIÓN

1,3-oxatíolanos sustituidos con propiedades antivirales.

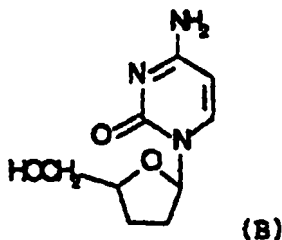
La presente invención se refiere a compuestos de 1,3-oxatíolano sustituidos novedosos que tienen actividad farmacológica, a composiciones farmacéuticas que los contienen, y al uso de estos compuestos en el tratamiento antiviral de mamíferos.

Las infecciones retrovirales son una causa grave de enfermedad, de la manera más notable, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha reconocido como el agente etiológico del SIDA. Se están buscando activamente compuestos que tienen un efecto inhibitor sobre la multiplicación del VIH o eficaces de otra manera en el tratamiento de las infecciones retrovirales.

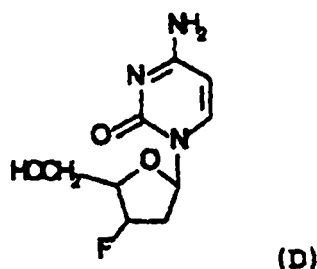
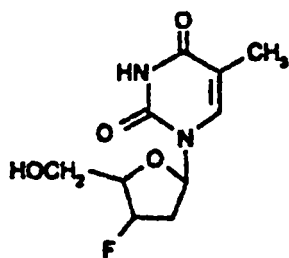
H. Mitsuya *et al.*, "3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, págs. 7096-7100 (1985), hace referencia a la 3'-azido-3'-desoxitimidina de fórmula (A), denominada comúnmente AZT. Se dice que este compuesto es útil para proporcionar alguna protección para los portadores de SIDA frente al efecto citopatógeno del virus de la inmunodeficiencia (VIH).



H. Mitsuya y S. Broder, "Inhibition of the *in vitro* infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, págs. 1911-15 (1986), han hecho también referencia a un grupo de 2',3'-didesoxinucleósidos mostrados en la fórmula (B) que se dice que tienen una actividad protectora frente a la citopatogenicidad inducida por VIH.



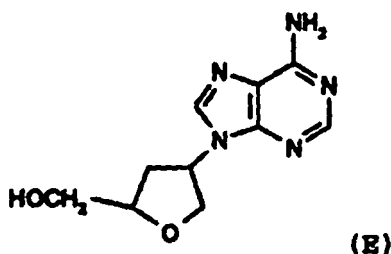
P. Herdewijn *et al.*, "3'-Substituted 2',3'-dideoxynucleoside analogues as potential anti-HIV (HTLV-III/LAV) agents", J. Med. Chem., 30, págs. 1270-1278 (1987), describen la actividad anti-VIH de una serie de análogos de nucleósidos 3'-sustituidos. Aunque los análogos 3'-fluoro de la 3'-desoxitimidina y 2',3'-didesoxicitidina mostrados en las fórmulas (C) y (D) se encuentra que tienen una actividad antirretroviral potente, los sustituyentes unidos al 3'-carbono por medio de un puente de oxígeno o tio no dieron productos activos.



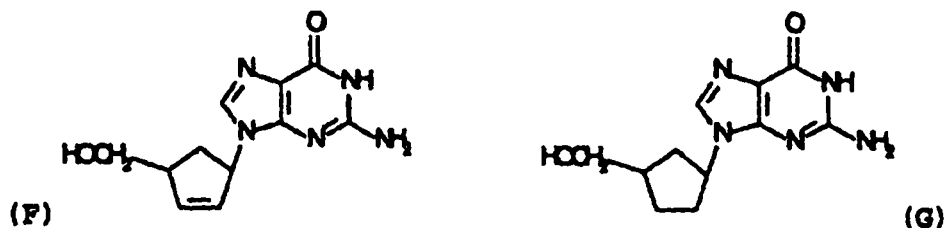
Los análisis de los estudios de conformación molecular en P. Van Roey *et al.*, "Correlation between preferred sugar ring conformation and activity of nucleoside analogues against human immunodeficiency virus", Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 86(10), págs. 3929-3933 (1989), indican que los análogos de nucleósido anti-VIH activos tiene conformaciones de 3'-carbono en el lado opuesto a la base.

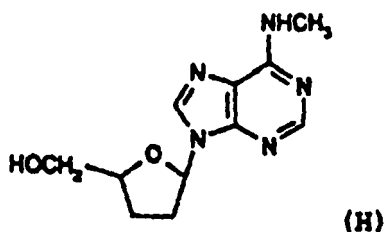
D. Huryn *et al.*, "Synthesis of iso-ddA, member of a novel class of anti-HIV agents", Tetrahedron Lett., 30(46), págs. 6259-6262 (1989), hacen referencia al análogo de isonucleósido de fórmula (E) como un inhibidor estable de la duplicación del VIH.



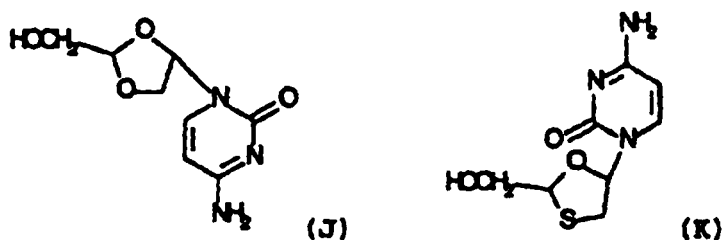
R. Vince y M. Hua, "Synthesis and anti-HIV activity of carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy 2,6-disubstituted purine nucleosides", J. Med. Chem., 33(1), págs. 17-21 (1990), describen los análogos mostrados en las fórmulas (F) y (G) como que tienen actividad anti-VIH. El análogo (F) insaturado muestra una mayor selectividad y potencia como inhibidor de la duplicación del VIH que el análogo (G) saturado.



C. Chu *et al.*, "Synthesis and structure-activity relationships of 6-substituted 2',3'-dideoxypurine nucleosides as potential anti-human immunodeficiency virus agents", J. Med. Chem., 33(6), págs. 1553-1561 (1990), describen el derivado N6-metilo mostrado en la fórmula (H) como que tiene una mayor potencia frente al VIH que la 2',3'-didesoxiadenosina no metilada.



Finalmente, B. Belleau *et al.*, "Design and activity of a novel class of nucleoside analogues effective against HIV-1", Abstracts of papers, Quinta Conferencia Internacional sobre el SIDA, Montreal, T.C.O. 1, pág. 515 (1989), hacen referencia a los dioxolanos y oxatolanos de fórmulas (J) y (K) como que tiene una actividad anti-VIH potente.



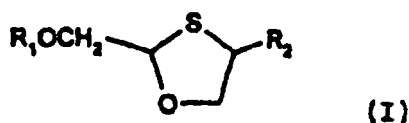
Se ha encontrado que el isómero *cis* de fórmula (K) es activo frente a VIH y VHB, y se ha encontrado que su enantiómero no natural ((2R,5S *cis*) denominado "el enantiómero (-)" tiene sorprendentemente una toxicidad baja. Llamado ahora lamivudina o "3TCTM", este nuevo fármaco antiviral se está convirtiendo en el tratamiento de elección para la politerapia de pacientes con SIDA y para el tratamiento único de pacientes con VHB.

Aunque se ha encontrado que la lamivudina (3TCTM) es un compuesto extremadamente interesante en la práctica clínica, siempre existe la posibilidad de que el paciente desarrolle cepas de virus que sean resistentes a ella tras periodos de tratamiento prolongados. Por tanto, existe todavía la necesidad de desarrollar agentes antivirales que sean activos frente a las cepas virales resistentes a nucleósidos, en particular, frente a cepas virales resistentes a 3TCTM.

Sumario de la invención

Se ha encontrado que las clases de compuestos conocidos como 1,3-oxatíolanos 2-sustituidos 4-sustituidos tienen una actividad antiviral potente. En particular, se ha encontrado que estos compuestos actúan como inhibidores potentes de la duplicación del VIH-1 en los linfocitos T durante un periodo de tiempo prolongado con menores efectos secundarios citotóxicos que los compuestos conocidos en la técnica. Se ha encontrado también que estos compuestos son activos frente a las cepas de VIH resistentes a 3TC. Estos compuestos también son útiles para la profilaxis y el tratamiento de infecciones por virus de la hepatitis B.

Por consiguiente se proporciona en un primer aspecto de esta invención un enantiómero simple de compuestos de fórmula (I) en la configuración *cis*:



en la que

R₁ es hidrógeno,

R₂ es citosina o 5-fluorocitosina, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, “una sal, éster o sal de tal éster farmacéuticamente aceptable”, de un compuesto de fórmula (I) o cualquier otro compuesto que, tras su administración al receptor, puede proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de fórmula (I) o un metabolito antiviralmente activo o un residuo del mismo.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, p-toluensulfónico, tartárico, acético, cítrico, metansulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftalen-2-sulfónico y bencensulfónico. Otros ácidos tales como el oxálico, aunque no son en sí farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), de amonio y de N-(alquilo C₁₋₄)₄⁺.

Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos de fórmula (I) pueden modificarse para proporcionar sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, en grupos funcionales tanto en el resto citosina como en el grupo hidroximetilo del anillo de oxatíolano. La modificación de todos los grupos funcionales de este tipo se incluye dentro del alcance de la invención. Sin embargo, son de interés particular las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, ésteres o ésteres de aminoácidos) obtenidos mediante la modificación del grupo 2-hidroximetilo del anillo de oxatíolano.

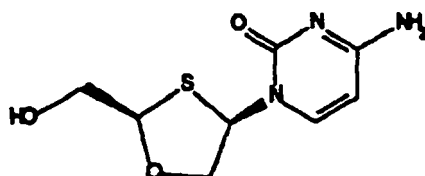
Los ésteres preferidos de los compuestos de fórmula (I) incluyen los compuestos en los que R₁ está sustituido por una función carbonilo R-(CO) en la que el resto R no carbonilo de la agrupación éster se selecciona de hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, t-butilo, n-butilo), alcoxilalquilo (por ejemplo, metoximetilo), aralquilo (por ejemplo, bencilo), ariloxialquilo (por ejemplo, fenoximetilo), arilo (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C₁₋₄ o alcoxilo C₁₋₄); dihidropiridinilo sustituido (por ejemplo, N-metildihidropiridinilo); ésteres de sulfonato tales como alquil o aralquilsulfonilo (por ejemplo, metansulfonilo); ésteres de sulfato; ésteres de aminoácido (por ejemplo, L-valilo o L-isoleucilo) y ésteres de mono, di o trifosfato.

También se incluyen dentro del alcance de tales ésteres los ésteres derivados de ácidos polifuncionales tales como los ácidos carboxílicos que contienen más de un grupo carboxilo, por ejemplo, ácidos dicarboxílicos HO₂C(CH₂)_nCO₂H en los que n es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, ácido succínico) o ácidos fosfóricos. Se conocen bien los métodos para preparar tales ésteres. Véase, por ejemplo, E. Hahn *et al.*, “Nucleotide dimers as anti-human immunodeficiency virus agents”, Nucleotide Analogues As Antiviral Agents, J.C. Martin, Ed. Symposium Serie n° 401, American Chemical Society, págs. 156-159 (1989) y M. Busso *et al.*, “Nucleotide dimers suppress HIV expression *in vitro*”, AIDS Research and Human Retroviruses, 4(6), págs.449-455 (1988).

ES 2 286 542 T3

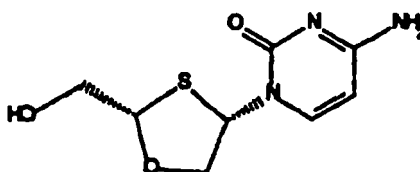
Los compuestos específicos de fórmula (I) incluyen:

Compuesto n° 1:



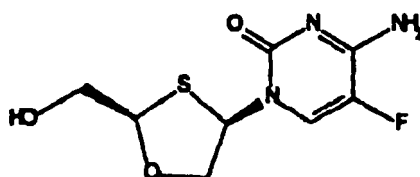
2R-hidroxiometil-4R-(citosin1'-il)-1,3-oxatolano;

Compuesto n° 2:



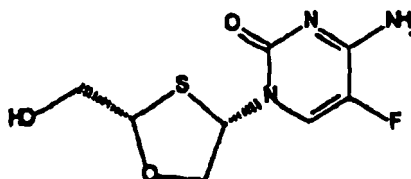
2S-hidroxiometil-4S-(citosin1'-il)-1,3-oxatolano;

Compuesto n° 3:



2R-hidroxiometil-4R-(5'-fluorocitosin1'-il)-1,3-oxatolano; y

Compuesto n° 4



2S-hidroxiometil-4S-(5'-fluorocitosin1'-il)-1,3-oxatolano;

y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En los procedimientos para preparar los compuestos de esta invención, se usan las definiciones siguientes:

R₂ es citosina o 5-fluorocitosina;

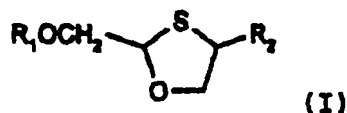
R_w es hidrógeno, sililo trisustituido, alquilo C₁₋₆, aralquilo tal como bencilo o tritilo, acilo C₁₋₁₆, preferiblemente un benzoilo o un benzoilo sustituido en cualquier posición con al menos un halógeno (bromo, cloro, fluoro o yodo), alquilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆, nitro, o grupo triluorometilo;

R_x es alquilo C₁₋₆; y

L es un “grupo saliente”, es decir, un átomo o grupo que puede desplazarse tras la reacción con una base apropiada, con o sin un ácido de Lewis. Los grupos salientes adecuados incluyen grupos aciloxilo, grupos alcoxilo, por ejemplo, grupos alcoxycarbonilo tales como etoxycarbonilo; halógenos tales como yodo, bromo, cloro, o fluoro; amido; azido; isocianato; tiolatos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, tales como tiometilo o tiofenilo; compuestos de selenio o selenino saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, tales como seleniuro de fenilo o seleniuro de alquilo; y cetonas alifáticas o aromáticas, saturadas o insaturadas, sustituidas o no sustituidas, tales como metil cetona.

