



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 580**

51 Int. Cl.:
C07D 239/54 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01957228 .8**
96 Fecha de presentación : **24.07.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1305296**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54 Título: **Derivados de pirimidina 5-sustituídos de análogos nucleósidos bloqueados conformacionalmente.**

30 Prioridad: **26.07.2000 US 220934 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.02.2010

73 Titular/es: **The Government of the United States of America, as represented by the Secretary Department of Health and Human Services National Institutes of Health, Patent Branch Office of Technology Transfer, Suite 325 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20850, US**

72 Inventor/es: **Marquez, Victor, E. y Russ, Pamela, L.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 pirimidina 5-sustituidos de análogos nucleósidos bloqueados conformacionalmente.

El presente invento se refiere a derivados de pirimidina 5-sustituidos de análogos nucleósidos bloqueados conformacionalmente y al uso de estos derivados como agentes antivirales y anticancerígenos

Se ha reconocido que incorporar análogos no funcionales modificados de sustituyentes de ADN durante la replicación es un método eficaz para terminar la replicación de ADN y a su vez impedir la generación de progenie viable. Estudios recientes han demostrado que las ribosas modificadas y sintéticas y las bases nitrogenadas tienen una actividad antiviral frente a géneros virales variables dependiendo de la modificación. Hay una necesidad constante de agentes antivirales y anticancerígenos eficaces.

El presente invento proporciona derivados de pirimidina 5-sustituidos de análogos nucleosídicos bloqueados conformacionalmente y el uso de estos derivados como agente antivirales y anticancerígenos.

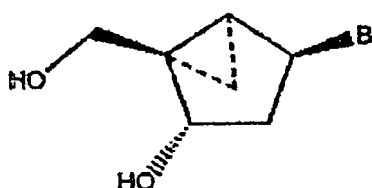
Marquez y otros, J. Med. Chem. 39:3739 (1996) describe análogos nucleósidos de purina y pirimidina que tienen bases naturales unidas a un molde de pseudoazúcar biciclo [3.1.0] hexano. Grignet-Debrus y otros, Cancer Gene Therapy 7: 215 (2000) describe bases modificadas, particularmente uracilos 5-sustituidos que son restos característicos de nucleósidos antivirales cuando se unen a azúcares comunes. La sustitución de las bases modificadas de Grignet-Debrus y otros, por las bases naturales de Marquez y otros produce análogos de pirimidina que son completamente sorprendentes, debido a que la incorporación de estas bases conocidas a un molde biciclo [3.1.0] hexano proporciona compuestos con actividad antiviral que son potentes como sus homólogos nucleosídicos y los análogos carbocíclicos con un anillo ciclopentano plano.

El documento de patente WO 95/08541-A describe análogos nucleósidos carboxílicos fusionados a 4',6'-ciclopropano bloqueado conformacionalmente preparados mediante condensación de un alcohol alílico carbocíclico fusionado a ciclopropano con purina sustituidos o bases pirimidina, modificando después el producto de condensación para producir análogos nucleosídicos de la adenosina, guanosina, citidina, timidina y uracilo. Los compuestos son descritos como terapéuticamente útiles como antimetabolitos, o en la preparación de agentes metabólicos.

El documento de patente WO 98/05662-A describe un método para el tratamiento de la infección por herpes virus administrando una cantidad inhibidora de virus eficaz de un 2'-desoxinucleósido carbocíclico ciclopropano a un individuo con necesidad de la misma. Los análogos nucleosídicos son descritos como eficaces frente al virus del herpes simplex tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus humano.

El presente invento está dirigido a derivados de pirimidina 5-sustituidos de análogos nucleosídicos bloqueados conformacionalmente, y a métodos para usar estos derivados como agentes anti-virales y anticancerígenos.

Los derivados de pirimidina 5-sustituidos de análogos nucleosídicos bloqueados conformacionalmente tienen la fórmula:



B es un derivado 5-sustituido de uracilo y el 5-sustituyente es un miembro del grupo que consiste en I, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHF}$, $\text{CH}=\text{CHCl}$, $\text{CH}=\text{CHBr}$ y $\text{CH}=\text{CHI}$.

Derivados de pirimidina 5-sustituida de análogos nucleósidos bloqueados conformacionalmente pueden ser ensayados en lo que respecta a su actividad antiviral por una variedad de métodos conocidos en la técnica.

Un ensayo es el ensayo de inhibición del efecto citopatogénico. Otro ensayo es el ensayo de reducción de placas víricas.

El ensayo de inhibición de efecto citopatogénico procede generalmente como sigue. Marquez y otros, J. Med. Chem. 39: 3739 (1996). Células de fibroblasto de prepucio humano (HFF) de bajo número de pases (3-10) son tripsinizadas contadas, y sembradas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una concentración de $2,5 \times 10^4$ células en 0,1 ml de medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de medio de suero bovino fetal (FBS). Las células son entonces incubadas durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 90% con 5% CO_2 -95% aire. El medio es entonces eliminado, y 100 μl de MEM que contiene 2% FBS es añadido a todas las filas excepto a la primera. En la primera fila, 125 μl de medio que contiene el compuesto experimental son añadidos en pocillos por triplicado. El medio solo es añadido a ambos pocillos testigo de células y de virus.

