



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 892**

51 Int. Cl.:
C07H 19/16 (2006.01)
C07H 19/173 (2006.01)
C07H 19/20 (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05006326 .2**
86 Fecha de presentación : **23.03.2005**
87 Número de publicación de la solicitud: **1589026**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Derivados de 2-haloadenosina 4'-C-sustituída.**

30 Prioridad: **24.03.2004 JP 2004-87198**
10.09.2004 JP 2004-263409

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **YAMASA CORPORATION**
10-1, Araoicho 2-chome
Choshi-shi, Chiba 288-0056, JP

72 Inventor/es: **Kohgo, Satoru;**
Ohrai, Hiroshi;
Kodama, Eiichi;
Matsuoka, Masao y
Mitsuya, Hiroaki

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 300 892 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de 2-haloadenosina 4'-C-sustituída.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

Esta invención se refiere a derivados de 2-haloadenosina 4'-C-sustituída y su uso como medicina, en particular una
10 medicina que es útil para el tratamiento del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Antecedentes de la técnica

El escenario clínico del SIDA ha cambiado tremendamente por la terapia de combinación de múltiples fármacos,
15 que a veces se denomina terapia antirretrovírica de alta potencia, o HAART ("highly active antiretroviral therapy").
En la HAART, se emplean en combinación inhibidores de la nucleósido transcriptasa inversa (NRTI), tales como zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T) y lamivudina (3TC), e inhibidores de proteasas (PI).

Aunque la HAART ha disminuido drásticamente el número de muertes provocadas por el SIDA, ha surgido un mutante del VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana-1) resistente a múltiples fármacos que muestra una resistencia cruzada a diversos fármacos. Por ejemplo, a principios de los noventa, los paciente infectados por VIH que mostraban resistencia a AZT y 3TC a la vez eran muy raros, mientras que en 1995-1996, el porcentaje de pacientes con SIDA infectados con este VIH llegó a ser tan alto como 42%.

Ohruí *et al.* sintetizaron los 2'-desoxi-4'-C-etinil nucleósidos y ensayaron su actividad anti-VIH y, como resultado, descubrieron que un 2'-desoxi-4'-C-etinil nucleósido que tiene una estructura específica muestra una potente actividad anti-VIH, igual o mayor que la de la AZT, y presenta una actividad antivírica eficaz contra una cepa vírica resistente a múltiples fármacos que muestra resistencia a diversos fármacos anti-VIH, tales como AZT, ddI, ddC, d4T y 3TC (véase, por ejemplo, Nucleic Acids. Symp. Ser., enero 2000, (44):105-106; J. Med. Chem., noviembre 2000, 43(23):4516-4525; Curr. Drug Targets Infect. Disord, mayo 2001, 1(1):1-10; Antimicrob. Agents Chemother., mayo 2001, 45:1539-1546; Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, mayo 2003, 22(5-8):887-889; documentos WO 00/69876, WO 00/69877 y WO 03/68796).

Los presentes inventores han evaluado la toxicidad *in vitro* de derivados de nucleósidos de 4'-C-etinilpurina y derivados de nucleósidos de 4'-C-cianopurina que, entre una diversidad de nucleósidos 4'-C-sustituídos, muestran una actividad anti-VIH particularmente potente. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que: (1) los derivados de 2,6-diaminopurina y los derivados de guanina, que muestran la actividad anti-VIH más potente, muestran toxicidad *in vitro* e *in vivo*; y (2) los derivados de adenina, que muestran menos toxicidad, son convertidos con facilidad en derivados de hipoxantina en la sangre por la adenosina desaminasa, debilitando, con ello, la actividad anti-VIH de los derivados.

Para lograr una mayor potenciación del índice de selectividad, es decir, (concentración en la cual se obtiene citotoxicidad)/(concentración en la cual se obtiene actividad anti-VIH), y para proporcionar resistencia a la inactivación por la adenosina desaminasa, los presentes inventores han sintetizado una diversidad de derivados mediante la modificación química de una 2'-desoxiadenosina 4'-C-sustituída (un compuesto de cabeza) que, entre diversos nucleósidos de purina 4'-C-sustituída, muestra una potente actividad anti-VIH y menor toxicidad.

Se sabe que cuando un átomo de halógeno, que muestra atracción por los electrones, se introduce en la posición 2 del resto base de un derivado de adenosina, el derivado resultante muestra un cierto nivel de resistencia a la inactivación por la adenosina desaminasa (Chem. Pharm. Bull., 42(1994), p. 1688; J. Med. Chem., 39(1996), p. 3847). Sin embargo, sigue sin saberse si se puede mejorar o no el índice de selectividad mediante la introducción de un átomo de halógeno.

Sólo una referencia bibliográfica indica que la introducción de un grupo etinilo en la posición 4' de d4T (estavudina: 2',3'-dideshidro-3'-desoxitimidina) potencia el índice de selectividad de d4T (Bioorg. Med. Chem. Lett., noviembre 2003, 13(21):3775-3777). Sin embargo, no se esperan obtener efectos similares a los de la d4T en un derivado de adenosina, que es un nucleósido de purina, cuyo esqueleto básico se diferencia considerablemente del de la d4T y, por tanto, esta referencia bibliográfica no proporciona información útil para los objetivos de los presentes inventores.

60 **Sumario de la invención**

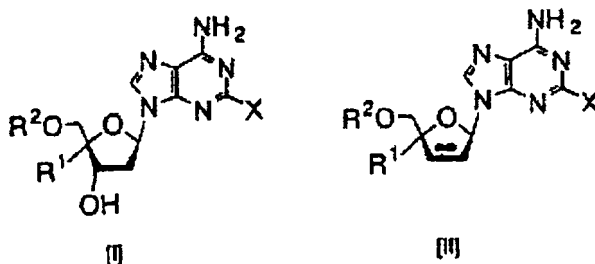
Los presentes inventores han realizado estudios sobre la actividad anti-VIH, etc., de los derivados recién sintetizados, y han descubierto que la 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (que se obtiene introduciendo un átomo de flúor en la posición 2 del resto base de la 2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina (es decir, el compuesto de cabeza)), muestra resistencia frente a la inactivación por adenosina desaminasa, tiene una potente actividad antivírica contra una cepa de virus resistente a múltiples fármacos que muestra resistencia frente a diversos fármacos anti-VIH, tales como AZT, ddI, ddC, d4T y 3CT, y muestra una actividad anti-VIH potenciada y considerablemente menor citotoxicidad.

ES 2 300 892 T3

Basándose en este descubrimiento, los presentes inventores han sintetizado una diversidad de derivados de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida, estando formados cada uno de 2-haloadenosina (resto base) y un resto azúcar que tiene un grupo etinilo o ciano en la posición 4, y han ensayado las actividades biológicas de los derivados sintetizados de esta manera. La presente invención se ha logrado basándose en los resultados del ensayo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona

(1) un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida representado por la siguiente fórmula (I) o (II):



en la que X representa un átomo de halógeno, R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano, y R² representa hidrógeno, o un resto fosfato o su resto derivado seleccionado del grupo que consiste en un monofosfato, un difosfato, un trifosfato, un fosfonato, un poliéster de fosfato, un amidato de fosfato, un fosforotioato, un fosforoselenoato, o un fosforoboranoato;

(2) una composición farmacéutica que contiene un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida como se definió en (1) anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para éste; y

(3) el uso de un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida como se definió en (1) anteriormente, o una composición farmacéutica que contiene el derivado, para preparar un medicamento para tratar el SIDA.

Tal como se muestra en los ejemplos de ensayo proporcionados en la presente a continuación, los compuestos de la presente invención (por ejemplo, 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina) muestran resistencia frente a la inactivación por adenosina desaminasa, tienen una potente actividad antivírica contra una cepa de virus resistente a múltiples fármacos que muestra resistencia frente a diversos fármacos anti-VIH, tales como AZT, ddI, ddC, d4T y 3CT, y muestran una actividad anti-VIH inesperadamente potenciada; de forma específica, muestran una actividad anti-VIH mayor en un factor de 144 que la de la 2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina (es decir, el compuesto de cabeza), y muestran considerablemente menor citotoxicidad. Por tanto, de manera sorprendente, los compuestos de la presente invención muestran un índice de selectividad de 110.000, que es considerablemente mayor que el de la 2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina (EdAdo) (es decir, 1.630).