Un grupo saliente adecuado también puede ser -OR, en el que R es un grupo alquilo saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, por ejemplo, grupo alquenilo o alquilo C₁₋₆; un grupo acilo alifático o aromático, sustituido o no sustituido, por ejemplo, un grupo acilo alifático C₁₋₆ tal como acetilo y un grupo acilo aromático tal como benzoylo; un grupo alcoxi- o ariloxycarbonilo saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, tal como carbonato de metilo y carbonato de fenilo; sulfonilimidazolidina sustituida o no sustituida; grupo aminocarbonilo alifático o aromático sustituido o no sustituido, tal como carbamato de fenilo; grupo imidato de alquilo sustituido o no sustituido tal como tricloroacetamidato; fosfonatos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, tales como fosfonato de dietilo; grupo sulfonilo alifático o aromático sustituido o no sustituido, tal como tosilato; o hidrógeno.

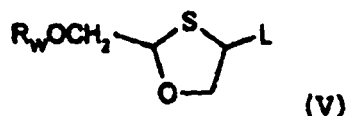
Los compuestos de oxatiolano de fórmula (I),



25

y sales y ésteres, farmacéuticamente aceptables, pueden prepararse según los procedimientos tratados en el presente documento o mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la preparación de compuestos de estructura análoga. El compuesto de esta invención puede producirse mediante los procedimientos descritos por Mansour *et al.*, “Anti-Human Immunodeficiency Virus and Anti-Hepatitis-B Virus Activities and Toxicities of the Enantiomers of 2’-Deoxy-3’-oxa-4’-thiacytidine and Their 5-Fluoro Analogues *in vitro*”, J. Med. Chem., 1995, vol. 38, n° 1, págs. 1-4, que se incorpora al presente documento por referencia.

En un procedimiento de este tipo para producir los oxatiolanos de esta invención, un compuesto de fórmula (V),

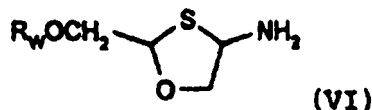


40

en la que Rw es hidrógeno o un grupo protector del hidroxilo y L es un átomo o grupo desplazable, es decir, un grupo saliente, se hace reaccionar con una base apropiada.

45

En un segundo procedimiento para producir oxatiolanos de esta invención, un compuesto de fórmula (VI)



50

puede convertirse en un compuesto de fórmula (I) mediante la conversión del grupo NH₂ anomérico en la base requerida mediante procedimientos bien conocidos en la técnica de la química de los nucleósidos.

55

Los 1,3-oxatiolanos de fórmula (I) también pueden prepararse, por ejemplo, mediante la reacción de un aldehído de fórmula (VII)

60



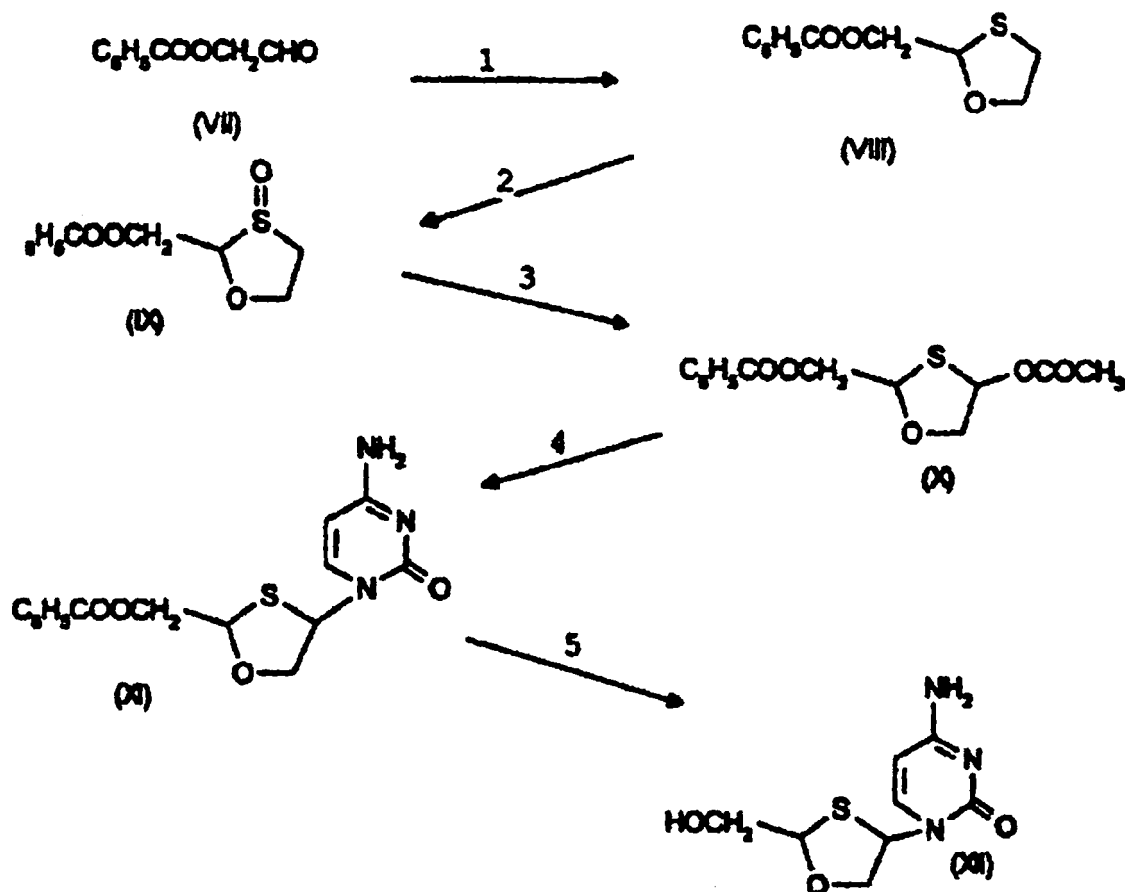
con 2-mercaptoetanol en un disolvente orgánico compatible seguido de transposiciones de Pummerer tal como se conoce en la técnica (T. Durst, “Dimethylsulfoxide in Organic Synthesis”, Adv. Org. Chem., E.C. Taylor y B. Wynberg, Eds., 6, págs. 356-365(1969)) para dar los 1,3-oxatiolanos de fórmula (V), que se convierten en los 1,3-oxatiolanos de fórmula (I) mediante procedimientos conocidos en la técnica de la química de los nucleósidos.

65

Otro procedimiento para preparar los 1,3-oxatiolanos de fórmula (I) se ilustra en el esquema 1.

Las diversas etapas implicadas en la síntesis de los 1,3-oxatíolanos de fórmula (I) tal como se ilustra en el esquema 1 pueden describirse brevemente tal como sigue:

Esquema 1



Etapa 1

Se condensa el benzoiloxiacetaldehído de fórmula (VII) o cualquier aldehído de fórmula $\text{R}_w\text{OCH}_2\text{CHO}$ (C.D. Hurd y E.M. Filiachione, "A new approach to the syntheses of aldehyde sugars", J. Am. Chem. Soc., 61, págs. 1156-1159 (1939)) con un mercaptoalcohol tal como 2-mercaptoetanol en un disolvente orgánico compatible, tal como tolueno, que contiene una cantidad catalítica de un ácido fuerte para dar el producto intermedio mostrado en la fórmula (VIII).

Etapa 2

Se oxida entonces el 1,3-oxatíolano de fórmula (VIII) con un perácido tal como ácido monoperoxiftálico de magnesio en un disolvente orgánico compatible tal como cloruro de metileno que contiene una sal tal como bromuro de tetrabutilamonio para dar el producto intermedio de sulfóxido mostrado en la fórmula (IX).

Etapa 3

Se trata el producto intermedio de sulfóxido mostrado en la fórmula (IX) con un anhídrido de ácido tal como anhídrido acético o cualquier otro anhídrido de fórmula $(\text{R}_x\text{CO})_2\text{O}$ en presencia de un tampón tal como acetato de tetra-n-butilamonio para dar el 1,3-oxatíolano 2,4-disustituido de fórmula (X) (T. Durst, Adv. Org. Chem., 6, págs. 356-365 (1969)).

Etapa 4

Se hace reaccionar entonces el 1,3-oxatíolano de fórmula (X) con una base de pirimidina o un análogo de la misma, (por ejemplo, citosina) sililada previamente con, por ejemplo, hexametildisilazano en un disolvente compatible usando un ácido de Lewis o triflato de trimetilsililo para dar el producto intermedio de fórmula (XI) como isómeros *cis* y *trans*. Pueden separarse los isómeros, preferiblemente mediante cromatografía, para dar (XI) *cis* puro y (XI) *trans* puro.

Etapa 5

Se hidroliza la función benzoato del compuesto de fórmula (XI) (isómero *cis* o *trans*), usando una base tal como amoníaco metanólico para obtener el compuesto mostrado en la fórmula (XII) como isómero *cis* o *trans*, preferiblemente a presión, para dar el producto mostrado en

Muchas de las reacciones en los procedimientos descritos anteriormente se han notificado ampliamente en el contexto de la síntesis de nucleósidos de pirimidina, por ejemplo, en L.B. Townsend, "Synthesis and reaction of pyrimidine nucleoside", Chemistry of Nucleoside and Nucleotides vol. 1, Eds., Plenum Press, Nueva York (1989) en las páginas 1-95, cuyo texto se incorpora al presente documento por referencia.

En el procedimiento descrito anteriormente, los compuestos de fórmula (I) se obtienen generalmente como una mezcla de los isómeros *cis* y *trans*.

Los isómeros *cis* y *trans* pueden separarse, por ejemplo, mediante acetilación, por ejemplo, con anhídrido acético seguido de separación mediante medios físicos, por ejemplo, cromatografía sobre gel de sílice y desacetilación, por ejemplo, con amoníaco metanólico o mediante cristalización fraccional.

Por tanto, la resolución del producto final, o un producto intermedio o material de partida puede efectuarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica: véase por ejemplo, Stereochemistry of Carbon Compounds, de E.L. Eliel (McGraw Hill, 1962) y Tables of Resolving Agents, de S.H. Wilen.

Cuando el compuesto de fórmula (I) se desea como un enantiómero simple, puede obtenerse o mediante la resolución de la mezcla de los dos enantiómeros *cis* (mediante HPLC quiral) o bien mediante la síntesis estereoespecífica a partir de material de partida isométricamente puro o cualquier producto intermedio conveniente. Así, puede obtenerse el compuesto de fórmula (I) o cualquier compuesto intermedio conveniente mediante HPLC quiral usando una fase estacionaria adecuada, por ejemplo β -ciclodextrina acetilada o triacetato de celulosa y un disolvente adecuado, por ejemplo un alcohol tal como etanol o una disolución acuosa tal como acetato de trietilamonio. Como alternativa, el compuesto de fórmula (I) o cualquier compuesto intermedio conveniente puede resolverse mediante catabolismo enantioselectivo mediado por enzima con una enzima adecuada tal como citidina desaminasa o degradación enzimática selectiva de un derivado adecuado usando una 5'-nucleotidasa, por ejemplo véase Storer *et al.*, "The resolution and Absolute Stereochemistry of the Enantiomers of *cis*-1[2(Hydroxomethyl)-1,3-Oxathiolan-5-yl]Cytosine (BCH-189): Equipotent Anti-HIV Agents", Nucleosides & Nucleotides, 12(2), 225-236 (1993). Cuando la resolución se efectúa enzimáticamente, la enzima puede emplearse o en disolución o en forma inmovilizada. Las enzimas en forma inmovilizada se conocen en la técnica por ejemplo, mediante absorción sobre una resina tal como Eupergit.