El compuesto en la primera fila de pocillos es entonces diluido en serie 1:5 a lo largo de los pocillos restantes transfiriendo 25 μ l usando la máquina de manejo de líquidos Cetus (Cetus Liquid Handling Machine). Las placas son entonces incubadas durante 1 h, y 100 μ l de la concentración viral apropiada es añadida a cada pocillo, excluyendo los pocillos testigo de células, que reciben 100 μ l de MEM. La concentración viral utilizada es 1000 PFU/pocillo. Las placas son entonces incubadas a 37°C en un incubador de CO₂ durante 3 días. Tras el período de incubación, el medio es aspirado y las células teñidas con una disolución de cristal violeta al 0,1% durante 30 min. La tinción es entonces eliminada y las placas son lavadas con agua corriente hasta que todo exceso de tinción es eliminado. Las placas se permite que se sequen durante 24 h y entonces son leídas en un Autolector Multiplaca Bio Tek.

El ensayo de reducción de placas virales procede generalmente como sigue. Marquez y otros, J. Med. Chem. 39:3739 (1996). En la fecha del ensayo, el fármaco es hecho a 2 veces la concentración deseada en 2 x MEM y después diluido en serie 1:5 en 2 x MEM para dar seis concentraciones de fármaco. Las concentraciones de fármaco utilizadas son normalmente 200 hasta 0,06 μ g/ml. El virus a ser usado es diluido en MEM que contiene 10% FBS a una concentración deseada que dará 20-30 placas/pocillo. El medio es entonces aspirado de los pocillos, y 0,2 ml de virus es añadido a cada pocillo en duplicado con 0,2 mL de medio que es añadido a los pocillos de toxicidad de fármaco. Las placas son entonces incubadas durante 1 h con agitación cada 15 min. Tras el período de incubación, una cantidad igual a 1% de agarosa es añadida a un volumen igual de cada dilución del fármaco. Esto dará una concentración de fármaco final que comienza a 100 y termina a 0,03 μ g/ml y una concentración de recubrimiento de agarosa de 0,5%. La mezcla de fármaco-agarosa es aplicada a cada pocillo en 2 ml de volumen, y las placas son incubadas durante 3 días, tras lo cual las células son teñidas con una disolución de 1,5 de rojo neutro. Al final del período de 4-6 h de incubación, la tinción es aspirada, y las placas son contadas usando un estereomicroscopio a una magnificación 10 x.

Los derivados 5-sustituidos de análogos nucleósidos bloqueados conformacionalmente se ha encontrado que poseen propiedades farmacológicas valiosas. Tienen un efecto antiviral. Este efecto puede ser demostrado usando el ensayo de inhibición del efecto citopatogénico y el ensayo de reducción de placas virales.

La (North)-metanocarbatimina bloqueada conformacional-mente es un agente antiherpes potente y selectivo, 30 veces más potente que el aciclovir frente al virus de Herpes simplex-1 (HSV-1) y al virus del Herpes simplex-2 (HSV-2) en el ensayo de reducción de placa.

Puesto que el 5-sustituyente en nucleósidos pirimidina es un modulador de actividad antiherpes, tal como en el compuesto antiviral bromoviniluridina (BVDU) muy eficaz, los autores decidieron explorar un grupo de sustituyentes de uracilos 5-sustituidos (Br, I, CH=CH-Br) en esta nueva clase de nucleósidos carboxílicos ensamblados en un molde biciclo [3.1.0] hexano. La serie fue limitada sólo a los análogos North bloqueados conformacionalmente puesto que la antípoda conformacional south de metanocarbatimina se encontró que era inactiva. La síntesis de estos compuestos puede proceder linealmente a partir de la carbociclicamina correspondiente vía el análogo uracilo o mediante una aproximación convergente vía acoplamiento Mitsunobu con la base 5-sustituida.

Las Tablas 1, 2, y 3 demuestran actividad antiviral de uracilos 5-sustituidos (Br, I, CH=CH-Br) unido al molde biciclo [3.1.0]hexano relativo a los testigos activos conocidos correspondientes usando el ensayo de inhibición de efecto citopatogénico y el ensayo de reducción de placas virales. Estos resultados predicen que combinar cualquier resto uracilo 5-sustituido, no solo cuando el 5-sustituyente es metilo, con un pseudoazúcar biciclo [3.1.0]hexano dará como resultado compuestos con actividad antiviral. Estos resultados predicen adicionalmente que la combinación de cualquier resto pirimidina 5-sustituida con un molde biciclo [3.1.0]hexano dará también como resultado compuestos con actividad antiviral.

Así, el invento también se refiere al uso de los compuestos como se define en las reivindicaciones anexas del fabricante de un medicamento para el tratamiento de una infección viral en un individuo con necesidad de la misma. El uso del invento comprende típicamente mezclar dicho compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración de la composición antiviral. Preferiblemente, las composiciones antivirales son usadas para tratar el virus del Herpes simplex (HSV), Virus de la *Varicella zoster* (VZV), virus de Epstein Barr (EBV), y Citomegalovirus (CMV).

Tabla 1. Actividad antiviral frente al herpes virus HSV-1 y HSV-2

Compuesto	HSV-1 (HFF) ^a CPE inhib. BC ₅₀ ^b (µg/ml)	HSV-1 (HFF) CPE inhib. CC ₅₀ ^c (µg/ml)	SI ^d	HSV-2 (HFF) CPE inhib. EC ₅₀ (µg/ml)	HSV-2 (HFF) CPE inhib. CC ₅₀ (µg/ml)	SI	HSV-1 (HFF) Placa red'n EC ₅₀ (µg/ml)	HSV-1 (HFF) Placa red'n CC ₅₀ (µg/ml)	SI	HSV-2 (HFF) Placa red'n EC ₅₀ (µg/ml)	HSV-2 (HFF) Placa red'n CC ₅₀ (µg/ml)	SI
(N)-MCDIU (4)	> 100	> 100	0	3,3	> 100	30,3						
(N)- MCDBrU (3) ejemplo de referencia	0,39	> 100	> 256	0,70	> 100	> 142	0,03	> 100	3333	0,12	> 100	833
(N)- MCBVDU (5)	2,2	> 100	> 45	> 100	> 100	0						
ACV ^e (testigo)	0,5											