Tal como se describió anteriormente, los compuestos de la presente invención muestran una excelente actividad anti-VIH, en particular contra una cepa de VIH resistente a múltiples fármacos que presenta resistencia frente a diversos fármacos anti-VIH, tales como AZT, DDI, DDC, D4T y 3TC, muestran menos citotoxicidad, y muestran resistencia frente a la inactivación por la adenosina desaminasa. Por tanto, se prevé que los compuestos de la presente invención se desarrollarán para producir productos farmacéuticos, en particular fármacos para tratar el SIDA.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estabilidad de los compuestos frente a una reacción de desamidación inducida por la adenosina desaminasa. Los cuadrados negros muestran los resultados obtenidos con la 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (un compuesto de la presente invención), mientras que los círculos negros muestran los resultados obtenidos con la 2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina (un compuesto conocido);

la figura 2 muestra la estabilidad de la 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (un compuesto de la presente invención) bajo condiciones ácidas;

la figura 3 muestra la estabilidad de la 2',3'-didesoxiadenosina (ddAdo, un compuesto conocido) bajo condiciones ácidas; y

la figura 4 muestra los cambios en el peso corporal de ratones, medidos después de la administración de 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (un compuesto de la presente invención). En la figura 4, la gráfica A muestra los resultados obtenidos de la administración oral, y la gráfica B muestra los resultados obtenidos de la inyección intravenosa. En ambas gráficas, los círculos blancos muestran los resultados de la administración de un placebo, y los triángulos y cuadrados corresponden a una dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas**(1) Compuestos**

5 Los compuestos de la presente invención están representados por las fórmulas (I) y (II). Los ejemplos del resto fosfato representado por R² en estas fórmulas incluyen un resto monofosfato, un resto difosfato, un resto trifosfato y un fosfonato; y los ejemplos del resto derivado de fosfato incluyen poliésteres de fosfato (por ejemplo, un diéster de fosfato y un triéster de fosfato), amidatos de fosfato (por ejemplo, un monoamidato de fosfato y un diamidato de fosfato), fosforotioato, fosforoselenoato y fosforoboranoato. Los ejemplos de los átomos de halógeno representados por X incluyen bromo, yodo, flúor y cloro.

De estos compuestos, los preferidos son aquéllos que satisfacen uno o más de los siguientes requerimientos: (a) R² es hidrógeno o fosfonato; (b) X es flúor o cloro; y (c) R¹ es un grupo etinilo. Los ejemplos específicos de compuestos preferidos se indican a continuación:

15 *Compuestos representados por la fórmula (I): 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina, 4'-C-ciano-2'-desoxi-2-fluoroadenosina, 2-cloro-2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina, y 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina 5'-H-fosfonato.*

20 *Compuestos representados por la fórmula (II): 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina, 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-ciano-2-fluoro-adenosina, 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-cloro-adenosina, y 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina 5'-H-fosfonato.*

Los compuestos de la presente invención pueden ser sales, hidratos o solvatos. Cuando R² es hidrógeno, los ejemplos de sales incluyen aductos de ácidos, tales como clorhidratos y sulfatos; y cuando R² es un resto fosfato, los ejemplos de sales incluyen sales de metales alcalinos, tales como sales sódicas, sales potásicas, y sales líticas; sales de metal alcalino-térreo, tales como sales cálcicas; y sales de amonio, y cualquiera de estas sales puede utilizarse con la condición de que sea farmacéuticamente aceptable.

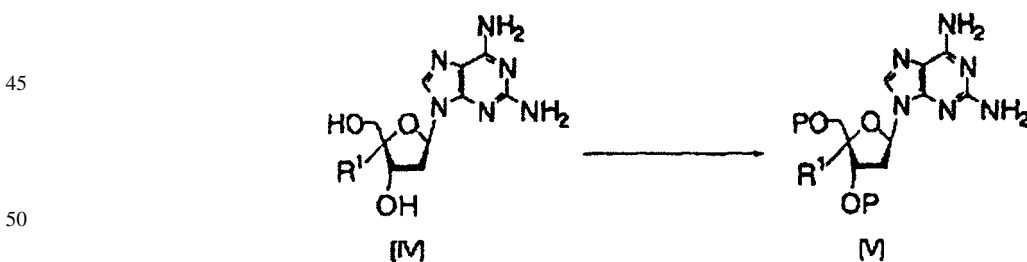
Los ejemplos de hidratos o solvatos incluyen los aductos formados combinando una molécula del compuesto de la presente invención, o su sal, y 0,1-3,0 moléculas de agua o un disolvente. Además, los compuestos de la presente invención incluyen una diversidad de sus isómeros, tales como los tautómeros.

(2) Procedimiento de producción

35 Los compuestos (I) de la presente invención pueden producirse a través de las etapas descritas a continuación.

Primera etapa

40 En la primera etapa, los grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 5' de un compuesto representado por la fórmula (IV) se protegen para producir, con ello, un compuesto representado por la fórmula (V):



55 (en la que P representa un grupo protector, y R¹ represente un grupo etinilo o un grupo ciano).

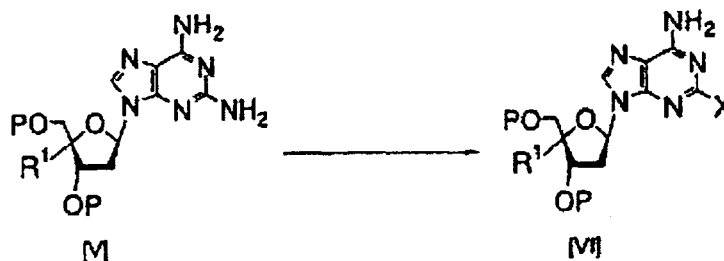
El compuesto (IV) (es decir, el material de partida) es un compuesto conocido; de forma específica, un compuesto en el que R¹ es un grupo etinilo (J. Med. Chem., 43, 4516-4525 (2000)), o un compuesto en el que R¹ es un grupo ciano (documento WO 03/68796).

60 Los grupos protectores representados por P, que protegen a los grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 5', pueden ser aquellos grupos que se emplean, en general, para proteger un grupo hidroxilo. Los ejemplos de tipos de grupos protectores incluyen un tipo éter, un tipo acilo, un tipo sililo, y un tipo acetal. Los ejemplos específicos de grupos protectores que pueden emplearse incluyen grupos protectores de tipo éter, tales como éter metílico, éter terc-butílico, éter bencílico, éter metoxibencílico y éter tritílico; grupos protectores de tipo acilo, tales como acetilo, benzoilo y pivaloilo; grupos protectores de tipo sililo, tales como t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trimetilsililo y trietilsililo; y grupos protectores de tipo acetal, tales como isopropilideno, etilideno, metilideno, bencilideno, tetrahidropiraniolo y metoximetilo.

La introducción de un grupo protector se realiza mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, en un disolvente orgánico, tal como piridina, acetonitrilo o dimetilformamida, un compuesto (IV) se deja reaccionar con un agente protector (haluro de alquilo, haluro de ácido, anhídrido de ácido o haluro de alquilsililo) en presencia de una base, tal como alcóxido metálico, trietilamina, 4-dimetilaminopiridina o imidazol, de -10°C a 100°C.

Segunda etapa

En la segunda etapa, el grupo amino en la posición 2 del compuesto (V) se convierte en un átomo de halógeno para producir, con ello, un compuesto representado por la fórmula (VI):



(en la que P representa un grupo protector, X representa un átomo de halógeno, y R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano).

El compuesto (VI) puede sintetizarse mediante el siguiente procedimiento: después de tratar al grupo amino en la posición 2 del compuesto (V) con un derivado de nitrito, se introduce un átomo de halógeno en la posición 2 del resto base mediante el uso de un reactivo de halógeno; o los grupos amino en las posiciones 2 y 6 se tratan bajo las mismas condiciones, formando, con ello, un derivado de 2,6-dihalopurina, y el átomo de halógeno en la posición 6 del resto base se convierte en un grupo amino mediante un tratamiento con amoniaco.

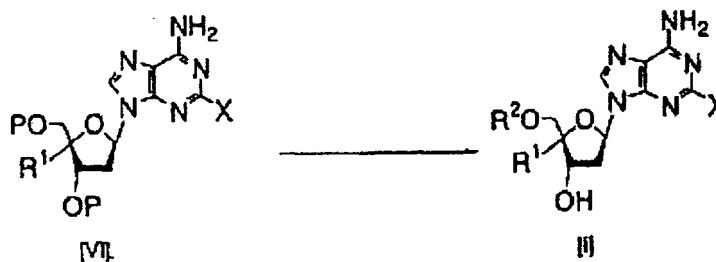
Los ejemplos de reactivos para sustituir el grupo amino en la posición 2 del compuesto (V) por flúor incluyen nitrito de sodio en ácido tetrafluorborónico; y un éster de ácido nitroso (por ejemplo, nitrito de terc-butilo) en fluoruro de hidrógeno-piridina.