Se apreciará que las reacciones de los procedimientos descritos anteriormente pueden requerir la utilización de, o convenientemente pueden aplicarse a, materiales de partida que tienen grupos funcionales protegidos, y por tanto puede requerirse una desprotección como una etapa intermedia o final para dar el compuesto deseado. La protección y desprotección de grupos funcionales puede efectuarse usando medios convencionales. Así, por ejemplo, los grupos amino pueden protegerse mediante un grupo seleccionado de aralquilo (por ejemplo, bencilo), acilo o arilo (por ejemplo, 2,4-dinitrofenilo); efectuándose la eliminación posterior del grupo protector cuando se desee mediante hidrólisis o hidrogenólisis según sea apropiado usando condiciones estándar. Los grupos hidroxilo pueden protegerse usando cualquier grupo protector de hidroxilo convencional, por ejemplo, tal como se describe en "Protective Groups in Organic Chemistry", Ed. J.F.W. McOmie (Plenum Press, 1973) o "Protective Groups in Organic Synthesis" de Theodora W. Greene (John Wiley and Sons, 1981) que se incorpora al presente documento por referencia. Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo adecuados incluyen grupos seleccionados de alquilo (por ejemplo, metilo, *t*-butilo o metoximetilo), aralquilo (por ejemplo, bencilo, difenilmetilo o trifenilmetilo), grupos heterocíclicos tales como tetrahidropiraniilo, acilo, (por ejemplo, acetilo o benzoilo) y grupos sililo tales como trialkilsililo (por ejemplo, *t*-butildimetilsililo). Los grupos protectores de hidroxilo pueden eliminarse mediante técnicas convencionales. Así, por ejemplo, los grupos alquilo, sililo, acilo y heterocíclicos pueden eliminarse mediante solvolisis, por ejemplo, mediante hidrólisis en condiciones ácidas o básicas. Los grupos aralquilo tales como trifenilmetilo pueden eliminarse de manera similar mediante solvolisis, por ejemplo, mediante hidrólisis en condiciones ácidas. Los grupos aralquilo tales como bencilo pueden separarse, por ejemplo, mediante tratamiento con BF_3 /eterato y anhídrido acético seguido de la eliminación de los grupos acetato así formados en una fase apropiada de la síntesis. Los grupos sililo también pueden eliminarse convenientemente usando una fuente de iones fluoruro tales como fluoruro de tetra-*n*-butilamonio.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención pueden prepararse tal como se describe en la patente estadounidense nº 4.383.114, cuya descripción se incorpora al presente documento por referencia. Así, por ejemplo, cuando se desea preparar una sal de adición de ácido de un compuesto de fórmula (I), puede convertirse el producto de cualquiera de los procedimientos anteriores en una sal mediante el tratamiento de la base libre resultante con un ácido adecuado usando procedimientos convencionales. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden prepararse haciendo reaccionar la base libre con un ácido apropiado opcionalmente en presencia de un disolvente adecuado tal como un éster (por ejemplo, acetato de etilo) o un alcohol (por ejemplo, metanol, etanol o isopropanol). Las sales básicas inorgánicas pueden prepararse haciendo reaccionar la base libre con una base adecuada tal como un alcóxido (por ejemplo, metóxido de sodio) opcionalmente en presencia de un disolvente tal como un alcohol (por ejemplo, metanol). Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden prepararse a partir de otras

sales, incluyendo otras sales farmacéuticamente aceptables, de los compuestos de fórmula (I) usando procedimientos convencionales.

Un compuesto de fórmula (I) puede convertirse en un fosfato u otro éster farmacéuticamente aceptable mediante la reacción con un agente de fosforilación, tal como POCl_3 , o un agente de esterificación adecuado, tal como un anhídrido o haluro de ácido, según sea apropiado. Un éster o sal de un compuesto de fórmula (I) puede convertirse en el compuesto original, por ejemplo, mediante hidrólisis.

Los compuestos de la invención tienen actividad antiviral. En particular estos compuestos son eficaces para inhibir la duplicación del virus de la hepatitis B y retrovirus, incluyendo retrovirus humanos tales como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del SIDA.

Se proporciona por tanto como otro aspecto de la invención un compuesto de fórmula (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como agente terapéutico activo, en particular como agente antiviral, por ejemplo en el tratamiento de la hepatitis B viral e infecciones retrovirales tales como infección por VIH.

También se proporciona en otro aspecto o aspecto alternativo de esta invención, el uso de un compuesto de fórmula (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección viral.

Tales infecciones virales pueden ser, en particular infecciones por VIH y VHB.

En otro aspecto o aspecto alternativo se proporciona un procedimiento para el tratamiento de una infección viral, en particular una infección provocada por el virus de la hepatitis B o un retrovirus tal como VIH, en un mamífero, incluyendo el hombre, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto antiviral de fórmula (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de la invención también son útiles para el tratamiento de estados relacionados con el SIDA tales como complejo relacionado con el SIDA (CRS), linfadenopatía generalizada persistente (LGP), estados neurológicos relacionados con el SIDA (tales como demencia), estados de anticuerpos anti-VIH positivos y VIH-positivos, sarcoma de Kaposi, púrpura trombocitopénica e infecciones oportunistas.

Los compuestos de la invención son también útiles para la prevención o evolución de una enfermedad clínica de individuos que son anticuerpo anti-VIH o antígeno VIH positivos y para la profilaxis tras la exposición al VIH.

Los compuestos de fórmula (I) o las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, también pueden usarse para la prevención de la contaminación viral de fluidos biológicos tales como sangre o semen *in vitro*.

Se apreciará por los expertos en la técnica que las referencias en el presente documento al tratamiento se extienden a la profilaxis así como al tratamiento de las infecciones o síntomas establecidos.

Se apreciará además que la cantidad de un compuesto de la invención requerida para su uso en el tratamiento variará no sólo con el compuesto particular seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose y la edad y el estado del paciente y estará en última instancia a discreción del médico adjunto o veterinario. En general, sin embargo, una dosis adecuada estará en el intervalo desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal por día, tal como de 3 mg a aproximadamente 120 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferiblemente en el intervalo de 6 mg/kg/día a 90 mg/kg/día, lo más preferiblemente en el intervalo de 15 mg/kg/día a 60 mg/kg/día.

La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

El compuesto se administra convenientemente en una forma de dosificación unitaria; por ejemplo que contiene de 10 mg a 1500 mg, convenientemente de 20 mg a 1000 mg, lo más convenientemente de 50 mg a 700 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria.

De manera ideal el principio activo debe administrarse para conseguir concentraciones en plasma máximas del principio activo desde aproximadamente 1 μM hasta 75 μM , preferiblemente de manera aproximada de 2 μM a 50 μM , lo más preferiblemente de manera aproximada de 3 μM a aproximadamente 30 μM . Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa de una disolución a del 0,1% al 5% del principio activo, opcionalmente en solución salina, o administrada como un bolo que contiene de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 110 mg/kg del principio activo. Pueden mantenerse niveles sanguíneos deseables mediante una infusión continua para proporcionar de aproximadamente 0,01 mg/kg/hora a aproximadamente 5,0 mg/kg/hora o mediante infusiones intermitentes que contienen de aproximadamente 0,4 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg del principio activo.

Aunque es posible que, para su uso en el tratamiento, pueda administrarse un compuesto de la invención como el producto químico puro, es preferible presentar el principio activo como una formulación farmacéutica.

Por tanto, la invención proporciona además una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables del mismo y, opcionalmente, otros componentes terapéuticos y/o profilácticos. El/Los vehículo(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no nocivo para el receptor del mismo.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para su administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para su administración mediante inhalación o insuflación. Las formulaciones pueden presentarse, cuando sea apropiado, convenientemente en unidades de dosificación diferenciadas y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar el compuesto activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y entonces, si es necesario, conformar el producto para dar la formulación deseada.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para su administración oral pueden presentarse convenientemente como unidades diferenciadas tales como cápsulas, cáchets o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad pre-determinada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una disolución; como una suspensión; o como una emulsión. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para su administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes o agentes humectantes. Los comprimidos pueden recubrirse según procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en la forma de, por ejemplo, elixires, jarabes, emulsiones, disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

Los compuestos según la invención también pueden formularse para su administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo inyección en bolo o inyección continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringuillas rellenas previamente, infusión de volumen pequeño o en recipiente de dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenida mediante el aislamiento aséptico del sólido estéril o mediante liofilización a partir de la disolución, para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógeno, antes de su uso.

Para su aplicación tópica a la epidermis, los compuestos según la invención pueden formularse como pomadas, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Las pomadas y cremas puede formularse, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y en general contendrán también uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, o agentes colorantes.

Las formulaciones adecuadas para su administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tales como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones farmacéuticamente adecuadas para su administración rectal en las que el vehículo es un sólido, se representan lo más preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados comúnmente en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante el mezclado del compuesto activo con el/los vehículo(s) reblandecido(s) o fundido(s) seguido de enfriamiento y conformado en moldes.

Las formulaciones adecuadas para su administración vaginal pueden presentarse como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen además del principio activo, tales vehículos que se conocen en la técnica como apropiados.

Para la administración intranasal los compuestos de la invención pueden usarse como un pulverizador líquido o polvo dispersable o en la forma de gotas.

Las gotas pueden formularse con una base acuosa o no acuosa que comprende también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los pulverizadores líquidos se administran convenientemente desde envases presurizados.

Para su administración mediante inhalación, los compuestos según la invención se administran convenientemente a partir de un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otro medio conveniente de administración de un pulverizador de aerosol. Los envases presurizados pueden contener un propelente adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un

aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.

5 Como alternativa, para su administración mediante inhalación o insuflación, los compuestos según la invención pueden tomar la forma de una composición en polvo seca, por ejemplo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. La composición en polvo seca puede presentarse en forma de dosificación unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, gelatina o envases tipo blister desde los que puede administrarse el polvo con ayuda de un inhalador o insuflador.

10 Cuando se desee, pueden emplearse las formulaciones descritas anteriormente adaptadas para dar la liberación sostenida del principio activo.

Las composiciones farmacéuticas según la invención también pueden contener otros principios activos tales como agentes antimicrobianos, o conservantes.

15 Los compuestos de la invención también pueden usarse en politerapia para evitar la producción de cepas virales resistentes.

20 En particular, los compuestos de la invención también pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, otros agentes antiinfecciosos. En particular los compuestos de la invención pueden emplearse junto con agentes antivirales conocidos.

25 Por tanto, la invención proporciona, en otro aspecto, una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o un derivado fisiológicamente aceptable del mismo junto con otro agente terapéuticamente activo, en particular, un agente antiviral.

30 Los agentes terapéuticos adecuados para su uso en tales combinaciones incluyen análogos de nucleósido tales como 3TCTM, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-didesoxicitidina (ddC), 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxiinosina (ddI), 3'-desoxitimidina, 2',3'-didesoxi-2',3'-didehidrotimidina, y 2',3'-didesoxi-2',3'-didehidrocitidina y ribavirina; nucleósidos acíclicos tales como aciclovir, ganciclovir, interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; inhibidores de la glucuronación tales como probenecid; inhibidores del transporte de nucleósidos tales como dipiridamol; inmunomoduladores tales como interleucina II (IL2) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), eritropoyetina, ampligen, timomodulina, timopentina, foscarnet, inhibidores de la glucosilación tales como 2-desoxi-D-glucosa, castanospermina, 1-desoxinojirimicina; e inhibidores de la unión del VIH a receptores CD4 tales como CD4 soluble, fragmentos de CD4, moléculas híbridas de CD4 e inhibidores de la aspartil proteasa de VIH tales como L-735,524.

35 Otros agentes terapéuticos adecuados para su uso en tales combinaciones incluyen también inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos tales como revirapina, TIBO, HEPT, BHAP, MKC-422, α -APA, TSAO, calanolidas, y L-697,661.

Preferiblemente, el otro agente terapéutico se selecciona de: 3TCTM, AZT, ddC y ddI.

45 Los componentes individuales de tales combinaciones pueden administrarse secuencial o bien simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas.

50 Las combinaciones a las que se hace referencia anteriormente pueden presentarse convenientemente para su uso en forma de una formulación farmacéutica y por tanto las formulaciones farmacéuticas que comprenden una combinación tal como se definió anteriormente con un vehículo farmacéuticamente aceptable de las mismas comprenden otro aspecto de la invención.

55 Cuando el compuesto de fórmula (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo se usa en combinación con un segundo agente terapéutico activo frente al mismo virus, la dosis de cada compuesto puede ser la misma o bien diferir de aquella cuando el compuesto se usa solo. Las dosis apropiadas se apreciarán fácilmente por los expertos en la técnica.

60 Se apreciará adicionalmente que la cantidad de un compuesto de la invención y la cantidad del otro agente terapéutico requerido para su uso en el tratamiento variarán no sólo con el compuesto particular de la invención y el otro agente terapéutico seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose y la edad y el estado del paciente y estará en última instancia a discreción del médico adjunto o veterinario. En general, sin embargo, una dosis adecuada del compuesto de la invención estará en el intervalo desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal por día, tal como de 3 mg a aproximadamente 120 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferiblemente en el intervalo de 6 mg/kg/día a 90 mg/kg/día, lo más preferiblemente en el intervalo de 15 mg/kg/día a 60 mg/kg/día. Una dosis adecuada del otro agente terapéutico estará en el intervalo desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal por día, tal como de 3 mg a aproximadamente 120 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferiblemente en el intervalo de 6 mg/kg/día a 90 mg/kg/día, lo más preferiblemente en el intervalo de 15 mg/kg/día a 60 mg/kg/día.

ES 2 286 542 T3

La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

La invención se describirá adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Todas las temperaturas están en grados Celsius.

Ejemplos

Ejemplo 1

Benzoiloxiacetaldehído



Se preparó este producto intermedio conocido mediante la adición por porciones de NaIO_4 (80 g) a una mezcla de 1-benzoilglicerol (50 g), CH_2Cl_2 (500 ml), y H_2O (25 ml) con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Se agitó la disolución resultante durante 2 horas, se añadió MgSO_4 (100 g) y se agitó la disolución durante otros 30 minutos. Se filtró la mezcla, se evaporó el filtrado a vacío y se destiló el residuo a vacío para dar 26 g de producto puro.

p.e. 92-94°/0,25 mm

^1H RMN (200 MHz; TMS como referencia interna):

8 (ppm en CDCl_3)

9,71 (s, 1H; -CHO)

8,11 (d, 2H; -aromático)

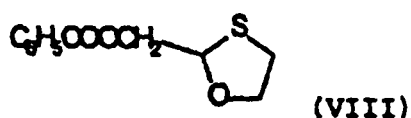
7,60 (m, 1H; aromático)

7,46 (m, 2H; aromático)

4,88 (s, 2H; $-\text{CH}_2\text{CHO}$)

Ejemplo 2

2-Benzoiloximetil-1,3-oxatiolano



Se calentó una mezcla de benzoiloxiacetaldehído (ejemplo 1) (6,21 g), 2-mercaptoetanol (3 ml) y ácido para-toluensulfónico (0,2 g) en tolueno (150 ml) durante 3 horas a reflujo en condiciones de eliminación de agua usando un aparato Dean Stark. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente, se lavó en primer lugar con disolución de NaHCO_3 acuosa (1 x 50 ml), y después con agua (2,5 ml) y se secó sobre MgSO_4 . Se filtró la disolución y se evaporó el filtrado a presión reducida. Se purificó el residuo sobre gel de sílice usando hexano:acetato de etilo (9:1) como eluyente. Dio 7,63 g (90%) de producto puro, que se identificó mediante ^1H - y ^{13}C -RMN.