^aHFF= fibroblastos de prepucio humano;
^bEC50 = concentración inhibidora requerida para reducir el efecto citopatogénico inducido por el virus (CPE) o placas de virus en un 50%;
^cCC50 = concentración citotóxica que produce 50% del crecimiento celular, ^dSI = índice selectivo (CC₅₀/EC₅₀);
^e aciclovir

Tabla 2. Actividad antiviral frente vaccinia y pox

Compuesto	Vaccinia (HFF) ^a CPE inhib. EC ₅₀ ^b (µg/ml)	Vaccinia (HFF) CPE inhib. CC ₅₀ ^c (µg/ml)	SI ^d	Vaccinia (HFF) Placa red'n. EC ₅₀ (µg/ml)	Vaccinia (HFF) Placa red'n. EC ₅₀ (µg/ml)	SI	Cow pox (HFF) CPE EC ₅₀ (µg/ml)	Cowpox (HFF) CPE inhib. CC ₅₀ (µg/ml)	Cowpox (HFF) Placa red'n EC ₅₀ (µg/ml)	SI
(N)- MCdBrU (3) ejemplo de referencia	0,64	> 100	> 156	2,6	> 100	38,5	11,5	> 100	3,4	29,4

^aHFF= fibroblastos de prepucio humano;
^bBC50 = concentración inhibidora requerida para reducir el efecto citopatógeno inducido por el virus (CPE) o placas de virus en un 50%;
^cCC50 = concentración citotóxica que produce 50% del crecimiento celular; ^dSI = índice selectivo (CC₅₀/EC₅₀);
^e aciclovir

TABLA 3

Actividad antiviral frente a VZV

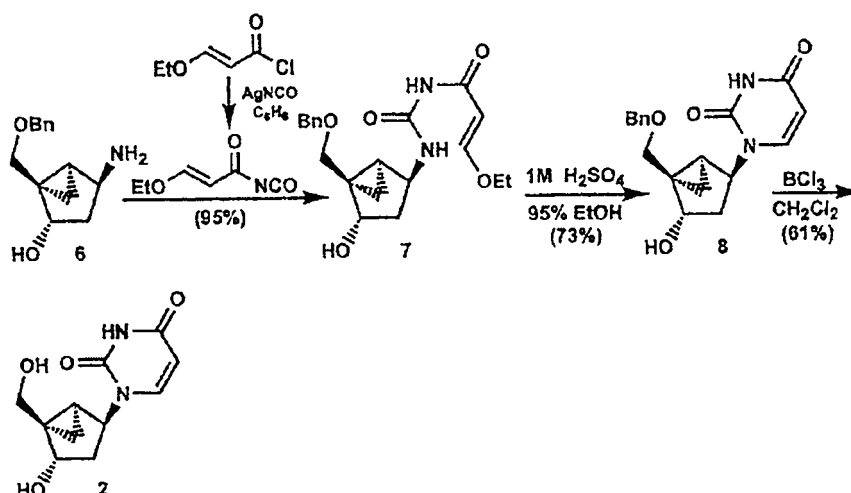
Compuesto	Actividad antiviral (reducción de placa) EC ₅₀ (μM) ^a				citotoxicidad	
(N)-MCdIU (4)	TK + VZV		TK - VZV		Morfología celular (MCC) ^b	CC ₅₀ ^c
	Cepa YS	Cepa OKA	Cepa 07/1	Cepa YS/R		
(N)- MCdBrU (3) ejemplo de referencia	0,03	0,89	107	37	>200	>200
(N)-MCdIU (4)	0,12	0,16	>5	3	>5	>200
(N)- MCBVDU (5)	0,007	0,05	> 5	>5	>5	>200
ACV ^e (testigo)	2,4	2,4	30	30	>200	488
BVDU (testigo)	0,008	0,005	>150	>150	>150	>400

^aEC₅₀ = concentración inhibitoria requerida para reducir las placas virales en un 50%;
^bMCC₅₀ = concentración citotóxica mínima que causa una alteración detectable microscópicamente en la morfología celular;
^cCC₅₀ = concentración citotóxica que produce un 50% del crecimiento celular.

Métodos de síntesis

Esquema 1

El esquema 1 ilustra como sintetizar un nucleósido uracilo biciclo [3.1.0]hexano(2) comenzando con un molde biciclo [3.1.0]hexano (6).



Compuesto 7

A 3-etoxi acrilcloruro (2,41 g, 0,018 m) en 50 ml de benceno se añadió AgNCO (6,0 g, 0,036 m) que había sido secado durante 2 h a 100°C al vacío. La mezcla fue hecha circular con reflujo en una atmósfera de Ar durante 0,75 h. Enfriada a T amb. Se añadieron 40 ml del sobrenadante orgánico gota a gota a una disolución de 6 (2,08 g 0,009 m) en DMF (50 ml) que había sido enfriada en una baño de hielo/sal en una atmósfera de Ar. La reacción fue agitada durante toda la noche mientras el baño se calentó a T amb. Concentrada al vacío. 7 (3,19 g, “vidrio” amarillo, 95%) fue

ES 2 332 580 T3

obtenido mediante cromatografía flash en gel de sílice usando 50% EtOAc/hexano y EtOAc. Una pequeña porción de 7 fue purificada para su análisis

Analizado para $C_{20}H_{26}N_2O_5 \cdot 0,25 H_2O$ pm 378.94

Calculada:	C	63,39	H	7,05	N	7,39
Encontrada:	C	63,56	H	6,93	N	7,50
		63,50		7,00		7,48

Compuesto 8

A 7 (3,19 g, 0,085 m) disuelto en 95% EtOH (100 ml) se añadió 1 M de H_2SO_4 (100 ml) y la reacción fue hecha circular con reflujo durante 1 h. El EtOH fue eliminado, la mezcla resultante neutralizada con 2N de NaOH a pH7, y extraída con cloroformo (3 x 100 ml).