Las condiciones de reacción varían dependiendo del reactivo empleado. Por ejemplo, cuando se emplea nitrito de t-butilo en fluoruro de hidrógeno-piridina, el nitrito de t-butilo (de 1 a 3 moles) se añade al compuesto (V) en fluoruro de hidrógeno-piridina como disolvente, y la mezcla resultante se deja reaccionar de -50°C a la temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente cinco horas. Cuando el compuesto (V) forma un derivado de 2,6-difluoropurina, el derivado resultante se trata con amoniaco acuoso en un disolvente orgánico, tal como dioxano o metanol.

Los ejemplos de reactivos para sustituir el grupo amino en la posición 2 del compuesto (V) por cloro incluyen una combinación de tricloruro de antimonio y nitrito de t-butilo, y una combinación de cloruro de acetilo y nitrito de benciltrietilamonio, empleándose dichas combinaciones en un disolvente orgánico, tal como diclorometano.

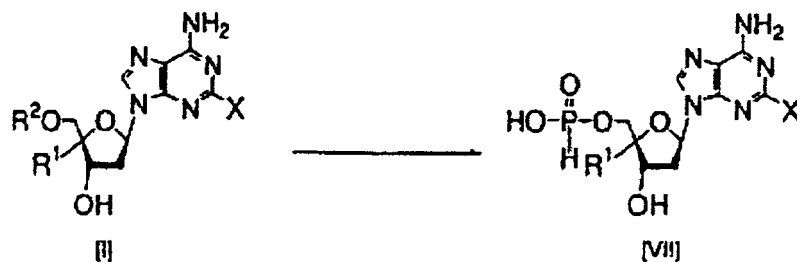
Las condiciones de reacción varían dependiendo del reactivo empleado. Por ejemplo, cuando se emplea una combinación de cloruro de acetilo y nitrito de benciltrietilamonio como reactivo, en un disolvente orgánico, tal como diclorometano, se trata el nitrito de benciltrietilamonio (de 1 a 5 mol) con cloruro de acetilo (de 1 a 5 mol) de -50°C a la temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente tres horas, y la mezcla resultante se deja reaccionar con el compuesto (V) (1 mol) de -50°C a la temperatura ambiente durante una hora a unos pocos días. Cuando el compuesto (V) forma un derivado de 2,6-cloropurina, el derivado resultante se trata con amoniaco acuoso en un disolvente orgánico, tal como dioxano o metanol.

Los grupos protectores del compuesto obtenido de esta manera (VI) se retiran para producir, con ello, el compuesto de la presente invención, en el que R² es hidrógeno y, si se desea, el compuesto se fosforila:



(en la que P representa un grupo protector, X representa un átomo de halógeno, R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano, y R² representa hidrógeno, un resto fosfato, o un resto derivado de fosfato).

Los grupos protectores pueden retirarse mediante una técnica que se selecciona de forma apropiada entre las técnicas típicas (por ejemplo, hidrólisis bajo condiciones ácidas, hidrólisis bajo condiciones alcalinas, tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio, y reducción catalítica), según los grupos protectores empleados:



15 (en la que X representa un átomo de halógeno, R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano, y R² representa hidrógeno).

20 Para producir el derivado de 5'-H-fosfonato (VII) (el compuesto de la presente invención), el compuesto (I), en el que R² es hidrógeno, y el ácido fosfónico se someten a una condensación en un disolvente orgánico mediante el uso de un agente de condensación apropiado. Los ejemplos de disolvente orgánico que pueden emplearse incluyen piridina y dimetilformamida en presencia de una base, tal como trietilamina. Los ejemplos del agente de condensación que puede emplearse incluyen carbodiimidas, tales como dicitclohexil carbodiimida, diisopropil carbodiimida, y carbodiimida soluble en agua; haluros de ácido sulfónico, tal como cloruro de toluensulfonilo; y cloruros de fosfatos, tales como cloruro de difenilfosfato.

25 Las condiciones de reacción varían dependiendo del reactivo empleado. Por ejemplo, cuando se emplea la dicitclohexil carbodiimida en piridina, se añaden ácido fosfónico (de 1 a 5 mol) y dicitclohexil carbodiimida (de 1 a 10 ml) a 1 mol del compuesto (I), y la mezcla resultante se deja reaccionar de 0°C a 50°C durante aproximadamente una a aproximadamente 24 horas.

30 Cuando se va a producir un compuesto en el que R² es un monofosfato, un compuesto en el que R² es hidrógeno se hace reaccionar con un agente fosforilante; por ejemplo, oxiclóruo de fósforo o ácido tetracloropirofosfórico, que fosforila, de forma selectiva, la posición 5' de un nucleósido. Cuando se va a producir un compuesto en el que R² es un difosfato o trifosfato, el correspondiente compuesto de 5'-monofosfato se activa en forma de fosfoimidazolida, fosfomorfolidato, o difenilfosfato anhidro, y el compuesto activado de esta manera se hace reaccionar con ácido fosfórico, ácido pirofosfórico, o su sal adecuada, para producir, con ello, un compuesto diana en forma de sal o ácido libre.

40 Los compuestos (II) de la presente invención pueden producirse mediante las etapas descritas a continuación:

Primera etapa

45 En la primera etapa, el grupo hidroxilo en la posición 5' de un compuesto representado por la fórmula (I), en la que R² es hidrógeno, se protege de forma selectiva, para producir, con ello, un compuesto representado por la fórmula (VIII):



60 (en la que P representa un grupo protector, X representa un átomo de halógeno, R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano, y R² representa hidrógeno).

65 El grupo protector representado por P, que protege al grupo hidroxilo en la posición 5', puede ser un grupo protector que se emplee, en general, para proteger un grupo hidroxilo primario de forma selectiva. Los ejemplos específicos del grupo protector incluyen un grupo trimetoxitritilo, un grupo dimetoxitritilo, un grupo metoxitritilo, un grupo tritilo, un grupo t-butildimetilsililo, un grupo t-butildifenilsililo, y un grupo benzofilo.

La introducción del grupo protector puede realizarse de una manera similar a la empleada para el compuesto (V).

Segunda etapa

En la segunda etapa, el grupo hidroxilo en la posición 3' del compuesto (VIII) se somete a una deshidratación, formando un doble enlace 2',3'-carbono-carbono, para producir, con ello, un compuesto representado por la fórmula (VIV):

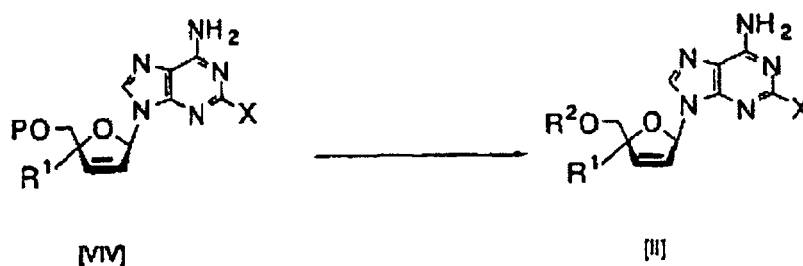


(en la que P representa un grupo protector, X representa un átomo de halógeno, y R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano).

Para producir el compuesto (VIV) mediante la deshidratación del grupo hidroxilo en la posición 3' del compuesto (VIII), el grupo hidroxilo en la posición 3' del compuesto (VIII) se convierte en un grupo funcional que puede retirarse, tal como un grupo sulfonato (por ejemplo, un grupo metansulfonato, un grupo clorometansulfonato, un grupo toluensulfonato, o un grupo trifluorometansulfonato) o un átomo de halógeno, y el grupo convertido de esta manera se retira mediante un tratamiento con una base.

Las condiciones de reacción varían dependiendo del reactivo empleado. Por ejemplo, en el caso de una reacción a través de la formación de un trifluorometansulfonato, se añaden anhídrido trifluorometansulfónico (de 1 a 5 mol) y una base (por ejemplo, piridina o trietilamina) (de 5 a 10 mol) al compuesto (VIII) en un disolvente orgánico, tal como diclorometano o piridina, y la mezcla resultante se deja reaccionar de -78°C a la temperatura ambiente durante aproximadamente una a aproximadamente 24 horas.

El grupo protector del compuesto obtenido de esta manera (VIV) se retira, para producir, con ello, el compuesto de la presente invención, en el que R² es hidrógeno y, si se desea, el compuesto se fosforila:



(en la que X representa un átomo de halógeno, P representa un grupo protector, R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano, y R² representa hidrógeno, un resto fosfato, o un resto derivado de fosfato).

El grupo protector puede retirarse mediante una técnica que se selecciona de forma apropiada entre las técnicas típicas (por ejemplo, hidrólisis bajo condiciones ácidas, hidrólisis bajo condiciones alcalinas, tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio, y reducción catalítica) según el grupo protector empleado.