R_f : 0,39 (hexano:acetato de etilo)

^1H -RMN: δ (ppm en CDCl_3)

8,03 (m, 2H, aromático)

7,53 (m, 1H, aromático)

7,39 (m, 2H, aromático)

5,41 (dd, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$)

4,43 (m, 2H, $\text{C}_2\text{-CH}_2\text{OCC}_6\text{H}_5$)

ES 2 286 542 T3

4,21 (m, 1H, C₅-H)

3,96 (m, 1H, C₅-H)

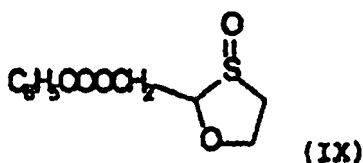
2,98 (m, 2H, C₄-H)

¹³C-RMN: δ (ppm en CDCl₃)

166,82, 133,74, 130,35, 128,97, 83,58, 71,87, 66,62 y 32,74

Ejemplo 3

2-Benzoiloximetil-3-oxo-1,3-oxatolano



Se añadió sal de magnesio del ácido monoperoxiftálico (MMPP, 28 g) por porciones con agitación vigorosa a una mezcla de 2-benzoiloximetil-1,3-oxatolano (ejemplo 2) (20 g), bromuro de tetrabutilamonio (0,4 g) en cloruro de metileno (200 ml), y agua (200 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos y se recogió la fase orgánica. Se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (3 x 75 ml) y se lavó la fase orgánica combinada en primer lugar con agua (2 x 100 ml), después con disolución de salmuera (100 ml), se secó sobre MgSO₄, y se filtró. Se evaporó el filtrado a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente para dar 18,5 g (86%) de producto puro como una mezcla de isómeros *cis* y *trans* en una proporción de 1:2 respectivamente.

m.p.: 70-72°

¹H-RMN: δ (ppm en CDCl₃)

8,05 (m, 2H, aromático, isómero *cis*)

7,95 (m, 2H, aromático, isómero *trans*)

7,56 (m, aromático)

7,23 (m, aromático)

4,77 (m, 4H, C₂-H, C₅-H, y C₂-CH₂OOC-C₆H₅)

4,43 (m, 1H, C₅-H, isómero *trans*)

4,09 (m, 1H, C₅-H, isómero *cis*)

3,11 (m, 2H, C₄-H, isómero *trans*)

2,75 (m, 2H, C₄-H, isómero *cis*)

¹³C-RMN: δ (ppm en CDCl₃)

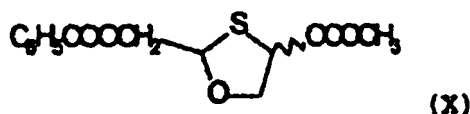
isómero *cis*:

166,64, 134,02, 130,42, 129,88, 129,06, 96,16, 68,83, 59,47 y 54,30

isómero *trans*:

166,36, 134,12, 130,29, 129,68, 129,15, 108,07, 70,09, 61,83 y 53,47

Ejemplo 4

2-Benzoiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatriolano

10 Se calentó una mezcla de 2-benzoiloximetil-3-oxo-1,3-oxatriolano (ejemplo 3) (10,5 g), acetato de tetra-n-butilammonio (17 g) en anhídrido acético (250 ml) a de 110°C a 120°C bajo argón durante 14 horas y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se eliminó el anhídrido acético en exceso a presión reducida. Se disolvió el residuo en cloruro de metileno (500 ml), se lavó en primer lugar con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 200 ml), después con disolución de salmuera (200 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice usando hexano:acetato de etilo (8:1) como eluyente para dar 7,4 g (rendimiento del 60%) del producto deseado como una mezcla de isómeros *cis* y *trans*. También se aisló una pequeña cantidad de cada isómero y se caracterizó mediante ¹H- y ¹³C-RMN.

Isómero *cis*:

R_f: 0,43 (hexano:EtOAc)

¹H-RMN: δ (ppm en CDCl₃)

8,05 (m, 2H, aromático)

7,58 (m, 1H, aromático)

7,45 (m, 2H, aromático)

6,24 (d, 1H, C₄-H)

5,50 (t, 1H, C₂-H)

4,61 (d, 1H, C₂-CH₂OOCC₆H₅)

4,53 (d, 2H, C₅-H)

3,94 (dd, 1H, C₅-H)

2,05 (s, 3H, CH₃)

Isómero *trans*:

R_f: 0,43 (hexano:EtOAc 7:3)

¹H-RMN: δ (ppm en CDCl₃)

8,04 (m, 2H, aromático)

7,58 (m, 1H, aromático)

7,45 (m, 2H, aromático)

6,27 (dd, 1H, C₄-H)

5,73 (dd, 1H, C₂-H)

4,53 (dd, 1H, C₂-CH₂OOCC₆H₅)

4,34 (dd, 1H, C₅-H)

4,26 (dd, 1H, C₂-CH₂OCC₆H₅)

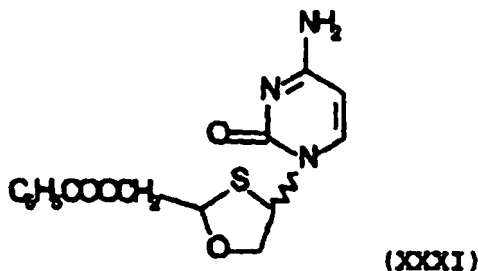
4,20 (dd, 1H, C₅-H)

2,09 (s, 3H, CH₃)

¹³C-RMN: δ (ppm en CDCl₃)

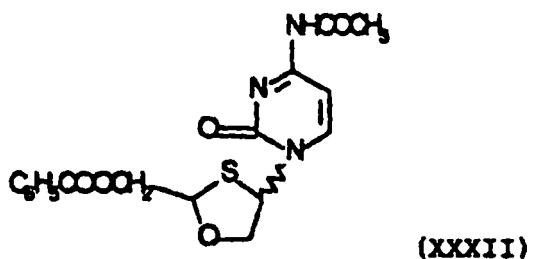
177,66, 166,37, 133,46, 129,93, 128,60, 83,76, 81,22, 74,33, 64,65 y 20,79

Ejemplo 5

Cis- y trans-2-benzoiloximetil-4-(citosin-1'-il)-1,3-oxatolano

Se calentó una mezcla de citosina (206 mg), sulfato de amonio (10 mg) y hexametildisilazano (HMDS, 10 ml) a reflujo bajo argón hasta que dio como resultado una disolución transparente. Se evaporaron los reactivos en exceso a vacío y se eliminaron los compuestos volátiles restantes a alto vacío (15 minutos). Se disolvió el residuo sólido en cloruro de metileno seco (20 ml) y se añadió una disolución de 2-benzoiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatolano (ejemplo 4) (350 mg) en cloruro de metileno seco (20 ml) bajo argón, seguido de una disolución de cloruro de estaño IV (SnCl₄, 124 ml) en cloruro de metileno (20 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción bajo argón durante la noche a temperatura ambiente, después se calentó a reflujo durante 3 horas y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla con cloruro de metileno (100 ml) y se vertió con agitación en NaHCO₃ acuoso saturado. Se separó la fase orgánica mediante filtración sobre celite, se lavó en primer lugar con agua (2 x 75 ml), después con disolución de salmuera (100 ml), se secó sobre MgSO₄ y se filtró. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo:CH₃OH como el eluyente para dar 140 mg (35%) del producto deseado como una mezcla de isómeros *cis* y *trans* en una proporción de 1:1 tal como se determinó mediante ¹H-RMN. Se separaron estos isómeros como los derivados de N-acetilo en el ejemplo siguiente.

Ejemplo 6

Cis- y trans-2-benzoiloximetil-4-(n4'-acetil-citosin-1'-il)-1,3-oxatolano

Se agitó una disolución de la mezcla *cis* y *trans* de 2-benzoiloximetil-4-(citosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 5) (135 mg), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 15 mg) y anhídrido acético (44 ml) en piridina seca (10 ml) durante la noche a temperatura ambiente (16 horas) y se vertió en agua fría (100 ml), seguido de una extracción con cloruro de metileno (3 x 50 ml). Se lavó el extracto con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a vacío. Se añadió tolueno al residuo, después se evaporó a vacío y se purificó el aceite residual mediante cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente para dar 65 mg de isómero *trans* puro como el producto de movilidad rápida y 60 mg de isómero *cis* puro como el producto de movilidad baja. Estos se caracterizaron mediante ¹H y ¹³C-RMN.

ES 2 286 542 T3

Isómero *cis*:

^1H -RMN: δ (ppm en CDCl_3)

5	9,61 (b, 1H, C_4' -NHCOCH ₃)
	8,29 (d, 1H, C_6' -H)
	8,06 (m, 2H, aromático)
10	7,65 (m, 1H, aromático)
	7,51 (m, 2H, aromático)
15	7,25 (d, 1H, C_5' -H)
	6,61 (d, 1H, C_4 -H)
	5,50 (t, 1H, C_2 -H)
20	4,80 (m, 2H, C_2 -CH ₂ OOCC ₆ H ₅)
	4,48 (d, 1H, C_5 -H)
25	4,05 (dd, 1H, C_5 -H)
	2,25 (s, 3H, CH ₃)

^{13}C -RMN: δ (ppm en CDCl_3)

30	170,93, 166,28, 162,80, 155,76, 146,06, 133,91, 129,90, 128,84, 97,45, 85,88, 78,25, 64,60, 63,53 y 24,71.
----	--

Isómero *trans*:

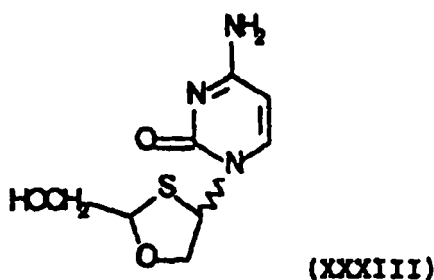
^1H -RMN: δ (ppm en DMSO d_6)

35	10,88 (s, 1H, C_4' -NHCOCH ₃)
	8,13 (d, 1H, C_6' -H)
40	7,96 (m, 2H, aromático)
	7,68 (m, 1H, aromático)
45	7,52 (m, 2H, aromático)
	7,20 (d, 1H, C_5' -H)
	6,35 (d, 1H, C_4 -H)
50	5,96 (dd, 1H, C_2 -H)
	4,58 (dd, 1H, C_2 -CH ₂ OOCC ₆ H ₅)
55	4,44 (d, 1H, C_5 -H)
	4,29 (m, 2H, C_5 -H y CH ₂ OOCC ₆ H ₅)
60	2,07 (s, 3H, CH ₃)

^{13}C -RMN: δ (ppm en DMSO d_6)

65	171,53, 165,84, 162,76, 155,21, 146,59, 134,00, 129,64, 129,23, 96,54, 83,78, 74,24, 64,58, 64,01 y 24,35
----	---

Ejemplo 7

Cis- y trans-2-hidroximetil-4-(citosin-1'-il)-1,3-oxatolanoIsómero cis (BCH-270)

Se agitó una disolución de *cis*-2-benzoiloximetil-4(N4'-acetil-citosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 6) (54 mg) en amoníaco metanólico (50 ml) durante la noche a temperatura ambiente (16 horas). Se evaporó el disolvente a vacío y se trató el residuo con éter dando 37 mg (90%) del producto deseado. Se caracterizó después el producto mediante ^1H y ^{13}C -RMN. p.f.: 213-215°C

UV: (CH_3OH) $\lambda_{\text{máx}}$: 270 nm

^1H -RMN: δ (ppm en, $\text{DMSO } d_6$)

7,85 (d, 1H, C_6' -H)

7,16 (d, 2H, C_4' - NH_2)

6,34 (d, 1H, C_4 -H)

5,76 (d, 1H, C_5' -H)

5,31 (t, 1H, C_2 - CH_2OH)

5,18 (t, 1H, C_2 -H)

4,40 (d, 1H, C_5 -H)

3,92 (dd, 1H, C_5 -H)

3,78 (m, 2H, C_2 - CH_2OH)

^{13}C -RMN: δ (ppm en $\text{DMSO } d_6$)

165,95, 155,74, 142,39, 94,98, 88,85, 77,29, 62,91 y 62,48

Isómero trans

Se agitó una disolución de *trans*-2-benzoiloximetil-4-(N4'-acetil-citosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 6) (63 mg) en amoníaco metanólico (50 ml) durante la noche a temperatura ambiente (16 horas). Se eliminó el disolvente a vacío y se solidificó el residuo con éter para dar 36 mg (93%) del producto deseado que se caracterizó mediante ^1H y ^{13}C -RMN.

p.f.: 175-177°C

UV: (CH_3OH) $\lambda_{\text{máx}}$: 270 nm

^1H -RMN: δ (ppm en $\text{DMSO } d_6$)

7,67 (d, 1H, C_6' -H)

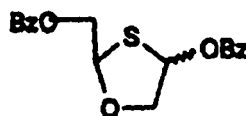
7,19 (d, 2H, C_4' - NH_2)