Los extractos combinados fueron lavados 2 x 100 ml de $NaHCO_3$ saturado, secada sobre $MgSO_4$ y concentrada *in vacuo*. 8 (2,02 g, 73% de espuma incolora, $\alpha_D^{20} = +59$ (C, 0,16, MeOH)) fue obtenida mediante cromatografía flash en gel de sílice usando EtOAc.

Analizado para $C_{18}H_{20}N_2O_4 \cdot 0,25 H_2O$ pm 332.88

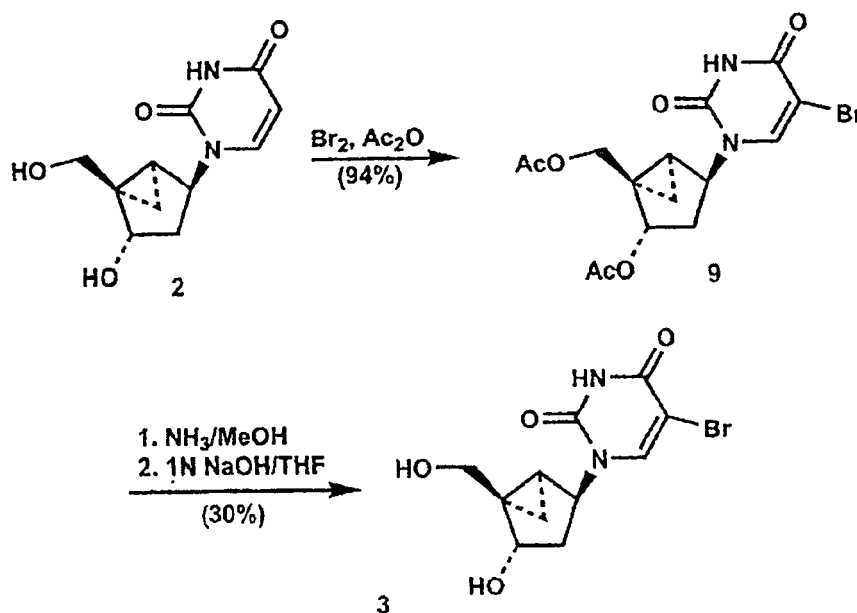
Calculada:	C	64,95	H	6,21	N	8,42
Encontrada:	C	65,12	H	6,33	N	8,20
		65,02		6,27		8,14

Compuesto 2

A 8 (0,164 g, 0,5 mmoles) en CH_2Cl_2 (30 ml) enfriada a $-78^\circ C$ se añadió 1 M de BCl_3/CH_2Cl_2 y la reacción fue agitada en frío en atmósfera de Ar durante 1 h. Se añadió MeOH (5 mL), la reacción fue concentrada *in vacuo* y reconcentrada con metanol (2 x 5 ml). 2 (0,073 g, sólido blanco) fue obtenido mediante cromatografía en flash de gel de sílice usando $CHCl_3$ y 10% MeOH/ $CHCl_3$. Nota: este es un compuesto conocido (documento de patente norteamericana 5.840,728).

Esquema 2

El esquema 2 ilustra como sintetizar un nucleósido uracilo 5-sustituido por Bromo (Br)(3) (ejemplo de referencia) comenzando con el nucleósido de uracilo biciclo [3.1.0]hexano (2).



ES 2 332 580 T3

Compuesto 9

2 (0,073 g, 0,31 mmoles) fueron disueltos en Ac_2O (2 ml) mediante calentamiento y enfriado a T amb en atmósfera de Ar. Br_2 (0,02 ml, 0,33 mmoles) fue añadido gota a gota, la reacción agitada a T amb durante 0,5 h y almacenada en el frigorífico durante toda la noche. El Ac_2O fue eliminado *in vacuo* y reconcentrado con tolueno (3 x 5 ml). El tratamiento del residuo naranja con agua dio 0,062 g de un sólido blanco y 0,050 g de un semisólido naranja conteniendo ambos 9 en bruto.

9 razonablemente puro (0,117, espuma incolora, R_F 0,86 (EtOAc, MH^+ 401/403, 94%)) fue obtenido mediante cromatografía flash en gel de sílice usando 50% EtOAc/hexano y EtOAc.