Un compuesto en el que R² es un resto fosfato o su derivado puede sintetizarse de una manera similar a la del compuesto (I).

Los compuestos de la presente invención pueden aislarse y purificarse mediante procedimientos convencionales, en una combinación apropiada, que se emplean para aislar y purificar nucleósidos y nucleótidos; por ejemplo, recristalización, cromatografía de intercambio iónico en columna, y cromatografía de adsorción en columna. Los compuestos obtenidos de esta manera pueden convertirse después en sus sales según las necesidades.

(3) *Uso*

Como se muestra en los ejemplos de ensayo que se describen a continuación, los compuestos de la presente invención muestran una excelente actividad antivírica contra retrovirus. Por tanto, las composiciones de la presente invención que contienen uno de los compuestos de la invención como ingrediente activo pueden utilizarse en el campo de los fármacos terapéuticos. De manera específica, las composiciones de la presente invención son útiles para el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por un retrovirus, en particular SIDA, que está provocado por la infección con VIH.

La dosis de los compuestos de la presente invención depende y se determina considerando condiciones tales como la edad, peso corporal, y tipo de enfermedad del paciente; la gravedad de la enfermedad; la tolerancia al fármaco; y la vía de administración. Sin embargo, se ha determinado que la dosis diaria se encuentra, de forma típica, entre 0,00001-1.000 mg/kg, preferiblemente 0,0001-100 mg/kg de peso corporal. Los compuestos se administran en una única dosis o en dosis divididas.

Puede emplearse cualquier vía de administración, y los compuestos pueden administrarse por vía oral, parenteral, entérica o tópica.

Cuando se prepara un producto farmacéutico a partir de los compuestos de la presente invención, los compuestos se mezclan, de forma típica, con aditivos empleados habitualmente, tales como un vehículo y un excipiente. Los ejemplos de vehículos sólidos incluyen lactosa, caolín, sacarosa, celulosa cristalina, almidón de maíz, talco, agar, pectina, ácido esteárico, estearato de magnesio, lecitina y cloruro de sodio. Los ejemplos de vehículos líquidos incluyen glicerina, aceite de cacahuete, polivinilpirrolidona, aceite de oliva, etanol, alcohol bencílico, propilenglicol y agua.

La forma del producto se elige de manera arbitraria. Cuando el vehículo es sólido, los ejemplos de formas del producto incluyen comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, supositorios y trociscos, mientras que cuando es líquido, los ejemplos incluyen jarabes, emulsiones, cápsulas de gelatina blanda, cremas, geles, pastas, pulverizados e inyecciones.

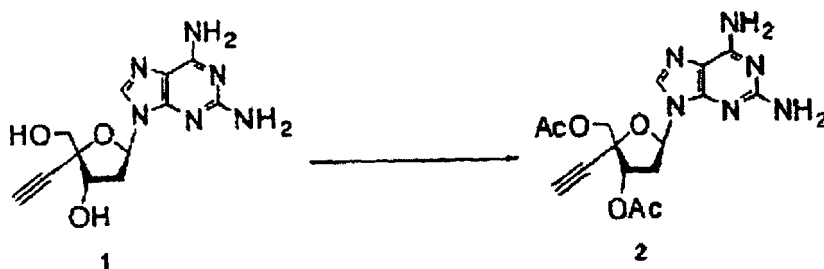
30 **Ejemplos**

La presente invención se describirá en detalle a continuación mediante ejemplos, que incluyen ejemplos de síntesis, ejemplos de ensayo, y ejemplos de preparación de fármacos, que no deben considerarse como limitantes de la invención.

Ejemplo de síntesis 1

Síntesis de 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (compuesto 4)

(1) Síntesis de 9-(3,5-di-O-acetil-2-desoxi-4-C-etinil-β-D-ribofuranosil)-2,6-diaminopurina (compuesto 2)



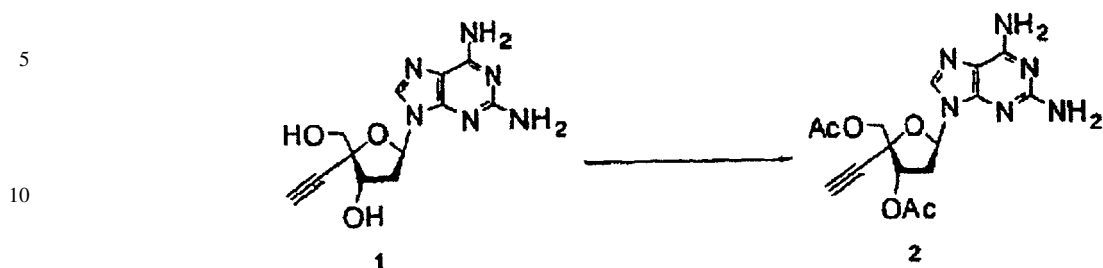
El compuesto 1 (0,33 g, 1,14 mmol) se suspendió en acetonitrilo (10,0 ml), y se añadieron anhídrido acético (0,23 ml, 2,43 mmol), trietilamina (0,67 g, 4,81 mmol) y una pequeña cantidad de 4-dimetilaminopiridina a la suspensión resultante, seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche.

Los cristales precipitados de esta manera se filtraron y se secaron para producir, con ello, el compuesto 2 (0,40 g, 1,07 mmol, 93,9%).

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 7,94 (1H, s, H-8), 6,76 (2H, sa, NH₂), 6,27 (1H, t, H-1', J = 7,00), 5,84 (2H, sa, NH₂), 5,60 (1H, dd, H-3', J = 4,00, 6,80), 4,46 (1H, d, H-5'a, J = 11,5), 4,21 (1H, d, H-5'b, J = 11,5), 3,74 (1H, s, etinilo), 3,12 (1H, m, H-2'a), 2,52 (1H, m, H-2'b), 2,12, 2,03 (cada uno 3H, s, acetilo).

ES 2 300 892 T3

(2) Síntesis de 3',5'-di-O-acetil-2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (compuesto 3)



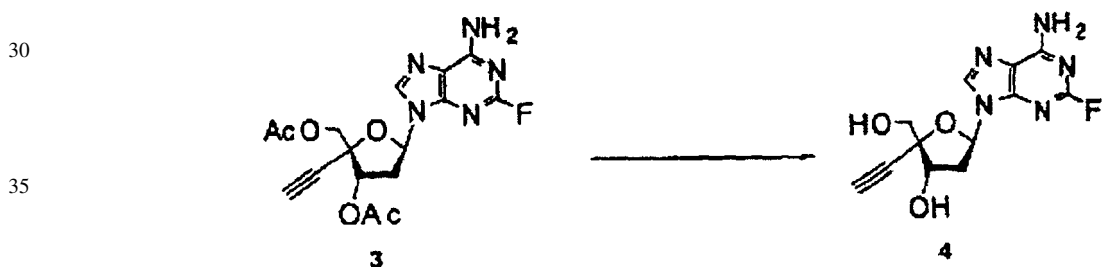
15 El compuesto 2 (450 mg, 1,20 mmol) se disolvió en fluoruro de hidrógeno al 70%-piridina (5,00 ml), y se añadió nitrito de t-butilo (0,194 ml, 1,63 mmol) a la disolución resultante, seguido de una agitación a -10°C durante una hora. Se añadió agua destilada a la mezcla resultante, y la mezcla resultante se sometió a una extracción con cloroformo. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se concentró bajo presión reducida. Se

20 añadió una mezcla de cloroformo y metanol (50:1) al residuo resultante, y los cristales precipitados de esta forma se filtraron y se secaron, produciendo, con ello, el compuesto 3 (240 mg, 0,64 mmol, 53,3%).

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 8,34 (1H, s, H-8), 7,94, 7,99 (cada uno 1H, sa, NH_2), 6,35 (1H, t, H-1', J = 6,80), 5,68 (1H, dd, H-3', J = 5,10, 7,05), 4,41 (1H, d, H-5'a, J = 11,6), 4,21 (1H, d, H-5'b, J = 11,6), 3,42 (1H, s, etinilo), 3,14 (1H, m, H-2'a), 2,63 (1H, m, H-2'b), 2,12, 2,00 (cada uno 3H, s, acetilo).

25

(3) Síntesis de 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (compuesto 4)



40 El compuesto 3 (200 mg, 0,53 mmol) se disolvió en metanol (7,00 ml), y se añadió amoniaco acuoso al 28% (5,00 ml) a la disolución resultante, seguido de una agitación a temperatura ambiente durante cuatro horas. La mezcla de reacción resultante se concentró bajo presión reducida, y se añadió una mezcla de cloroformo y metanol (20:1) al residuo resultante. Los cristales precipitados de esta manera se filtraron y, después, los cristales resultantes se

45

recristalizaron en agua para producir, con ello, el compuesto 4 (113 mg, 0,39 mmol, 73,6%).