6,30 (d, 1H, C_4 -H)

5,77 (d, 1H, C₅'-H)5,56 (t, 1H, C₂-CH₂OH)5,23 (t, 1H, C₂-H)4,18 (m, 2H, C₅-H)3,61 (m, 1H, C₂-CH₂OH)3,36 (m, 1H, C₂-CH₂OH)¹³C-RMN: δ (ppm en DMSO d₆)

166,00, 155,65, 142,30, 95,11, 87,52, 74,52, 63,42 y 62,86

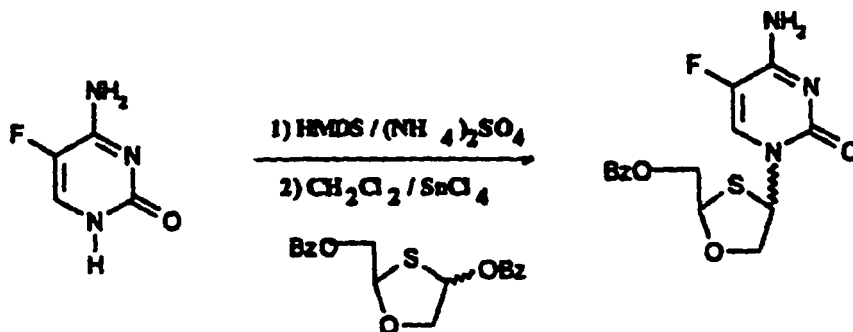
Ejemplo 8

Cis y trans-2-benzoiloximetil-4-benzoiloxi-1,3-oxatolano

Se disolvió 2-benzoiloximetil-1,3-oxatolano (ejemplo 2) (0,4 g, 1,78 mmol) en 200 ml de benceno seco desgasificado bajo una corriente de argón. Se añadió a esta disolución peróxido de benzoilo (0,863 g, 3,56 mmol) y catalizador AIBN (15 mg, 0,09 mmol, al 5%) en una porción. Se sometió a reflujo la mezcla resultante durante 4 horas bajo argón. Después se eliminó el disolvente a alto vacío, y se disolvió el residuo en diclorometano (40 ml), se extrajo 2X con una disolución de bicarbonato de sodio al 10% (15 ml) y se secó sobre MgSO₄. La evaporación de diclorometano a presión reducida y la purificación del residuo en columna de gel de sílice usando acetato de etilo; hexano (30%) como eluyente proporcionaron la mezcla pura del derivado *cis*- y *trans*-1,3-oxatolano como un aceite incoloro (264 mg, 0,76 mmol, rendimiento del 43%). Se separó el isómero *trans* como un sólido blanco p.f. 60-62°C. Se caracterizó completamente esta mezcla mediante espectro de ¹H, y ¹³C RMN. R_f= 0,43 (acetato de etilo:hexanos 1:4).

¹H RMN δ (ppm en CDCl₃): 8,07 (m, 2H, aromático), 7,59 (m, 1H, aromático), 7,56 (m, 2H, aromático), 6,51 (t, 1H, C₄-H), 5,79 (m, 1H, C₂-H), 4,63 (m, 2H, CH₂-OCOPh), 4,32 (m, 2H, C₅-H). ¹³C RMN δ (ppm en CDCl₃): 166,56, 166,36, 134,12, 133,78, 130,35, 129,04, 84,40, 82,53, 75,04, 65,33, 39,89, 25,43, 23,93.

Ejemplo 9

Cis y trans-2-benzoiloximetil-4-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatolano

Se calentó 5-fluorocitosina (700 mg, 5,4 mmol) a reflujo HMDS (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano, 30 ml) que contiene una cantidad catalítica de sulfato de amonio (20 mg) durante la noche (16 h). Se evaporó la disolución transparente hasta sequedad a presión reducida y se disolvió el residuo en cloruro de metileno seco (50 ml). Se añadió a esta disolución a través de una cánula una mezcla de 2-benzoiloximetil-4-benzoiloxi-1,3-oxatolano (ejemplo 8) (1,25 g, 3,63 mmol) en cloruro de metileno seco (50 ml), seguido de la adición de tetracloruro de estaño (4 ml de disolución 1 M en cloruro de metileno). Se agitó la mezcla de reacción bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 16 h y se calentó a reflujo durante 1 h. Tras el enfriamiento hasta temperatura ambiente, se vertió la mezcla en disolución de NaHCO₃ acuosa saturada (150 ml), se agitó durante 15 min. y se filtró sobre celite. Se recogió la fase orgánica. Se extrajo adicionalmente la disolución acuosa con cloruro de metileno (2 x 100 ml). Se lavó la fase orgánica combinada dos veces con agua (2 x 150 ml), una vez con disolución de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, y se

ES 2 286 542 T3

filtró. Se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo contenía dos compuestos en una proporción de 2:3 para los isómeros *cis* y *trans* y se purificó sobre gel de sílice usando acetato de etilo-metanol 95:5 como eluyente para dar 280 mg de isómero *cis* y 420 mg de isómero *trans* para un rendimiento total del 53%.

Isómeros *cis*:

p.f.: 235-236°C (desc.).

R_f: 0,36 (EtOAc:MeOH 9:1)

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ en ppm: 7,94 (m, 2H, aromático), 7,80 (d, 2H, H-6' y 1H de NH₂ por debajo, J_{H-F}=6,8 Hz), 7,68 (m, 1H, aromático), 7,58 (b, 1H de NH₂), 7,47 (m, 2H, aromático), 6,28 (d, 1H, H-4, J=3,0 Hz), 5,51 (t, 1H, H-2, J=3,8 Hz), 4,73 (m, 2H, -CH₂OBz), 4,61 (d, 1H, H-5, J=11 Hz) y 3,98 (dd, 1H, H-5, J=4,7 y 11 Hz).

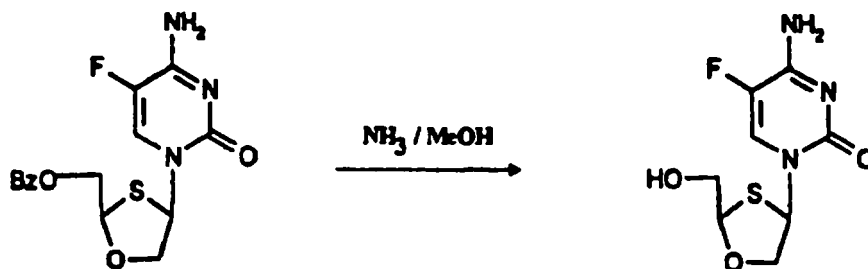
Isómeros *trans*

p.f.: 235-236°C (desc.).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ en ppm: 7,97 (m, 2H, aromático), 7,81 (d, 2H, H-6' y 1H de NH₂ por debajo, J_{H-F}=7,1 Hz), 7,66 (m, 1H, aromático), 7,55 (m, 3H, 2H de compuesto aromático y 1H de NH₂), 6,32 (d, 1H, H-4, J=4,8 Hz), 6,02 (dd, 1H, H-2, J=3,2 y 8,5 Hz), 4,55 (dd, 1H, -CH₂OBz, J=8,4 y 11,9 Hz), 4,38 (d, 1H, H-5, J=10,2 Hz) y 4,26 (dd, 2H, 1H de H-5 y 1H de -CH₂OBz, J=3,6 y 10,5 Hz).

Ejemplo 10

Cis-2-hidroximetil-4-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatolano (bch-1081)



Se disolvió *cis*-2-benzyloximetil-4-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 9) (75 mg, 0,21 mmol) en amoníaco metanólico (25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h y se eliminaron los disolventes a presión reducida. Se trituró el residuo con éter (2 x 20 ml). Se recristalizó el sólido restante en etanol-éter para dar el compuesto deseado (43 mg) con un rendimiento del 80%.

P.f.: >210°C (desc.)

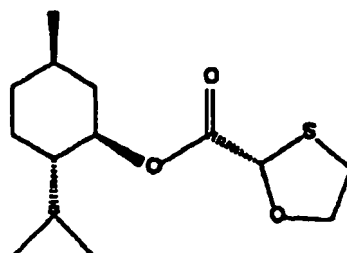
R_f: 0,41 (EtOAc:MeOH 4:1)

UV: λ_{máx} (H₂O): 284 nm

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ en ppm: 8,14 (d, 1H, H-6', J_{H-F}=7,1 Hz), 7,79 (sa, 1H, NH₂, D₂O intercambiable), 7,56 (sa, 1H, NH₂, D₂O intercambiable), 6,28 (d, 1H, H-4, J=2,6 Hz), 5,44 (t, 1H, OH, D₂O intercambiable), 5,18 (t, 1H, H-2, J=5,5 Hz), 4,44 (d, 1H, H-5, J=10,5 Hz), 3,91 (dd, 1H, H-5, J=4,6 y 10,6 Hz), y 3,78 (m, 2H, CH₂OH).

Ejemplo 11

(1'R,2'S,5'R)-mentil-1,3-oxatolano-2S-carboxilato



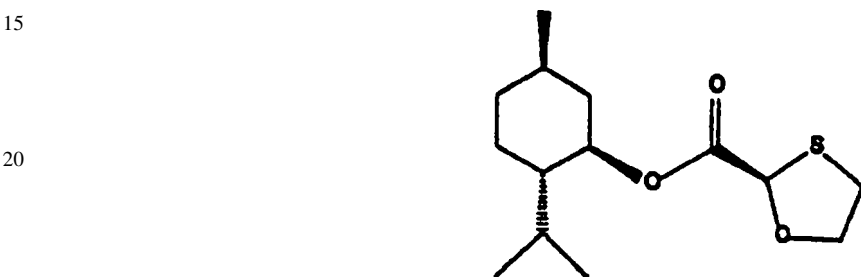
ES 2 286 542 T3

Se añadió a una mezcla de (1'R,2'S,5'R)-mentil-5S-acetoxi-1,3-oxatiolan-2S-carboxilato (documento WO 92/20669, incorporado de este modo por referencia) (1,0 g, 3,03 mmol) y trietilsilano (4,84 ml, 30,3 mmol) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,584 ml, 3,03 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 12 h y después se diluyó con diclorometano (150 ml), se lavó con disolución acuosa saturada de NaHCO₃, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró.

La cromatografía (Hexano-EtOAc, 6:1) del producto bruto dio el producto (0,71 g, 87%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃: δ 0,45-2,10 (m, 17H), 2,96-3,20 (m, 2H), 4,20-4,40 (m, 2H), 4,72 (dt, 1H), 5,45 (s, 1H); [α]_D²⁵-102,9° (c, 1,02, CHCl₃).

Ejemplo 12

(1'R,2'S,5'R)-mentil-1,3-oxatiolan-2R-carboxilato



Se añadió a una mezcla de (1'R,2'S,5'R)-mentil-5S-acetoxi-1,3-oxatiolan-2R-carboxilato (documento WO 92/20669) (0,50 g, 1,51 mmol) y trietilsilano (2,42 ml, 15,1 mmol) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,29 ml, 1,51 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 12 h y después se diluyó con diclorometano (125 ml), se lavó con disolución acuosa saturada de NaHCO₃, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía (Hexano-EtOAc, 6:1) del producto bruto dio el producto (0,369 g, 86%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃: δ 0,40-2,10 (m, 17H), 2,98-3,19 (m, 2H), 4,20-4,40 (m, 2H), 4,72 (dt, 1H), 5,46 (s, 1H).

Ejemplo 13

2R-hidroximetil-1,3-oxatiolano



Se añadieron a una disolución de (1'R,2'S,5'R)-mentil-1,3-oxatiolan-2R-carboxilato (ejemplo 12) (3,23 g, 11,9 mmol) en etanol anhidro (20 ml) a 0°C bajo una atmósfera de argón, borohidruro de sodio (1,12 g, 29,7 mmol) y metanol anhidro (0,916 ml, 47,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 1 h y se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 12 h. Después se extinguió la reacción con ácido acético y se eliminó el disolvente a vacío. Se diluyó el residuo obtenido con diclorometano (225 ml), se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía (Hexano-Et₂O, 1:1) del producto bruto dio el producto (1,30 g, 91%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃ δ 2,85-2,97 (m, 2H), 3,58 (dd, 1H, J=12,2, 5,4 Hz), 3,66 (dd, 1H, J=12,2, 3,3 Hz), 3,75-3,85 (m, 1H), 4,14-4,25 (m, 1H), 5,16 (dd, 1H, J=5,4, 3,3 Hz).

Ejemplo 14

2S-hidroximetil-1,3-oxatiolano



Se añadieron a una disolución de (1'R,2'S,5'R)-mentil-1,3-oxatiolan-2S-carboxilato (ejemplo 11) (1,16 g, 4,26 mmol) en etanol anhidro (10 ml) a 0°C bajo una atmósfera de argón, borohidruro de sodio (0,403 g, 10,7 mmol) y metanol anhidro (0,690 ml, 17,03 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 1 h y se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 12 h. Después se extinguió la reacción con ácido acético y se eliminó el disolvente a vacío. Se diluyó el residuo obtenido con diclorometano (150 ml), se lavó con agua, salmuera, se secó

sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía (Hexano-Et₂O, 1:1) del producto bruto dio el producto (0,47 g, 92%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃ : δ 2,85-2,99 (m, 2H), 3,60 (dd, 1H, J=12,2, 5,5 Hz), 3,65 (dd, 1H, J=12,2, 3,3 Hz), 3,80-3,90 (m, 1H), 4,20-4,30 (m, 1H), 5,15 (dd, 1H, J=5,5, 3,3 Hz); [α]_D²⁵ - 35,6° (c, 1,25, CHCl₃).