Compuesto 3 de referencia

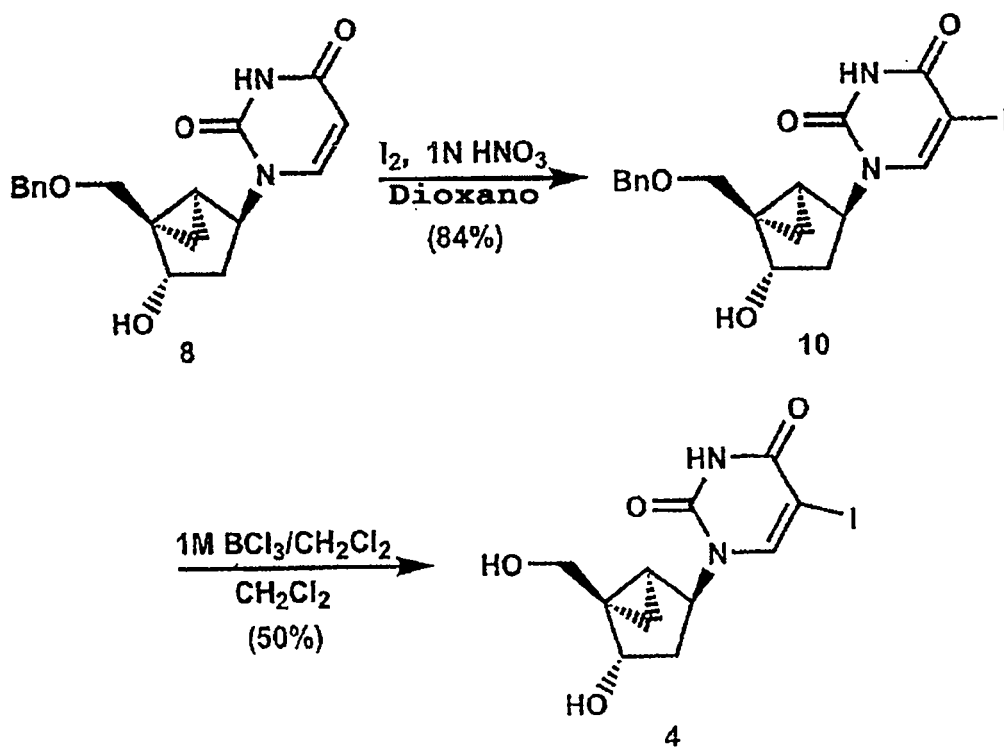
9 (0,111 g, 0,277 mmoles) fue disuelto en 3 ml de amonio saturado en metanol, mantenido a T amb toda la noche y después calentado a 50°C durante otras 24 h. El sólido obtenido mediante eliminación de NH_3/MeOH (R_F 0,32, 15% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$) se encontró mediante RMN que contenía un grupo acetato. A este sólido disuelto en THF (2,5 ml) se añadió NaOH 1N (0,2 ml) y la reacción fue agitada a T amb. El ácido acético (20 μl) fue añadido y la reacción concentrada *in vacuo*. El 3 en bruto fue obtenido mediante cromatografía flash en fase inversa C-18 usando agua y metanol. 3 puro (0,026 g, mp 218-219°C, $\alpha_D^{20} = +18,2$ (C, 0,11, MeOH), MH^+ 317/319, 30%) fue obtenido mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de CF_3Cl_3 y 10% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$.

Analizado para $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$ pm 317,14

Calculada:	C	41,66	H	4,13	N	8,83
Encontrada:	C	42,14	H	4,22	N	8,54
		42,19		4,31		8,57

Esquema 3A

El esquema 3A ilustra como sintetizar un nucleósido(4) uracilo 5-sustituido por Yodo (I) comenzando con el nucleósido uracilo biciclo [3.1.0]hexano (2).



ES 2 332 580 T3

Compuesto 10

Una disolución agitada de 8 (0,164 g, 0,5 mmoles), I₂ (0,254 g, 1,0 mmoles) y HNO₃ 1 N (0,5 ml) en dioxano (5 ml) fue calentado a 100°C durante 1 h. Concentrado *in vacuo* y reconcentrado con etanol (3 x 5 ml) y cloroformo (3 x 10 ml) 10 (0,191 g de sólido blanco, 84%, mp 85-88°C, R_F 0,6 (EtOAc)) fue obtenido mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de 50% EtOAc/hexano y EtOAc.

Analizado para C₁₈H₁₉N₂O₄I pm 463.28

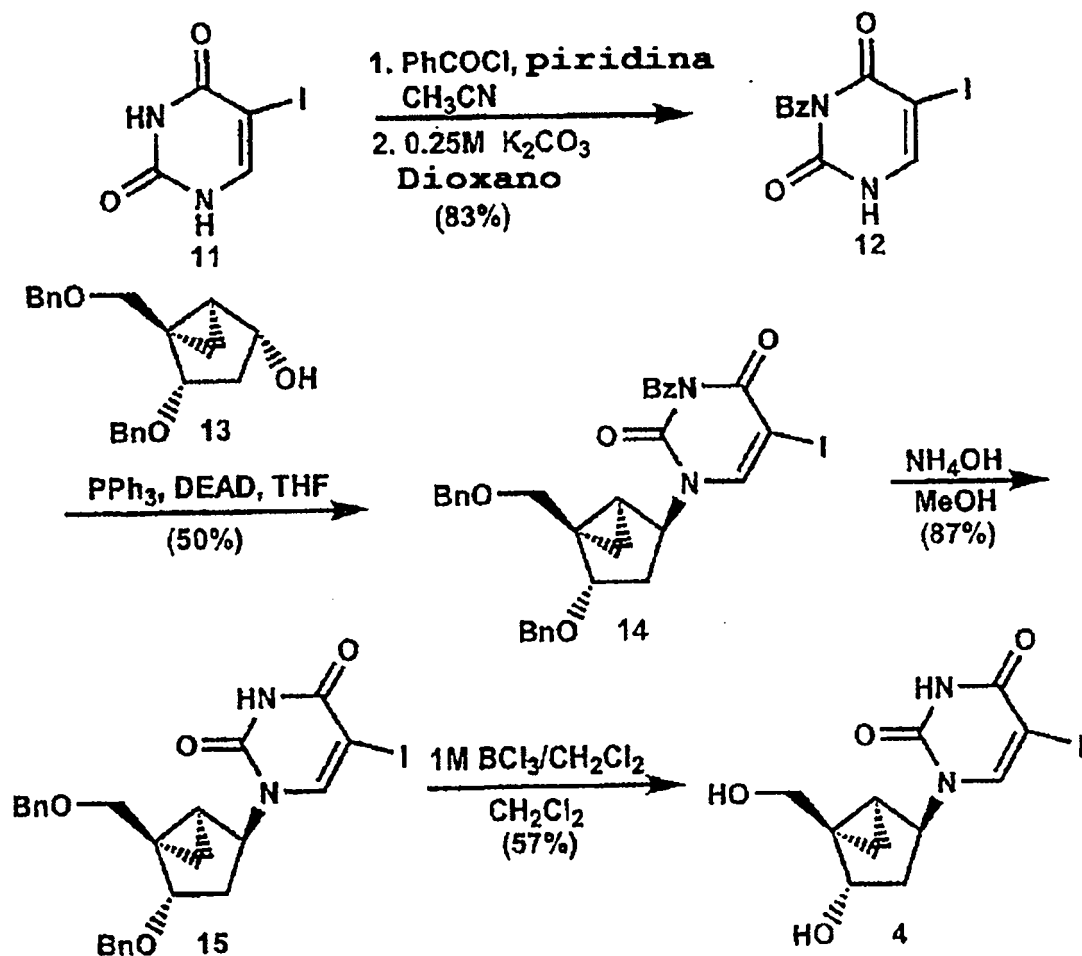
Calculada:	C	46,67	H	4,35	N	6,06
Encontrada:	C	46,24	H	4,22	N	5,89
		46,33		4,18		5,92