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 8,30 (1H, s, H-8), 7,87, 7,84 (cada uno 1H, sa, NH_2), 6,24 (1H, dd, H-1', J = 5,05, 7,15), 5,57 (1H, d, 3'-OH, J = 5,50), 5,30 (1H, t, 5'-OH, J = 6,40), 4,57 (1H, m, H-3'), 3,65 (1H, m, H-5'a), 3,55 (1H, m, H-5'b), 3,51 (1H, s, etinilo), 2,70 (1H, m, H-2'a), 2,44 (1H, m, H-2'b).

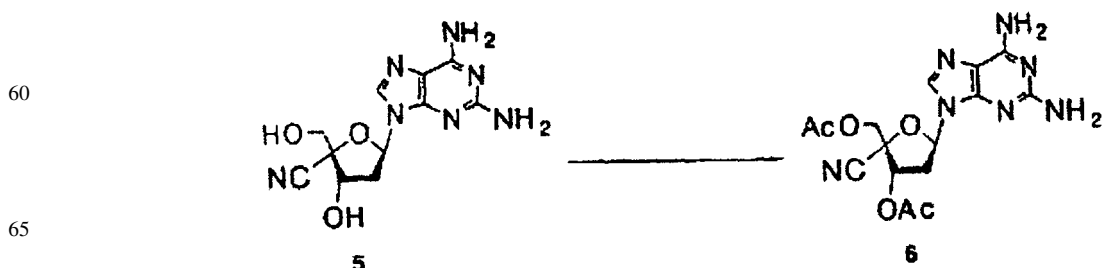
50

Ejemplo de síntesis 2

Síntesis de 4'-C-ciano-2'-desoxi-2-fluoroadenosina (compuesto 8)

(1) Síntesis de 9-(3,5-di-O-acetil-4-C-ciano-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-2,6-diaminopurina (compuesto 6)

55

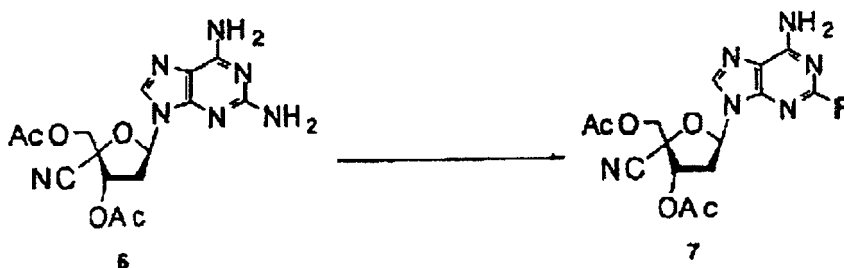


ES 2 300 892 T3

El compuesto 5 (122 mg, 0,418 mmol) se suspendió en acetonitrilo (5,00 ml), y se añadieron anhídrido acético (118 μ l, 1,25 mmol), trietilamina (352 μ l, 2,51 mmol) y una pequeña cantidad de 4-dimetilaminopiridina a la suspensión resultante, seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Los cristales precipitados de esta manera se filtraron y se secaron para producir, con ello, el compuesto 6 (128 mg, 0,341 mmol, 81,6%).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,54 (1H, s, H-8), 6,31 (1H, t, H-1', J = 7,00), 6,06 (1H, dd, H-3', J = 5,00, 6,50), 5,31 (2H, sa, NH_2), 4,95 (1H, d, H-5'a, J = 11,5), 4,80 (2H, sa, NH_2), 4,37 (1H, d, H-5'b, J = 12,0), 3,43 (1H, m, H-2'a), 2,63 (1H, m, H-2'b), 2,23, 2,12 (cada uno 3H, s, acetilo).

(2) Síntesis de 3',5'-di-O-acetil-4'-C-ciano-2'-desoxi-2-fluoroadenosina (compuesto 7)



El compuesto 6 (118 mg, 0,314 mmol) se disolvió en fluoruro de hidrógeno al 70%-piridina (2,30 ml), y se añadió nitrito de t-butilo (50,0 μ l, 0,427 mmol) a la disolución resultante, seguido de una agitación a -10°C durante tres horas. A la mezcla resultante se le añadió más nitrito de t-butilo (10,0 μ l, 85 μ mol), y después la mezcla se volvió a agitar a -10°C durante una hora. Después se añadió a la mezcla resultante una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, la mezcla resultante se sometió a una extracción con acetato de etilo, y la capa orgánica resultante se lavó con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio, y después se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en etanol con calentamiento, seguido de un enfriamiento. Los cristales precipitados de esta forma se filtraron y se secaron, produciendo, con ello, el compuesto 7 (53,7 mg, 0,14 mmol, 45,2%).

RMN de ^1H (DMSO-d_6) δ 8,35 (1H, s, H-8), 8,00, 7,92 (cada uno 1H, sa, NH_2), 6,54 (1H, t, H-1', J = 7,00), 5,83 (1H, dd, H-3', J = 4,00, 6,50), 4,63 (1H, d, H-5'a, J = 11,5), 4,44 (1H, d, H-5'b, J = 12,0), 3,26 (1H, m, H-2'a), 2,73 (1H, m, H-2'b), 2,18, 2,05 (cada uno 3H, s, acetilo).

(3) Síntesis de 4'-C-ciano-2'-desoxi-2-fluoroadenosina (compuesto 8)



El compuesto 7 (53,7 mg, 0,142 mmol) se disolvió en metanol (1,90 ml), y se añadió amoníaco acuoso al 28% (1,30 ml) a la disolución resultante, seguido de una agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción resultante se concentró bajo presión reducida, y después el residuo resultante se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice (10 ml de gel de sílice, hexano/acetato de etilo (5:1), acetato de etilo, acetato de etilo/metanol (10:1)), para producir, con ello, el compuesto 8 (30,2 mg, 0,10 mmol, 72,3%).

RMN de ^1H (DMSO-d_6) δ 8,31 (1H, s, H-8), 7,93, 7,82 (cada uno 1H, sa, NH_2), 6,43 (1H, t, H-1', J = 7,00), 6,36 (1H, sa, 3'-OH), 5,74 (1H, sa, 5'-OH), 4,70 (1H, t, H-3', J = 5,50), 3,80 (1H, d, H-5'a, J = 12,0), 3,65 (1H, d, H-5'b, J = 12,0), 2,93 (1H, m, H-2'a), 2,47 (1H, m, H-2'b).

ES 2 300 892 T3

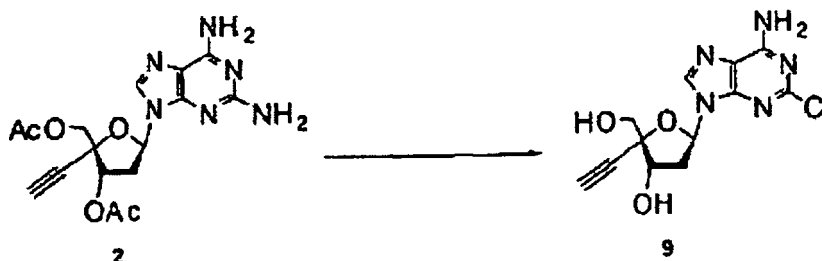
Ejemplo de síntesis 3

Síntesis de 2-cloro-2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina (compuesto 9)

5

10

15



20

25

Se disolvió nitrito de benciltrietilamonio (1,04 g, 4,36 mmol) en diclorometano (24,0 ml), y se añadió cloruro de acetilo (0,40 ml, 5,63 mmol) a la disolución resultante, seguido de agitación a 0°C durante 30 minutos. A la disolución resultante se le añadió una disolución del compuesto 2 (340 mg, 0,91 mmol) en diclorometano (6,00 ml), y la mezcla se agitó a 0°C durante tres horas. La mezcla de reacción resultante se diluyó con cloroformo, y posteriormente la capa orgánica resultante se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró bajo presión reducida. Al residuo resultante se le añadieron amoniaco acuoso al 28% (10,0 ml) y metanol (15,0 ml), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la reacción resultante se concentró bajo presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice (50 ml de gel de sílice, cloroformo:metanol = de 20:1 a 10:1). El residuo purificado de esta manera se purificó aún más mediante una cromatografía en columna de ODS (50 ml de ODS, acetonitrilo del 5% al 10% al 15% al 20%) para producir, con ello, el compuesto 9 (39,2 mg, 0,13 mmol, 14,3%).

30

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 8,34 (1H, s, H-8), 7,84 (2H, sa, NH_2), 6,27 (1H, dd, H-1', J = 5,00, 7,00), 5,60 (1H, d, 3'-OH, J = 5,00), 5,33 (1H, t, 5'-OH, J = 6,00), 4,56 (1H, m, H-3'), 3,64 (1H, m, H-5'a), 3,56 (1H, m, H-5'b), 3,52 (1H, s, etinilo), 2,68 (1H, m, H-2'a), 2,45 (1H, m, H-2'b).