Ejemplo 15

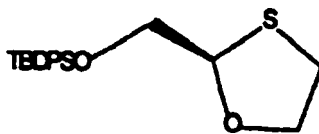
2S-t-butildifenilsiloximetil-1,3-oxatolano



Se añadió a una disolución de 2S-hidroximetil-1,3-oxatolano (ejemplo 14) (0,63 g, 5,3 mmol), imidazol (0,71 g, 10,4 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml) a 0°C bajo una atmósfera de argón una disolución de cloruro de t-butildifenilsililo (2,16 g, 7,9 mmol) en tetrahidrofurano (8 ml). Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 12 h, después se diluyó con diclorometano (125 ml). Se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía (Hexano-EtOAc, 6:1) del producto bruto dio el producto (1,87 g, 99%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃ : δ 1,08 (s, 9H), 2,93-2,99 (m, 2H), 3,70 (dd, 1H, J=10,9, 4,6 Hz), 3,86 (dd, 1H, J=10,9, 6,4 Hz), 3,94-4,15 (m, 2H), 5,29 (dd, 1H, J=6,4, 4,6 Hz), 7,35-7,50 (m, 6H), 7,68-7,75 (m, 4H), [α]_D²⁵ -23,3° (c, 1,0, CHCl₃).

Ejemplo 16

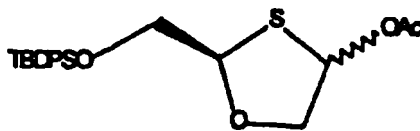
2R-t-butildifenilsiloximetil-1,3-oxatolano



Se añadió a una disolución de 2R-hidroximetil-1,3-oxatolano (ejemplo 13) (1,30 g, 10,8 mmol), imidazol (1,47 g, 21,6 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml) a 0°C bajo una atmósfera de argón una disolución de cloruro de t-butildifenilsililo (4,46 g, 16,2 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml). Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 12 h, después se diluyó con diclorometano (150 ml). Se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía (Hexano-EtOAc, 6:1) del producto bruto dio el producto (3,64 g, 94%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃ : δ 1,04 (s, 9H), 2,89-2,99 (m, 2H), 3,65 (dd, 1H, J=10,9, 4,6 Hz), 3,88 (dd, 1H, J=10,9, 6,4 Hz), 3,90-4,14 (m, 2H), 5,27 (dd, 1H, J=6,4, 4,6 Hz), 7,34-7,46 (m, 6H), 7,64-7,74 (m, 4H).

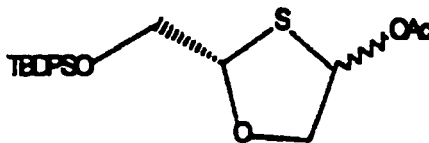
Ejemplo 17

Trans y cis-2R-t-butildifenilsiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatolano



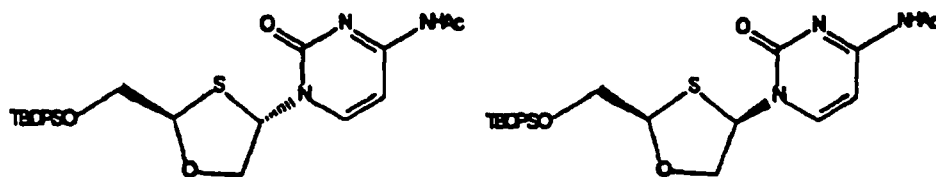
Se añadió ácido metacloroperbenzoico sólido (MCPBA) (0,23 g, 80%, 1,06 mmol) a una disolución agitada de 2R-t-butildifenilsiloximetil-1,3-oxatolano (ejemplo 16) (0,32 g, 0,89 mmol) en diclorometano (20 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 2 h y después se diluyó con diclorometano (150 ml), se lavó con disolución de Na₂CO₃ acuosa saturada, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía del producto bruto dio una mezcla de sulfóxidos. Después se calentó la mezcla del sulfóxido obtenido, anhídrido acético (10 ml), acetato de tetrabutamonio (0,32 g, 1,06 mmol) a 120°C durante 6 h y se eliminó el anhídrido acético en exceso a vacío. Se diluyó el residuo en diclorometano (150 ml), se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía del producto bruto dio una mezcla de acetato (0,164 g, 45%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃: δ 1,05 (s, 9H), 2,03 (s, 1,35H), 2,08 (s, 1,65H), 3,60-4,50 (m, 4H), 5,28 (t, 0,45H, J=5,4 Hz), 5,55 (dd, 0,55H, J=6,5, 4,7 Hz), 6,14-6,20 (m, 1H), 7,30-7,50 (m, 6H), 7,60-7,78 (m, 4H).

Ejemplo 18

Trans y cis-2S-t-butildifenilsiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatolano

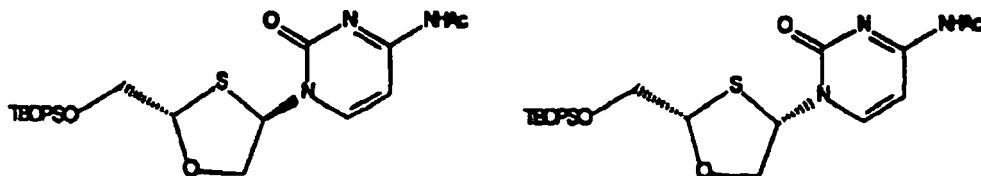
Se añadió MCPBA sólido (0,85 g, 80%, 3,9 mmol) a una disolución agitada de 2S-t-butildifenilsiloximetil-1,3-oxatolano (ejemplo 15) (1,35 g, 3,9 mmol) en diclorometano (30 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 2 h y después se diluyó con diclorometano (225 ml), se lavó con disolución de Na₂CO₃ acuosa saturada, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía del producto bruto dio una mezcla de sulfóxidos. Después se calentó la mezcla del sulfóxido obtenido, anhídrido acético (15 ml), acetato de tetrabutilamonio (1,19 g, 3,9 mmol) a 120°C durante 6 h y se eliminó el anhídrido acético en exceso a vacío. Se diluyó el residuo con diclorometano (200 ml), se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía del producto bruto dio una mezcla de acetato (0,601 g, el 40%) como un aceite incoloro: ¹H RMN en CDCl₃: δ 1,10 (s, 9H), 2,05 (s, 1,2H), 2,10 (s, 1,8H), 3,60-4,50 (m, 4H), 5,30 (t, 0,4H, J=5,5 Hz), 5,58 (dd, 0,6H, J=6,5, 4,8 Hz), 6,14-6,23 (m, 1H), 7,33-7,50 (m, 6H), 7,65-7,78 (m, 4H).

Ejemplo 19

2R-t-butildifenilsiloximetil-4S-(N-4'-acetilcitosin-1'-il)-1,3-oxatolano y 2R-t-butildifenilsiloximetil-4R-(N-4'-acetilcitosin-1'-il)-1,3-oxatolano

Se añadieron 2,6-lutidina (0,054 ml, 0,49 mmol) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,095 ml, 0,49 mmol) a una suspensión de N-4'-acetilcitosina (0,045 g, 0,29 mmol) en dicloroetano (2 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Se agitó la mezcla durante 15 min y se introdujeron la mezcla de *cis* y *trans* 2R-t-butildifenilsiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatolano (ejemplo 17) (0,100 g, 0,25 mmol) en dicloroetano (2 ml) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,048 ml, 0,25 mmol) sucesivamente. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante media hora y se diluyó con diclorometano, se lavó con disolución de NaHCO₃ acuosa saturada, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía del producto bruto dio una mezcla de isómero *trans* y *cis* que se sometió a separación por TLC preparativa para dar isómero *cis* (33 mg, el 26%) [¹H RMN en CDCl₃: δ 1,08 (s, 9H), 2,22 (s, 3H), 3,85-4,45 (m, 4H), 5,26 (t, 1H, J=4,3 Hz), 6,54 (d, 1H, J=4,2 Hz), 7,21 (d, 1H, J=7,4 Hz), 7,35-7,50 (m, 6H), 7,60-7,75 (m, 4H), 8,23 (d, 1H, J=7,4 Hz), 9,02 (sa, 1H)] e isómero *trans* (49 mg, el 39%) [¹H RMN en CDCl₃: δ 1,04 (s, 9H), 2,21 (s, 3H), 3,56-4,26 (m, 4H), 5,64 (dd, 1H, J=6,8, 4,4 Hz), 6,39 (d, 1H, J=3,6 Hz), 7,31-7,48 (m, 7H), 7,58-7,71 (m, 4H), 8,01 (d, 1H, J=7,4 Hz), 8,86 (sa, 1H)].

Ejemplo 20

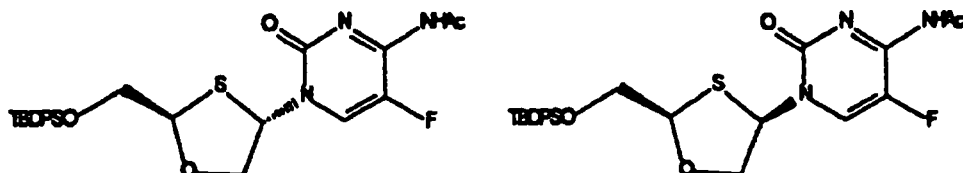
2S-t-butildifenilsiloximetil-4R-(N-4'-acetilcitosin-1'-il)-1,3-oxatolano y 2S-t-butildifenilsiloximetil-4S-(N-4'-acetilcitosin-1'-il)-1,3-oxatolano

Se añadieron 2,6-lutidina (0,131 ml, 1,13 mmol) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,218 ml, 1,13 mmol) a una suspensión de N-4'-acetilcitosina (0,104 g, 0,68 mmol) en dicloroetano (2 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Se agitó la mezcla durante 15 min y se introdujeron la mezcla de *cis* y *trans* 2S-t-butildifenilsiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatolano (ejemplo 18) (0,235 g 0,56 mmol) en dicloroetano (2 ml) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,109 ml, 1,13 mmol) sucesivamente. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante media hora

y se diluyó con diclorometano, se lavó con disolución de NaHCO_3 acuosa saturada, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía (EtOAc) del producto bruto dio una mezcla de isómero *trans* y *cis* (0,225 g, el 78%): ^1H RMN en CDCl_3 : δ 1,05 (s, 5,4H), 1,08 (s, 3,6H), 2,24 (s, 1,2H), 2,28 (s, 1,8H), 3,67-4,42 (m, 4H), 5,26 (t, 0,4H, $J=4,3$ Hz), 5,64 (dd, 0,6H, $J=6,8$, 4,3 Hz), 6,40 (d, 0,6H, $J=3,8$ Hz), 6,53 (d, 0,4H, $J=4$, Hz), 7,20-7,75 (m, 11H), 8,00 (d, 0,6H, $J=7,5$ Hz), 8,21 (d, 0,4H, $J=7,5$ Hz), 9,63 (sa, 1H).

Ejemplo 21

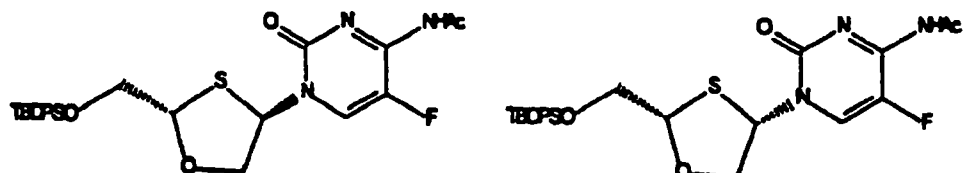
2*R*-*t*-butildifenilsiloximetil-4*S*-(*N*-4'-acetil-5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano y 2*R*-*t*-butildifenilsiloximetil-4*R*-(*N*-4'-acetil-5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano



Se añadieron 2,6-lutidina (0,124 ml, 1,07 mmol) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,207 ml, 1,07 mmol) a una suspensión de *N*-4'-acetil-5'-fluorocitosina (0,110 g, 0,64 mmol) en dicloroetano (3 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Se agitó la mezcla durante 15 min y se introdujeron la mezcla de *cis* y *trans* 2*R*-*t*-butildifenilsiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatiolano (ejemplo 17) (0,223 g, 0,54 mmol) en dicloroetano (3 ml) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,103 ml, 0,54 mmol) sucesivamente. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante media hora y se diluyó con diclorometano, se lavó con disolución de NaHCO_3 acuosa saturada, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía del producto bruto dio una mezcla de isómero *trans* y *cis* que se sometió a separación por TLC preparativa para dar isómero *cis* (97 mg, el 34%) [^1H RMN en CDCl_3 δ 1,08 (s, 9H), 2,65 (s, 3H), 3,90-4,50 (m, 4H), 5,27 (t, $J=4,2$ Hz), 6,53 (d, 1H, $J=4,2$ Hz), 7,32-7,530 (m, 6H), 7,55-7,76 (m, 4H), 8,21 (d, 1H, $J=6,1$ Hz)] e isómero *trans* (68 mg, el 24%) [^1H RMN en CDCl_3 δ 1,07 (s, 9H), 2,63 (s, 3H), 3,56-4,26 (m, 4H), 5,68 (dd, $J=6,9$, 4,4 Hz), 6,37 (d, 1H, $J=2,4$ Hz), 7,30-7,53 (m, 6H), 7,57-7,75 (m, 4H), 7,93 (d, 1H, $J=6,1$ Hz)].