Compuesto 4

A una disolución de 10 (0,072 g, 0,16 mmoles) en CH₂Cl₂ (10 ml) enfriado en hielo seco/acetona se añadió 1M BCl₃/CH₂Cl₂ (1,6 ml). Tras 1 h se añadió metanol (3 ml) a la reacción fría. La reacción fue concentrada *in vacuo* y reconcentrada con metanol (3 x 5 ml). La purificación mediante cromatografía flash en gel de sílice usando CHCl₃ y 5% de MeOH/CHCl₃ dio un residuo incoloro que, en tratamiento con Et₂O dio 4 (0,028 g, 50%, mp 229-230°C, α_D²⁰ = 1,5 (C, 0,13, MeOH) MH⁺ 365).

Esquema 3B

El esquema 3B ilustra como sintetizar un nucleósido(4) uracilo 5-sustituido por Yodo (I) vía un acoplamiento Mitsunobu con la base 5-sustituida (11).



ES 2 332 580 T3

Compuesto 12

5 Cloruro de Benzoilo (1,0 ml, 0,009 m) fue añadido gota a gota a una suspensión agitada de 11 (0,95 g, 0,004 m) en piridina (4 ml) y acetonitrilo (10 ml) en atmósfera de Ar a T amb durante 4 días. La reacción fue concentrada *in vacuo* y reconcentrada con tolueno (3 x 20 ml). Dioxano (15 ml) y 0,25m K₂CO₃ (15 ml) fueron añadidos y la reacción agitada a T amb durante 2 h. El dioxano fue eliminado *in vacuo* y la mezcla fue diluida con agua (20 ml). El sólido fue aislado y recrystalizado a partir de 95% etanol para dar 12 (1,13 g, 84%, mp 205-207°C).

10 Compuesto 14

15 Una disolución de DEAD (0,52 ml, 3,31 mmoles) en THF (20 ml) fue añadida gota a gota a una disolución agitada de 12 (1,34 g, 3,92 mmoles), 13 (0,536 g, 165 mmoles) y Ph₃P (0,866 g, 3,31 mmoles) en THF (50 ml) en atmósfera de Ar. La reacción fue agitada durante toda la noche a T amb. Concentrada *in vacuo*. El 14 en bruto fue aislado mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de hexano y 25% EtOAc/hexano. 14 puro (0,117 g, 11%) fue obtenido mediante cromatografías flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de hexano, 25% y 30% EtOAc/hexano como un sólido blanco/cristal. R_F 0,77 (50% EtAc/hexano).

20 Analizado para C₃₂H₂₉N₂O₅I pm 648.50

	Calculada:	C	59,27	H	4,51	N	4,32
25	Encontrada:	C	59,33	H	4,59	N	4,31

Compuesto 15

30 14 (0,110 g, 0,17 mmoles), NH₄OH concentrado (1 ml), y MeOH (14 ml) fue agitado durante 1 h a T amb. Concentrada *in vacuo*. 15 (0,080 g, 87%) un sólido blanco fue obtenido mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de hexano, 25% y 50% EtOAc/hexano.

35 Analizado para C₂₅H₂₅N₂O₄I pm 544.39

	Calculada:	C	55,16	H	4,63	N	5,16
40	Encontrada:	C	55,18	H	4,62	N	5,19

Compuesto 4

45 A una disolución de 15 (0,31 g, 0,057 mmoles) en CH₂Cl₂ (10 ml) enfriada en un baño de hielo seco/acetona se añadió 1,2 ml de BCl₃ 1M/CH₂Cl₂ y la reacción agitada en frío durante 1 h. MeOH (3 ml) fue añadido y la reacción concentrada *in vacuo*. Reconcentrada tres veces con etanol (5 ml). 4 (0,012 g 57% mp 226-227°C, α_D²⁰ = -3 [c, 0,1, MeOH]) fue obtenida mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de CHCl₃ y 5% MeOH/CHCl₃ y después recrystalización de MeOH/CHCl₃.