35

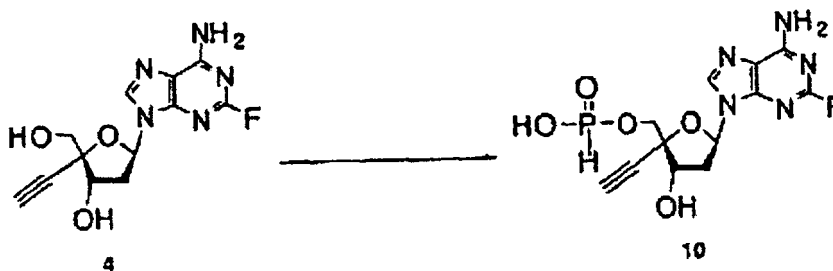
Ejemplo de síntesis 4

Síntesis de 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina 5'-H-fosfonato (compuesto 10)

40

45

50



55

El compuesto 4 (50,0 mg, 0,171 mmol) se disolvió en piridina (2,00 ml) y se añadieron ácido fosfónico (21,0 mg, 0,25 mmol) y dicitlohexilcarbodiimida (106 mg, 0,51 mmol) a la disolución resultante, seguido de agitación a temperatura ambiente durante cinco horas. El precipitado resultante se retiró mediante filtración y después el filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se repartió entre agua y cloroformo. La capa acuosa resultante se concentró bajo presión reducida, y el residuo obtenido de esta manera se purificó mediante una cromatografía preparativa en capa fina (isopropanol:amoniaco acuoso al 28%:agua = 7:1:2). El residuo resultante se cohirvió con acetonitrilo, y después se trató con metanol y éter, para producir, con ello, un compuesto pulverulento (compuesto 10; 6,3 mg, 17,6 μmol , 10,3%).

60

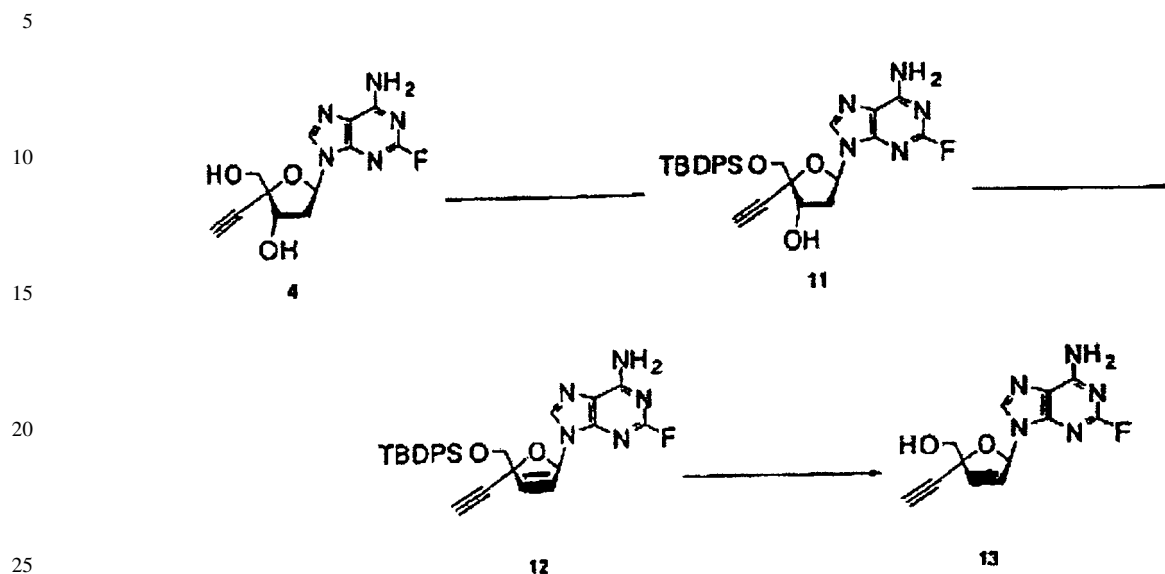
RMN de ^1H (D_2O) δ 8,13 (1H, s, H-8), 6,49 (1H, d, H-P, J = 645), 6,25 (1H, dd, H-1', J = 5,00, 7,50), 3,96 (2H, m, H-5'), 2,75, 2,59 (cada uno 1H, m, H-2').

65

RMN de ^{31}P (D_2O) δ 6,45.

Ejemplo de síntesis 5

Síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (compuesto 13)



El compuesto 4 (0,28 g, 0,95 mmol) se disolvió en dimetilformamida (7,00 ml) y se añadieron t-butilclorodifenilsilano (0,50 ml, 1,92 mmol) e imidazol (0,26 g, 3,82 mmol) a la disolución resultante, seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después se añadió metanol a la mezcla de reacción resultante, la mezcla resultante se concentró bajo presión reducida, y el residuo resultante se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido de esta manera se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice (100 ml de gel de sílice, cloroformo:metanol = 20:1) para producir, con ello, el compuesto bruto 11 (0,38 g).

El compuesto bruto 11 (0,38 g) se disolvió en diclorometano (10,0 ml) y se añadieron anhídrido trifluorometansulfónico (0,14 ml, 0,83 mmol) y piridina (0,14 g, 1,71 mmol) a la disolución resultante a -10°C , seguido de agitación a la misma temperatura durante dos horas. Se añadió una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio a la mezcla de reacción resultante, y después la mezcla de reacción resultante se sometió a una extracción con cloroformo. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se concentró bajo presión reducida. El triflato bruto obtenido de esta manera se empleó en la siguiente reacción sin más purificación.

El triflato bruto se disolvió en tetrahidrofurano seco (20,0 ml) y se añadió una disolución de hexametildisilazida de sodio 1 M en tetrahidrofurano (2,50 ml, 2,50 mmol) a la disolución resultante en una atmósfera de argón a -78°C , seguido de agitación a la misma temperatura durante dos horas. Después se dejó que la mezcla de reacción resultante se calentase hasta la temperatura ambiente, y después se agitó durante la noche. Se añadió agua a la mezcla de reacción resultante, y después la mezcla resultante se sometió a una extracción con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido de esta manera se purificó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice (50 ml de gel de sílice, cloroformo:metanol = de 50:1 a 20:1) para producir, con ello, el compuesto bruto 12 (0,20 g).

El compuesto bruto 12 obtenido de esta manera se disolvió en tetrahidrofurano (10,0 ml) y se añadió una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en tetrahidrofurano (0,59 ml, 0,59 mmol) a la disolución resultante, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción resultante se concentró bajo presión reducida y después se añadió una mezcla de cloroformo y metanol (10:1) a la mezcla concentrada de esta manera. Los cristales precipitados de esta manera se filtraron para producir, con ello, el compuesto 13 (52,0 mg, 0,19 mmol, 20,0% a partir del compuesto 4).

RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8,08 (1H, s, H-8), 7,84 (2H, sa, NH_2), 6,90 (1H, t, H-1', $J = 1,50$), 6,43 (1H, dd, H-3', $J = 2,00, 6,00$), 6,27 (1H, dd, H-3', $J = 1,00, 6,00$), 5,37 (1H, t, 5'-OH, $J = 6,00$), 3,71 (1H, s, etinilo), 3,67 (1H, dd, H-5'a, $J = 6,00, 12,0$), 3,57 (1H, dd, H-5'b, $J = 6,00, 12,0$).

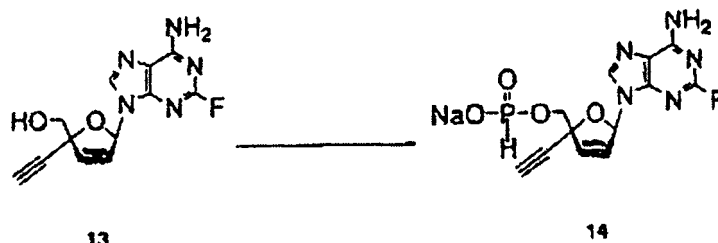
ES 2 300 892 T3

Ejemplo de síntesis 6

Síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina 5'-H-fosfonato (compuesto 14)

5

10



15

20 El compuesto 13 (13,0 mg, 0,047 mmol) se disolvió en piridina (0,7 ml) y se añadieron ácido fosfónico (7,7 mg, 0,094 mmol) y dicitclohexil carbodiimida (29,2 mg, 0,14 mmol) a la disolución resultante, seguido de agitación a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción resultante se concentró bajo presión reducida, y el residuo obtenido de esta manera se purificó mediante una cromatografía en columna de ODS (10 ml de ODS, acetonitrilo del 0% al 1%). El residuo resultante se aplicó a una columna Dowex 50Wx8 (de tipo Na) y se eluyó. El eluato se concentró y el residuo resultante se trató con metanol y éter para producir, con ello, un compuesto pulverulento (compuesto 14; 4,3 mg, 12 μ mol, 25,5%).