Ejemplo 22

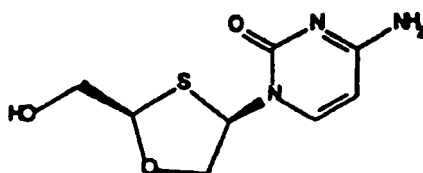
2*S*-*t*-butildifenilsiloximetil-4*R*-(*N*-4'-acetil-5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano y 2*S*-*t*-butildifenilsiloximetil-4*S*-(*N*-4'-acetil-5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano



Se añadieron 2,6-lutidina (0,248 ml, 2,13 mmol) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,418 ml, 2,13 mmol) a una suspensión de *N*-4'-acetil-5'-fluorocitosina (0,218 g, 1,27 mmol) en dicloroetano (4,5 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Se agitó la mezcla durante 15 min y se introdujeron la mezcla de *cis* y *trans* 2*S*-*t*-butildifenilsiloximetil-4-acetoxi-1,3-oxatiolano (ejemplo 18) (0,433 g, 1,06 mmol) en dicloroetano (4 ml) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (0,206 ml, 1,06 mmol) sucesivamente. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante media hora y se diluyó con diclorometano, se lavó con disolución de NaHCO_3 acuosa saturada, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía del producto bruto dio una mezcla de isómero *trans* y *cis* que se sometió a separación por TLC preparativa para dar isómero *cis* (145 mg, el 26%) [^1H RMN en CDCl_3 δ 1,09 (s, 9H), 2,66 (s, 3H), 3,90-4,50 (m, 4H), 5,26 (t, $J=4,1$ Hz), 6,53 (d, 1H, $J=4,1$ Hz), 7,36-7,50 (m, 6H), 7,55-7,78 (m, 4H), 8,20 (d, 1H, $J=6,1$ Hz)] e isómero *trans* (119 mg, el 21%) [^1H RMN en CDCl_3 δ 1,07 (s, 9H), 2,64 (s, 3H), 3,58-4,25 (m, 4H), 5,68 (dd, $J=6,8$, 4,2 Hz), 6,37 (d, 1H, $J=2,7$ Hz), 7,35-7,51 (m, 6H), 7,60-7,76 (m, 4H), 7,93 (d, 1H, $J=6,1$ Hz)].

Ejemplo 23

2*R*-hidroximetil-4*R*-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano compuesto n° 1



ES 2 286 542 T3

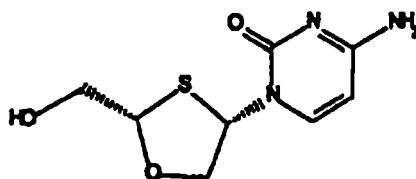
Se añadieron lentamente a una disolución de 2R-t-butildifenilsiloximetil-4R-(N-4'-acetilcitosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 19) (72 mg, 0,14 mmol) en THF (3 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio (0,212 ml, 1 M en THF, 0,21 mmol) y ácido acético glacial (0,012 ml, 0,21 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante 1 h, seguido de la adición de gel de sílice (0,5 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 9:1) para dar el producto desililado. Se disolvió el producto desililado en disolución de metanol y K₂CO₃ saturada y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante media hora. Se neutralizó la mezcla de reacción con disolución de HCl 1N/metanol seguido de la adición de gel de sílice (0,5 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 4:1) para proporcionar el producto (27 mg, el 91%) como un sólido blando que se trituró en Et₂O-MeOH: p.f. 200°C (desc.); [α]_D²⁵ -126,8° (c, 0,5, MeOH); ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 3,70-3,82 (m, 2H), 3,91 (dd, 1H, J=10,4, 4,6 Hz), 4,38 (d, 1H, J=10,4 Hz), 5,16 (t, 1H, J=4,6 Hz), 5,32 (t, 1H, J=5,8 Hz), 5,75 (d, 1H, J=7,4 Hz), 6,32 (d, 1H, J=4,6 Hz), 7,12 (sa, 1H), 7,23 (sa, 1H), 7,84 (d, 1H, J=7,4 Hz); ¹³C RMN (DMSO-d₆): δ 62,7, 63,1, 77,4, 89,0, 95,6, 142,4, 155,4, 165,8.

Con el fin de evaluar la pureza enantiomérica del producto nucleosídico final sintetizado o de resolver la mezcla racémica de los análogos de nucleósido desprotegidos, se usaron procedimientos de HPLC quirál. Por ejemplo, se encontró que el compuesto n° 1 anterior tenía un tiempo de retención de 43,88 min en las condiciones siguientes:

Tipo de columna:	cyclobond™ RSP 4,6x250 nm
Caudal:	0,27 ml/min
Disolvente:	TFAA al 0,05%, pH 7,0
Detección:	254 nm

Ejemplo 24

2S-Hidroximetil-4S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatolano compuesto n° 2

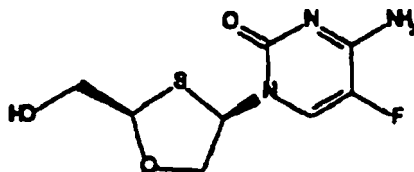


Se añadieron lentamente a una disolución de 2S-t-butildifenilsiloximetil-4S-(N-4'-acetilcitosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 20) (202 mg, 0,40 mmol) en THF (3,5 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio (0,595 ml, 1 M en THF, 0,60 mmol) y ácido acético glacial (0,034 ml, 0,60 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante 1 h, seguido de la adición de gel de sílice (0,9 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 9:1) para dar el producto desililado. Se disolvió el producto desililado en disolución de metanol y K₂CO₃ saturada y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante media hora. Se neutralizó la mezcla de reacción con disolución de metanol y HCl 1N seguido de la adición de gel de sílice (0,9 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 4:1) para proporcionar el producto (74 mg, el 81%) como un sólido blanco que se trituró en Et₂O-MeOH: p.f. 220°C (desc.); [α]_D²⁵ +118,6° (c, 0,5, MeOH); ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 3,70-3,82 (m, 2H), 3,92 (dd, 1H, J=10,6, 4,6 Hz), 4,38 (d, 1H, J=10,6 Hz), 5,17 (t, 1H, J=4,5 Hz), 5,32 (t, 1H, J=5,8 Hz), 5,75 (d, 1H, J=7,4 Hz), 6,32 (d, 1H, J=4,6 Hz), 7,12 (sa, 1H), 7,22 (sa, 1H), 7,85 (d, 1H, J=7,4 Hz); ¹³C RMN (DMSO-d₆): δ 63,0, 63,1, 77,4, 88,9, 95,1, 142,4, 155,4, 165,7.

Con el fin de evaluar la pureza enantiomérica del producto nucleosídico final sintetizado o de resolver la mezcla racémica de los análogos de nucleósido desprotegidos, se usaron procedimientos de HPLC quirál. Por ejemplo, se encontró que el compuesto n° 2 tenía un tiempo de retención de 48,18 min en las condiciones siguientes:

Tipo de columna:	cyclobond™ RSP 4,6x250 nm
Caudal:	0,27 ml/min
Disolvente:	TFAA al 0,05%, pH 7,0
Detección:	254 nm

Ejemplo 25

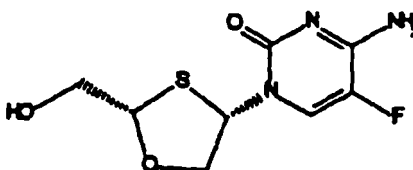
2R-hidroximetil-4R-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatolano - compuesto n° 3

Se añadieron lentamente a una disolución de 2R-t-butildifenilsiloximetil-4R-(N-4'-acetil-5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 21) (152 mg, 0,29 mmol) en THF (3,5 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio (0,432 ml, 1 M en THF, 0,43 mmol) y ácido acético glacial (0,025 ml, 0,43 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante 1 h, seguido de la adición de gel de sílice (0,5 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 9:1) para dar el producto desililado. Se disolvió el producto desililado en disolución de metanol y K₂CO₃ saturada y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante media hora. Se neutralizó la mezcla de reacción con disolución de metanol y HCl 1N seguido de la adición de gel de sílice (0,5 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 4:1) para proporcionar el producto (58 mg, el 81%) como un sólido blanco que se trituró en Et₂O-MeOH: p.f. 183°C (desc.); [α]_D²⁵ -86,5° (c, 0,57, MeOH); ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 3,70-4,50 (m, 4H), 5,18 (t, 1H, J=3,6 Hz), 5,44 (t, 1H, J=5,8 Hz), 6,25-6,30 (m, 1H), 7,56 (sa, 1H), 7,80 (sa, 1H), 8,14 (d, 1H, J=7,2 Hz); ¹³C RMN (DMSO-d₆): δ 62,2, 63,4, 77,5, 88,9, 126,7, 127,1, 134,7, 137,9, 153,8, 157,6, 157,7.

Con el fin de evaluar la pureza enantiomérica del producto nucleosídico final sintetizado o de resolver la mezcla racémica de los análogos de nucleósido desprotegidos, se usaron procedimientos de HPLC quiral. Por ejemplo, se encontró que el compuesto n° 3 anterior tenía un tiempo de retención de 16,73 min en las condiciones siguientes:

Tipo de columna: cyclobond™ RSP 4,6x250 nm
Caudal: 0,43 ml/min
Disolvente: TFAA al 0,05%, pH 7,0
Detección: 254 nm

Ejemplo 26

2S-hidroximetil-4S-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatolano - compuesto n° 4

Se añadieron lentamente a una disolución de 2S-t-butildifenilsiloximetil-4S-(N-4'-acetil-5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatolano (ejemplo 22) (78 mg, 0,15 mmol) en THF (3 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio (0,222 ml, 1 M en THF, 0,22 mmol) y ácido acético glacial (0,013 ml, 0,22 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante 1 h, seguido de la adición de gel de sílice (0,5 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 9:1) para dar el producto desililado. Se disolvió el producto desililado en disolución de metanol y K₂CO₃ saturada y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante media hora. Se neutralizó la mezcla de reacción con disolución de metanol y HCl 1 N seguido de la adición de gel de sílice (0,5 g). Se sometió la suspensión acuosa resultante a cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-MeOH, 4:1) para proporcionar el producto (36 mg, el 98%) como un sólido blanco que se trituró en Et₂O-MeOH: p.f. 180°C (desc.); [α]_D²⁵ +75,7° (c, 0,56, MeOH); ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 3,69-4,50 (m, 4H), 5,18 (t, 1H, J=3,7 Hz), 5,44 (t, 1H, J=5,8 Hz), 6,25-6,29 (m, 1H), 7,55 (sa, 1H), 7,8 (sa, 1H), 8,14 (d, 1H, J=7,2 Hz); ¹³C RMN (DMSO-d₆): 61,8, 63,1, 77,1, 88,6, 126,3, 126,8, 134,4, 137,6, 153,5, 157,1, 157,3.

Con el fin de evaluar la pureza enantiomérica del producto nucleosídico final sintetizado o de resolver la mezcla racémica de los análogos de nucleósido desprotegidos, se usaron procedimientos de HPLC quiral. Por ejemplo, se encontró que el compuesto n° 4 anterior tenía un tiempo de retención de 15,07 min en las condiciones siguientes:

ES 2 286 542 T3

Tipo de columna: cyclobond™ RSP 4,6x250 nm

Caudal: 0,43 ml/min

5 Disolvente: TFAA al 0,05%, pH 7,0

Detección: 254 nm

Ejemplo 27

10

Actividad antiviral

Ensayo de formazán sobre líneas celulares resistentes a MT-4 y 3TC™

15 Se determinó actividad antiviral anti-VIH-1 en células MT-4 y células MT-4 que se habían hecho resistentes frente a 3TC™. Se infectó una suspensión de células (aproximadamente 10⁶ células/ml) en medio de crecimiento RPMI 1640 con la cepa RF de VIH-1 a una M.O.I. de 10⁻³ unidades infecciosas/célula. Se preparó una suspensión de células no infectadas en paralelo para evaluar la toxicidad inducida por el fármaco. Se incubaron las dos suspensiones durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se diluyeron en serie los compuestos de prueba en decrementos de 10 veces desde 100

20 µg/ml hasta 0,01 µg/ml (concentraciones finales en dos placas de microtitulación de 96 pocillos). Se inocularon 20 µl de la suspensión de células infectadas en cada uno de los pocillos de uno de las placas (antiviral), mientras se añadieron 20 µl de la suspensión de células sin infectar a cada pocillo de la segunda placa (citotoxicidad). Después se incubaron las placas durante 7 días a 37°C. Tras la incubación, se añadieron 10 µl de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a 20 mg/ml a todos los pocillos y se incubaron las placas durante otros 90 minutos a 37°C.