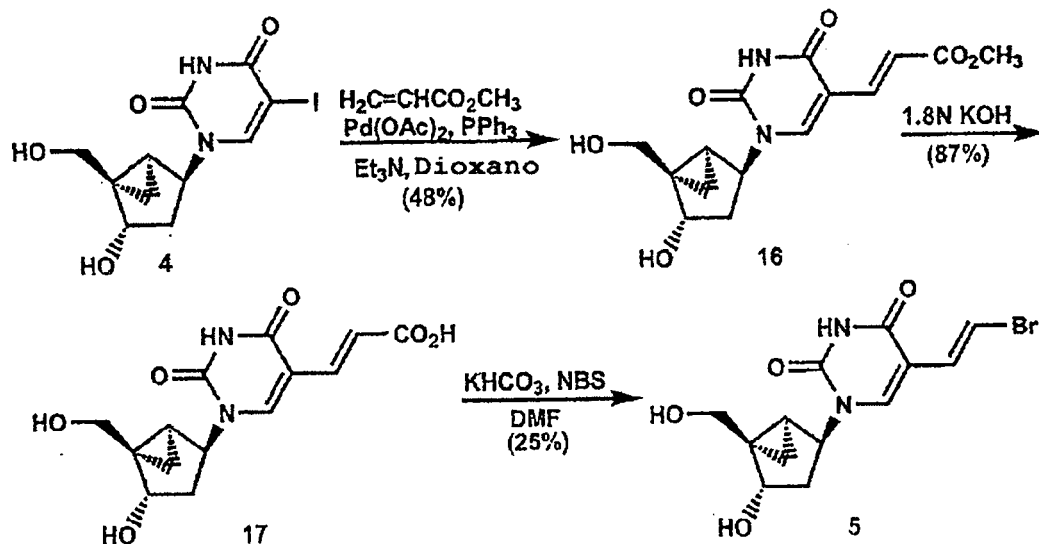
50 Analizado para C₁₁H₁₃N₂O₄I•0,1H₂O pm 365.94

55	Calculada:	C	36,10	H	3,65	N	7,66
	Encontrada:	C	36,08	H	3,74	N	7,44
60			36,13		3,69		7,37

65

Esquema 4

El esquema 4 ilustra como sintetizar un nucleósido uracilo 5-sustituido por Bromovinilo (CH=CH-Br) (5) comenzando con el nucleósido uracilo biciclo [3.1.0]hexano (2).



Compuesto 16

Pd II (OAc)₂ (0,0055 g, 0,025 mmoles) y Ph₃P (0,013 g, 0,050 mmoles) fueron disueltos en dioxano (1 ml) en un vial adaptado con una tapa con una línea de teflón. Dejar reposar durante 10 min, tiempo durante el cual la disolución se volvió roja. Et₃N (0,055 ml, 0,40 mmoles), después metilacrilato (0,110 ml, 1,24 mm), después 4 (0,089 g, 0,247 mmoles), y finalmente dioxano (2 ml) fueron añadidos. El vial sellado y calentado a 78°C durante 4 h. La reacción fue repetida a la misma escala. Las dos reacciones fueron combinadas y concentradas al vacío. La purificación inicial mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de CHCl₃, 5% MeOH/CHCl₃ y 10% MeOH/CHCl₃ separó el 4 sin reaccionar del producto 16.

Usando las mismas condiciones de cromatografía el compuesto 4 sin reaccionar (=,054 g, mp 224-226) fue recuperado. El tratamiento del producto en bruto con EtOAc (2 ml) dio 16 (0,076 g, 48%) cristales blancos, mp 240-241°C. R_F = 0,54 (15% MeOH/CHCl₃), α_D = -2,4 [c, 2,3, MeHO]].

Analizado para C₁₅H₁₈N₂O₆•25H₂O pm 326.32

Calculada:	C	55,21	H	5,56	N	8,58
Encontrada:	C	55,14	H	5,69	N	8,50
		55,15		5,60		8,53

Ref: Herdewijn, P. Y otros, J. Med. Chem. 1985, 28- 550-555.

Compuesto 17

16 (0,165 g, 0,512 mmoles) fue agitado en KOH 1,8 N (2 ml) a lo largo de toda la noche. La reacción fue acidificada con HCl (conc) a pH2 y el sólido fue aislado mediante filtración al vacío. El filtrado fue concentrado *in vacuo* y el residuo triturado con MeOH.

El sobrenadante fue concentrado *in vacuo*. Los sólidos combinados fueron disueltos en metanol hirviendo, filtrado, y el filtrado concentrado *in vacuo* para dar 17 (0,137 g, sólido blanco, 87%, mp 240°C (dec). Usado sin purificación adicional.

ES 2 332 580 T3

Compuesto 5

A una mezcla de 17 (0,12 g, 0,41 mmoles) en DMF (2,5 ml) se añadió KHCO_3 (0,118 g, 1,18, 1,18 mmoles) y después gota a gota una disolución de NBS (0,072 g, 0,41 mmoles) en DMF (1 ML). Agitado a T amb durante 2,5 h. Las sustancias insolubles fueron eliminadas por filtración y el filtrado concentrado *in vacuo*. El compuesto 5 en bruto fue aislado mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de CHCl_3 , 5% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ y 10% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$. El producto 5 fue purificado adicionalmente mediante cromatografía flash en gel de sílice usando una etapa gradiente de CH_2Cl_2 , 5% $i\text{-PrOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ y 10% $i\text{-PrOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ y finalmente por cromatografía flash en gel de sílice en fase inversa C-18 usando agua y 20% MeOH/agua para dar 5 puro (0,035 g, 25% sólido blanco, mp 120-122°C [α]_D = -23 [c, 0,13, MeOH], MH^+ 343/345).