25

RMN de ^1H (MeOD) δ 8,30 (1H, s, H-8), 6,69 (1H, d, H-P, J = 625), 7,02 (1H, ta, H-1'), 6,48 (1H, dd, H-2', J = 2,00, 5,50), 6,22 (1H, dd, H-3', J = 1,00, 5,50), 4,18 (1H, dd, H-5'a, J = 7,50, 11,0), 3,99 (1H, dd, H-5'b, J = 7,50, 11,0).

30

RMN de ^{31}P (MeOD) δ 4,11.

Ejemplo de preparación de fármaco 1

35 *Comprimidos*

Compuesto de la presente invención	30,0 mg
Micropolvo de celulosa	25,0 mg
40 Lactosa	39,5 mg
Almidón	40,0 mg
45 Talco	5,0 mg
Estearato de magnesio	0,5 mg

Se prepararon comprimidos a partir de la anterior composición mediante un procedimiento convencional.

50

Ejemplo de preparación de fármaco 2:

Cápsulas

55 Compuesto de la presente invención	30,0 mg
Lactosa	40,0 mg
60 Almidón	15,0 mg
Talco	5,0 mg

Se prepararon fármacos encapsulados a partir de la anterior composición mediante un procedimiento convencional.

65

ES 2 300 892 T3

Ejemplo de preparación de fármaco 3

Inyecciones

5	Compuesto de la presente invención	30,0 mg
	Glucosa	100,0 mg

Se prepararon inyecciones disolviendo la anterior composición en agua purificada para preparar inyecciones.

10 A continuación se describirán ejemplos de ensayo. En los ensayos se emplearon los siguientes cinco compuestos de la presente invención y cuatro compuestos conocidos.

15 *Compuestos de la invención*

Compuesto 4: 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina;

20 Compuesto 8: 4'-C-ciano-2'-desoxi-2-fluoroadenosina;

Compuesto 9: 2-cloro-2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina;

Compuesto 10: 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina 5'-H-fosfonato; y

25 Compuesto 13: 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina.

Compuestos conocidos

30 AZT: azidotimidina;

EdAdo: 2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina;

35 EdDAP: 9-(4-C-etinil-2-desoxirribopentofuranosil)-2,6-diaminopurina; y

ddAdo: 2',3'-didesoxiadenosina.

Ejemplo de ensayo 1

40 *Procedimientos de ensayo: Actividad antiviral de la inmunodeficiencia humana (VIH)*

1) *Procedimiento MTT que utiliza células MT-4*

45 1. Un agente de ensayo (100 μ l) se diluye en una microplaca de 96 pocillos. Se añadieron células MT-4 infectadas con VIH-1 (cepa IIIb; 100 TCID₅₀) y células MT-4 no infectadas a la microplaca, de forma que el número de células en cada pocillo alcanza 10.000. Las células se cultivan a 37°C durante cinco días.

2. Se añade MTT (20 μ l, 7,5 mg/ml) a cada pocillo, y las células se siguen cultivando durante 2-3 horas.

50 3. Se forman muestras del medio cultivado (120 μ l) y se añade a las muestras disolución de terminación de MTT (isopropanol que contiene Triton X-100 al 4% y HCl 0,04 N). La mezcla se agita para disolver el formazano formado. Se mide la absorbancia a 540 nm de la disolución. Puesto que la absorbancia es proporcional al número de células viables, la concentración del agente de ensayo a la cual se mide la mitad del valor de la absorbancia en un ensayo que emplea células MT-4 infectadas representa la EC₅₀, mientras que la concentración del agente de ensayo a la cual se mide la mitad del valor de la absorbancia en un ensayo que emplea células MT-4 no infectadas representa la CC₅₀.

2) *Ensayo MAGI que utiliza células HeLa CD4/LTR-beta-Gal*

60 1. Se añaden células HeLa CD4/LTR-beta-Gal a 96 pocillos, de forma que el número de células en cada pocillo es 10.000. Después de 12-24 horas, el medio de cultivo se retira y se añade un agente de ensayo diluido (100 μ l).

2. Se añade una diversidad de cepas de VIH (cepa salvaje: WT, cepa resistente a fármacos: MDR y M184V; cada una equivalente a 50 TCID₅₀), y las células se siguen cultivando durante 48 horas.

65 3. Las células se fijan durante cinco minutos utilizando PBS suplementado con formaldehído al 1% y glutaraldehído al 0,2%.

ES 2 300 892 T3

4. Después de lavar las células fijadas con PBS tres veces, las células se tiñen con X-Gal 0,4 mg/ml durante una hora, y se cuenta el número de células teñidas de azul de cada pocillo bajo un microscopio estereoscópico de transmisión. La concentración de agente de ensayo a la cual las células teñidas de azul disminuyen hasta 50% en número representa la EC₅₀.

5

Resultados: Citotoxicidad y actividad antiviral de la inmunodeficiencia humana (VIH)

1) Procedimiento MTT que utiliza células MT-4

10

TABLA 1

Fármacos	Células MT-4		
	Actividad anti-VIH-1 (EC ₅₀ , μM)	Citotoxicidad (CC ₅₀ , μM)	Índice de selectividad (CC ₅₀ /EC ₅₀)
Compuesto 4	0,000068	7,5	110000
EdDAP	0,00034	0,9	2600
EdAdo	0,0098	16	1630
AZT	0,0032	29,4	9190

30

2) Ensayo MAGI que utiliza células HeLa CD4/LTR-beta-Gal

35

TABLA 2

Fármacos	Células HeLa CD4/LTR-beta-Gal		
	Actividad anti-VIH-1 _{salvaje} (EC ₅₀ , μM)	Actividad anti-VIH-1 _{MDR} (EC ₅₀ , μM)	Actividad anti-VIH-1 _{M184V} (EC ₅₀ , μM)
Compuesto 4	0,00020	0,0001448	0,003107
Compuesto 8	0,12	0,95	4,8
Compuesto 9	0,0019	0,0084	0,01
Compuesto 10	0,0034	0,003	0,062
Compuesto 13	0,80	0,15	1,8
EdAdo	0,008	0,0062	0,047
AZT	0,022	15,3	0,01

60

Ejemplo de ensayo 2

Procedimientos de ensayo: Estabilidad del compuesto 4 frente a la adenosina desaminasa

65

Se añadió adenosina desaminasa derivada de intestino de ternera (0,01 unidades) a 0,5 ml del compuesto 4 0,5 mM (disolución tamponada con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)), y la mezcla se incubó a 25°C.

ES 2 300 892 T3

Se retiró una parte alícuota de 5 μ l de la mezcla de reacción cada 15 minutos, seguido de un análisis mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Se consideró que el área del pico de un fármaco de ensayo a un tiempo de reacción 0 era 100%, y la curva se controló a lo largo del tiempo. El análisis de HPLC se realizó bajo las siguientes condiciones.

5 Columna: YMC-Pack ODS-A (250 x 6,0 mm)

 Eluyente: MeCN al 15%-TEAA 50 mM

10 Caudal: 1 ml/min

 Temperatura: 30°C

15 Detección: 260 nm

Resultados

20 Como se muestra en la figura 1, la 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina, que es el compuesto 4 de la presente invención, no fue desaminada en absoluto, por contraste con el caso en el que la 2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina (EdAdo) convencional fue desaminada, demostrando que el compuesto de la presente invención posee resistencia frente a la adenosina desaminasa.

25 Ejemplo de ensayo 3

Procedimientos de ensayo: Estabilidad del compuesto 4 bajo condiciones ácidas

30 El compuesto 4 (2,9 mg) o 2',3'-didesoxiadenosina (ddAdo: 2,4 mg) se disolvió en 10 ml de una disolución de ensayo a 37°C (que se preparó añadiendo 2,0 g de cloruro de sodio y 7,0 ml de ácido clorhídrico a agua para fabricar una disolución de 1.000 ml), seguido de incubación a la misma temperatura (37°C).

35 Se retiró una parte alícuota de 100 μ l de la mezcla de reacción y se neutralizó con una disolución de hidróxido de sodio acuoso 0,1 N, seguido de un análisis de 5 μ l mediante HPLC. Las condiciones del análisis de HPLC fueron las mismas que las empleadas en el ejemplo de ensayo 2.