25

Después se añadieron 150 µl de Triton X-100 alcohólico al 10% (v/v) y se resuspendieron las células. Tras 15 minutos a temperatura ambiente, se analizaron las placas en un lector Multiskan MC a 405 nm. La conversión de MMT amarillo en su derivado de formazán es máxima en las células sin infectar, y está ausente en las células infectadas sin tratar. Se representaron gráficamente los valores de densidad óptica para los controles de citotoxicidad y se calcularon las dosis de los compuestos requeridos para inhibir la conversión de MMT en el 50% de los controles no infectados sin tratar. De esta manera, pueden calcularse tanto la dosis citotóxica al 50% (DC al 50%) y la dosis antiviral al 50% (DI al 50%). La tabla 1 muestra los valores de DC al 50% y DI al 50% obtenidos para:

30

TABLA 1

35

Ensayo de MT-4

40

COMPUESTO	DI ₅₀ (µg/ml)	DC ₅₀ (µg/ml)
BCH – 270 (ejemplo 7)	4,0	> 100
nº 1 (ejemplo 23)	13	> 100
nº 2 (ejemplo 24)	4,4	> 100
nº 3 (ejemplo 25)	6,0	> 100
nº 4 (ejemplo 26)	2,9	100
AZT (referencia)	0,01	> 1

50

TABLA 2

55

Células resistentes a 3TC (mutación Met¹⁸⁴ → Ile)

60

COMPUESTO	DI ₅₀ (µg/ml)	DC ₅₀ (µg/ml)
nº 1 (ejemplo 23)	8,5	> 100
nº 2 (ejemplo 24)	42	> 100
nº 3 (ejemplo 25)	3,4	> 100
nº 4 (ejemplo 26)	3,0	100
3TC™	> 100	> 100

65

Inhibición de la formación de sincitio

Se infectaron células C8166 con VIH-1 (cepa RF) a una M.O.I. de 1×10^{-3} unidades infecciosas/célula y se adsorbieron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras la adsorción, se lavaron las células tres veces en medio de crecimiento. Se añadieron alícuotas de 10^5 células a cada pocillo de las placas de 24 pocillos que contenían diluciones en serie de los compuestos de prueba a concentraciones finales de 50 $\mu\text{g/ml}$ a 0,05 $\mu\text{g/ml}$ en medio de crecimiento RPMI® 1640. También se incluyeron células infectadas sin tratar y células no infectadas sin tratar como controles. Se incubaron las placas a 37°C/5% de CO₂ durante 3-4 días en recipientes humidificados. Se examinaron las células diariamente para obtener pruebas de la formación de sincitios inducida por VIH-1. Se cuantificaron los sincitios mediante referencia a los controles infectados sin tratar, y se calcularon las dosis de los compuestos requeridos para reducir el efecto citopático en un 50% (DI₅₀).

TABLA 3

Formación de sincitios

COMPUESTO	DI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	DC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
nº 2 (ejemplo 25)	0,08	> 100
nº 3 (ejemplo 25)	0,17	> 100
nº 4 (ejemplo 26)	0,03	> 100

Ensayo de CBM

Se realizaron ensayos en células mononucleares de sangre de cordón sustancialmente tal como se describe en Gu *et al.*, J. Virol. (1992), 66:7128-7135.

Resumiendo, se pasaron los virus (HTLV-IIIb) que se habían crecido inicialmente en células MT-4 células a células mononucleares de sangre de cordón (CBM, cord blood mononuclear cells) estimuladas previamente con fitohemaglutinina. Para análisis posteriores, se pretrataron las muestras de CBM (5×10^5 células por ml) con diversas concentraciones de los diferentes compuestos durante 4 h y después se inocularon con HIV-1 crecido en CBL a una multiplicidad de infección de 1,0 en la concentración del compuesto usado durante el pretratamiento. Se añadió medio nuevo, incluyendo la concentración apropiada del compuesto tres veces semanalmente, y se añadieron CBM estimuladas previamente con fitohemaglutinina (5×10^5 células por ml) a intervalos de 2 días. Se determinó el cálculo de la CI₅₀ basándose en los niveles de TA en los fluidos de cultivo tal como se describe en Gao *et al.*, (1992), J. Virol. 66: 12-19.

TABLA 4

CBM

COMPUESTO	DI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	DC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
BCH – 270 (ejemplo 7)	0,03	> 23
nº 1 (ejemplo 23)	0,05-1,22	> 23
nº 2 (ejemplo 24)	0,03-1,22	> 23
nº 3 (ejemplo 25)	0,002-0,05	> 23
nº 4 (ejemplo 26)	0,02-0,05	> 23
AZT (referencia)	< 0,002	> 1

Determinación de la CI₅₀ (mM) en diferentes aislados mutados de VIH-1 en presencia de diferentes compuestos antivirales

El procedimiento es similar al procedimiento usado en el ensayo de CBM, con la excepción de que se usaron virus contruidos y virus mutados contruidos.

Los virus contruidos HXB2D-65 corresponden a la mutación de resistencia a ddC y los virus contruidos HXB2D-184 corresponden a la mutación de resistencia a 3TC™ y FTC.

TABLA 5

Valores de CI_{50} en CBMC con diferentes aislados mutados de VIH-1

COMPUESTOS	IIIB	HXB2D	HXB2D-65 → R	K m → w	HXB2D-184
n° 1	0,22	1,0	2,5		0,53
n° 2	0,28	0,1	3,5		3,0
n° 3	0,83	3,0	11,5		9,0
n° 4	0,34	3,0	6,5		2,0
AZT	0,002	0,002	0,001		0,001
3TC™	0,01	0,08	0,125		42,5

Determinación de la CI_{50} (μM) en líneas celulares infectadas de manera aguda por VIH-1 en presencia de diferentes compuestos antivirales

Se infectaron varias líneas celulares con HTLV-IIIb (TCID₅₀ = 200) y después se cultivaron con diversas concentraciones de fármaco. Se determinó la CI_{50} midiendo los niveles de antígeno p24 en el sobrenadante de los cultivos en el día 6 de la infección.

TABLA 6

COMPUESTO	DI_{50} ($\mu g/ml$)				
	MT-4	Jurkat	H9	U937	CEM
n° 1 (ejemplo 23)	2,8	3,0	0,3	0,4	0,2
n° 2 (ejemplo 24)	0,9	1,8	0,075	0,3	0,4
n° 3 (ejemplo 25)	3,0	3,5	0,1	0,6	0,2
n° 4 (ejemplo 26)	3,2	6,0	1,0	0,4	0,3
AZT (referencia)	0,005	0,01	0,07	0,04	0,01

Evaluación de la dosis inhibitoria de cultivo celular ($CCID_{50}$)

Se determinó el crecimiento celular mediante el recuento celular y la viabilidad mediante exclusión con azul tripán 7 días tras el tratamiento con el fármaco. $CCID_{50}$ se expresa como la concentración de fármaco que inhibe el 50% del crecimiento celular.

TABLA 7

 $CCID_{50}$ en diferentes células (μM)

COMPUESTOS	CBMC	MT-4	U937	Jurkat	H9	CEM
n° 1 (ejemplo 23)	> 500	> 500	> 500	450	> 500	> 500
n° 2 (ejemplo 24)	105	> 500	22	11	> 500	103
n° 3 (ejemplo 25)	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
n° 4 (ejemplo 26)	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
AZT	45	110	110	> 500	200	500

Inhibición del virus de la hepatitis B humano

El procedimiento usado durante esta prueba se describe en detalle en Korba *et al.*, Antiviral Research 15, 217-228 (1992) que se describe brevemente tal como sigue:

Se hicieron crecer células Hep G2 transfectadas con ADN genómico del virus de la hepatitis B humano (células 2.2.15) y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 5%, glutamina 2 mM y gentamicina sulfato 50 µg/ml, y se comprobó de manera rutinaria la resistencia a G418. Se hicieron crecer los cultivos de células 2.2.15 hasta confluencia en placas de cultivo tisular de 24 pocillos y se mantuvieron durante de 2 a 3 días en ese estado antes del tratamiento con el fármaco.

Se disolvieron los fármacos en agua estéril o DMSO al 50% estéril en agua a concentraciones 100 veces superiores a la concentración de prueba más alta. Se diluyeron estas disoluciones según fue necesario en el medio de cultivo.

Se cambió el medio de cultivo en las células confluentes 24 horas antes de la exposición a los compuestos de prueba. Durante el tratamiento de 10 días, se cambió el medio de cultivo diariamente. 10 días tras el tratamiento, se recogió el medio de cultivo y se congeló a -70°C durante el análisis del ADN del VHB.

Para analizar el ADN de VHB extracelular, se incubaron muestras de 0,2 ml de medio de cultivo durante 20 minutos a 25°C en NaOH 1 M/10X SSC (1X SSC es NaCl 0,15 M/ citrato de sodio 0,015 M, pH 7,2) y después se aplicaron a membranas de nitrocelulosa empapadas previamente en 20X SSC. Después se aclararon los filtros en 2X SSC y secaron en estufa a 80°C durante 1 hora a vacío.

Se marcó un fragmento de ADN de VHB de EcoRI de 3,2 kb purificado con [32P]dCTP mediante traducción de mellas y se usó una sonda para detectar el ADN de VHB en la inmunotransferencia puntual mediante hibridación de ADN. Tras el lavado, se secó la inmunotransferencia hibridada y se cuantificó el ³²P usando un escáner Ambis beta.

TABLA 8

VHB

COMPUESTO	DI₅₀ (µg/ml)	DC₅₀ (µg/ml)
BCH-270 (ejemplo 7)	7,5	> 10
Compuesto nº 2 (ejemplo 24)	4	> 10

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo constituido por

(a) 2R-hidroximetil-4R-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano;

(b) 2S-hidroximetil-4S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano;

(c) cualquier combinación de los isómeros (a) y (b);

(d) 2R-hidroximetil-4R-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano;

(e) 2S-hidroximetil-4S-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano;

(f) cualquier combinación de los isómeros (d) y (e); y

(g) las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los compuestos anteriores,

en una cantidad eficaz para tratar infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana resistentes a 2R-hidroximetil-5S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano y 2-hidroximetil-5-(S'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano, en la que dicha formulación farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, otro agente terapéutico, y en la que dicha formulación farmacéutica está en una forma adecuada para su administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para su administración mediante inhalación o insuflación.

2. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es 2R-hidroximetil-4R-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad eficaz para tratar infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana resistentes a 2R-hidroximetil-5S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano y 2-hidroximetil-5-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano.

3. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es 2S-hidroximetil-4S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad eficaz para tratar infecciones por virus de la inmunodeficiencia humana resistentes a 2R-hidroximetil-5S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano y 2-hidroximetil-5-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano.

4. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es 2R-hidroximetil-4R-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad eficaz para tratar una infección por el virus de la hepatitis B en mamíferos.

5. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el compuesto es 2S-hidroximetil-4S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad eficaz para tratar una infección por virus de la hepatitis B en mamíferos.

6. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que dicha formulación farmacéutica está en una forma adecuada para su administración oral o parenteral.

7. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que dicha formulación farmacéutica está en una forma adecuada para su administración oral, tal como una cápsula, cachet, comprimido (incluyendo comprimido recubierto), polvo, gránulos, disolución, suspensión (incluyendo suspensión acuosa u oleosa), emulsión, bolo, electuario, pasta, jarabe, elixir o puede presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

8. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que dicha formulación farmacéutica está en una forma adecuada para su administración parenteral, tales como un inyectable, por ejemplo inyección en bolo o infusión continua, ampolla, jeringuillas rellenas previamente, infusión de volumen pequeño, en un recipiente de múltiples dosis con un conservante, suspensión, disolución, emulsión (incluyendo una emulsión en un vehículo oleoso o acuoso) añadidos, o puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo agua estéril, libre de pirógeno) antes de su uso.

9. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que el otro agente terapéutico es un agente antiviral.

10. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, que contiene 10-1500 mg de dicho compuesto por dosificación.

11. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, que contiene 20-1000 mg de dicho compuesto por dosificación.

12. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, que contiene 50-700 mg de dicho compuesto por dosificación.

13. Una formulación farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que dicho otro agente terapéutico es un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleosídico o un análogo de nucleósido o un inhibidor del transporte de nucleósidos o un inmunomodulador.

14. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 13, en la que el análogo de nucleósido se selecciona de 2R-hidroximetil-5S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano (3TCTM), 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-didesoxiciditina (ddc) y 2',3'-didesoxiinosina (ddI).

15. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 14, en la que dicho otro agente terapéutico es 2R-hidroximetil-5S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano.

16. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 14, en la que dicho otro agente terapéutico es 3'-azido-3'-desoxitimidina.

17. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 14, en la que dicho otro agente terapéutico es 2',3'-didesoxiciditina.

18. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 14, en la que dicho otro agente terapéutico es 2',3'-didesoxiinosina.

19. El uso de una formulación farmacéutica según la reivindicación 1 para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de infecciones por virus de la inmunodeficiencia humana, en el que dichas infecciones virales son resistentes a 2R-hidroximetil-5S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano y 2-hidroximetil-5-(5'-fluorocitosin-1'-il)-1,3-oxatiolano o para el tratamiento de una infección por virus de la hepatitis B en mamíferos.

20. El uso según la reivindicación 19, en el que el mamífero es un ser humano.

21. Una formulación farmacéutica para su administración oral que comprende un compuesto eficaz para el tratamiento de infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana en un mamífero seleccionado del grupo constituido por

- (a) 2R-hidroximetil-4R-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano;
- (b) 2S-hidroximetil-4S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano; y
- (c) una sal o éster farmacéuticamente aceptable de (a) o (b),

en una cantidad eficaz para tratar dicha infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, y un excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo constituido por agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos, conservantes y combinaciones de los mismos.

22. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 21, en la que la cantidad del compuesto está entre 10 y 1500 mg.

23. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 22, en la que tras su administración oral a un mamífero se obtiene una concentración en plasma del compuesto entre 1 μ M y 75 μ M.

24. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 21 que comprende además un agente terapéutico seleccionado del grupo constituido por 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2R-hidroximetil-5S-(citosin-1'-il)-1,3-oxatiolano (3TC), 2',3'-didesoxiciditina (ddC), y 2',3'-didesoxiinosina (ddI).

25. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 24, en la que dicho agente terapéutico es AZT.

26. Una formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en la que la formulación está en forma sólida o forma líquida.

27. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 26, en la que la forma sólida es un comprimido o una cápsula adecuada para su administración oral.

28. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 26, en la que la forma líquida se selecciona del grupo constituido por suspensiones acuosas, suspensiones oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes y elixires adecuados para su administración oral.