Resultados

40 Aproximadamente 98% de ddAdo, que es un compuesto convencional, se degradó en aproximadamente cinco minutos bajo las anteriores condiciones (véase la figura 3), mientras que la 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina, que es el compuesto 4 de la presente invención, fue degradado muy lentamente, demostrando que el compuesto de la presente invención es relativamente estable bajo condiciones ácidas (véase la figura 2).

45 Ejemplo de ensayo 4

Procedimientos de ensayo: Ensayo de toxicidad aguda in vivo del compuesto 4

50 A grupos de ratones ICR (6 semanas de edad, machos), en los que cada grupo consistía en 8 ratones, se les administró un fármaco de ensayo (compuesto 4; disuelto o suspendido en disolución salina) por vía oral o mediante inyección intravenosa en cantidades de hasta 100 mg/kg. Se controlaron los casos de muerte y el peso corporal de cada ratón durante siete días.

55 Resultados

60 Todos los ratones a los que se les administró el compuesto 4 hasta 100 mg/kg en una única dosis sobrevivieron independientemente de la vía de administración oral o intravenosa (tabla 3). Además, como se muestra en la figura 4, no se observó pérdida de peso ni síntomas patológicos, tales como diarrea. Por tanto, se confirma que la 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina (compuesto 4) de la presente invención no muestra toxicidad aguda en ratones.

65

ES 2 300 892 T3

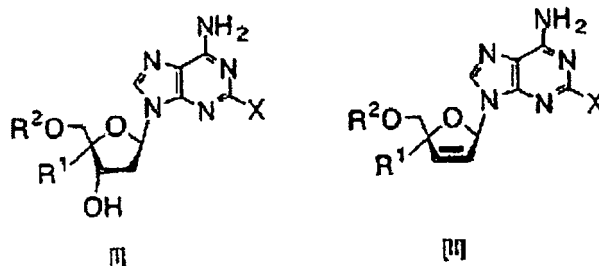
TABLA 3

Dosis (mg/kg)	Supervivientes/Total	
	Oral	Intravenosa
Placebo	8/8	8/8
1	8/8	8/8
3	8/8	8/8
10	8/8	8/8
30	8/8	8/8
100	8/8	8/8

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida representado por la siguiente fórmula (I) o (II)



en la que X representa un átomo de halógeno, R¹ representa un grupo etinilo o un grupo ciano, y R² representa hidrógeno, o un resto fosfato o su resto derivado seleccionado del grupo que consiste en un monofosfato, un difosfato, un trifosfato, un fosfonato, un poliéster de fosfato, un amidato de fosfato, un fosforotioato, un fosforoselenoato, o un fosforoboranoato.

2. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, en el que el átomo de halógeno representado por X es un átomo de flúor o cloro.

3. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, en el que R¹ es un grupo etinilo.

4. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina.

5. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 4'-C-ciano-2'-desoxi-2-fluoroadenosina.

6. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2-cloro-2'-desoxi-4'-C-etiniladenosina.

7. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2'-desoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina 5'-H-fosfonato.

8. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina.

9. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-ciano-2-fluoroadenosina.

10. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-cloroadenosina.

11. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-fluoroadenosina.

12. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2',3'-didesoxi-4'-C-ciano-2-fluoroadenosina.

13. Un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según la reivindicación 1, que es 2',3'-didesoxi-4'-C-etinil-2-cloroadenosina.

14. Una composición farmacéutica que contiene un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para éste.

15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 14, que es un fármaco anti-VIH.

16. Una composición farmacéutica según la reivindicación 14, que es un fármaco para tratar el SIDA.

17. El uso de un derivado de 2-haloadenosina 4'-C-sustituida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o una composición farmacéutica que contiene dicho derivado, para preparar un medicamento para tratar el SIDA.

Fig. 1

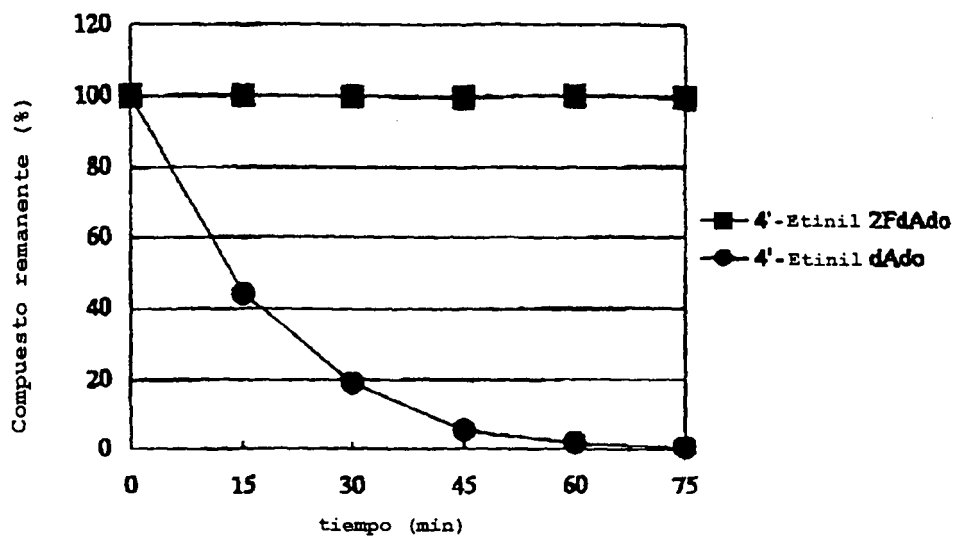


Fig. 2

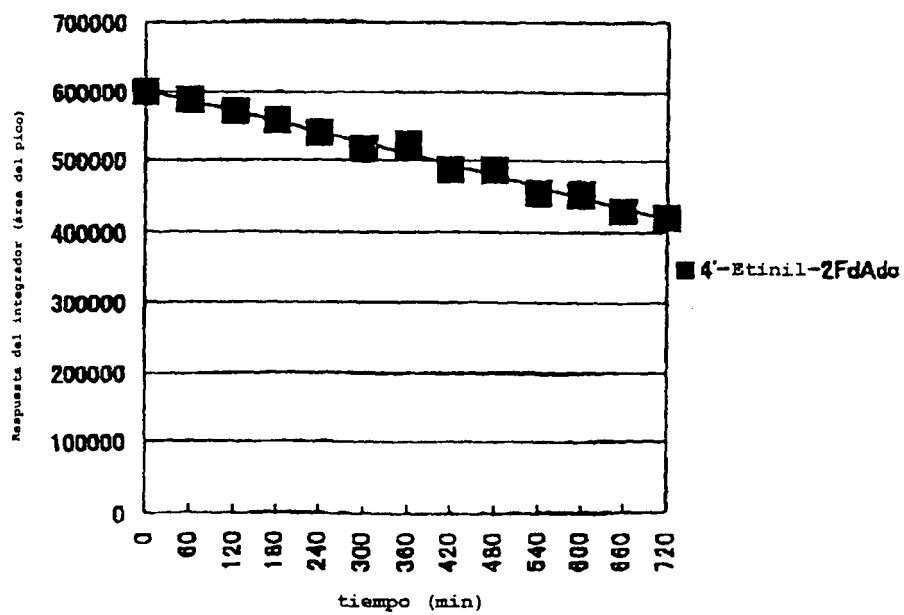


Fig. 3

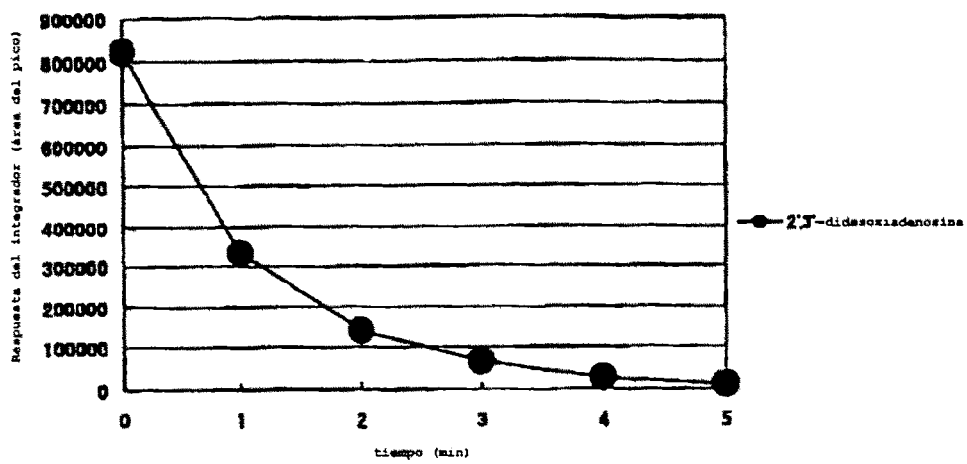


Fig. 4