Analizado para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ pm 352.19

Calculada:	C	44,33	H	4,58	N	7,95
Encontrada:	C	44,47	H	4,29	N	7,76
		44,40		4,36		7,78

Método de uso

Los derivados de pirimidina 5-sustituídos de análogos nucleósidos bloqueados conformacionalmente se ha encontrado que poseen propiedades farmacológicas valiosas. Tienen un efecto antiviral. Este efecto puede ser demostrado usando el ensayo de inhibición del efecto citopatógeno y el ensayo de reducción de placas víricas (Tablas 1, 2, y 3).

Así, estos análogos pueden ser usados para tratar infecciones virales, específicamente infecciones de virus ADN incluyendo miembros de la familia de Herpesviridae, especialmente virus del Herpes simplex (HSV), *Varicella zoster* virus (VZV), virus de Epstein Barr (EBV), y Citomegalovirus (CMV) así como miembros de la familia Poxviridae.

Además, los análogos pueden ser usados en terapia génica del cáncer. Activación del profármaco mediada por gen es una aproximación terapéutica para el tratamiento del cáncer. Esta recae en la transferencia en células tumorales de un gen de "suicidio" que codifica una enzima que, a diferencia de las enzimas celulares, es capaz de convertir un fármaco no tóxico en un metabolito tóxico. El sistema más ampliamente investigado combina el gen que codifica la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simplex (HSV) con el ganciclovir (GCV), un análogo nucleosídico. La enzima convierte la prodroga en un metabolito que es incorporado en el ADN de las células en división, que lleva a la terminación de la elongación de la cadena de ADN, resultando en la muerte de la célula. Los autores contemplaron el replazamiento de GCV por análogos nucleósidos bloqueados conformacionalmente 5-sustituídos en el campo de la terapia génica por suicidio celular.

Los compuestos farmacológicamente activos de este invento pueden ser procesados según métodos convencionales de farmacia galénica para producir agente medicinales para la administración a pacientes, por ejemplo, mamíferos incluyendo humanos.

Los compuestos de este invento pueden ser empleados en una mezcla con excipientes convencionales, es decir, sustancias vehículos orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la aplicación parenteral, entérica (por ejemplo, oral) o tópica, que no reacciona nocivamente con los compuestos activos. Los vehículos aceptables farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a agua, disoluciones salinas, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceites perfumados monoglicéridos de ácidos grasos y diglicéridos, ésteres de ácidos grasos pentaeritritol, hidroximetil-celulosa, polivinil pirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas pueden ser esterilizadas y si se desea mezcladas con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humidificadores, emulsionantes, sales para influenciar la presión osmótica, tampones, colorantes, sustancias edulcorantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan de modo nocivo con los compuestos activos. Estos también pueden ser combinados cuando se desea con otros agentes activos, por ejemplo, vitaminas.

Para la aplicación parenteral, particularmente adecuada son inyectables, disoluciones estériles, preferiblemente disoluciones aceitosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones, o implantes, incluyendo supositorios. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes.

Para la aplicación enteral, particularmente adecuadas son tabletas, grageas, líquidos, gotas, supositorios, o cápsulas. Un jarabe, elixir, o similares pueden ser usados siempre que se emplee un vehículo edulcorado.

Composiciones de liberación sostenida o dirigida pueden ser formuladas, por ejemplo mediante inclusión en liposomas o incorporación en un parche epidérmico con un vehículo adecuado, por ejemplo DMSO. Es también posible liofilizar estos compuestos y usar los liofilizados obtenidos, por ejemplo, para la preparación de productos mediante inyección.

ES 2 332 580 T3

Para la aplicación tópica, se emplean formas no pulverizables, de viscosas a semisólidas o formas sólidas que comprenden un vehículo compatible con una aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que agua. Las formulaciones adecuadas incluyen pero no se limitan a disoluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, bálsamos, aerosoles, etc, que son, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares, por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humidificadores, tampones o sales para influen-
5 ciar la presión osmótica, etc. Para aplicación tópica, también adecuadas son las preparaciones en aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un material vehículo sólido o líquido inerte, es empaquetado en una botella flexible o en una mezcla con un propulsor normalmente gaseoso no volátil, por ejemplo, un freón.

10 Generalmente, los compuestos de este invento son dispensados en formas de dosificación unitaria que comprenden 100 mg a 500 mg en un vehículo farmacéuticamente aceptable por una dosificación unitaria. Estos se incorporan en formulaciones tópicas en concentraciones de alrededor de 2% a 10% en peso.

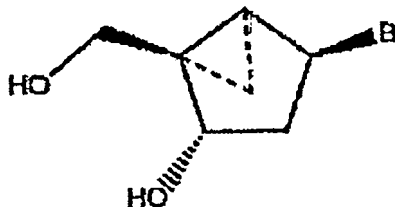
15 La dosificación de las composiciones según este invento es generalmente 10 mg/kg/día a 50 mg/kg(día, cuando se administra a pacientes, por ejemplo, humanos, para tratar infecciones virales análogamente al agente conocido aciclovir.

20 Se apreciará que las cantidades reales preferidas de compuesto activo en un caso específico variará según el compuesto específico que es utilizado, las composiciones formuladas, el modo de aplicación, y el sitio particular y el organismo a ser tratado. Las dosis para un hospedante dado, pueden ser determinadas usando consideraciones convencionales, por ejemplo, por comparación habitual de las actividades diferenciales de los compuestos sujetos y de un agente conocido, por ejemplo, por medio de un protocolo farmacológicamente apropiado, convencional.

25 Las composiciones pueden, si se desea, ser presentadas en un paquete o dispositivo dispensador, que pueden contener uno o mas formas de dosificación unitaria que contiene el ingrediente activo. El paquete puede por ejemplo comprender papel de aluminio o plástico, tal como los paquetes para ampollas (blister pack). El paquete o dispositivo dispensador puede ser acompañado por instrucciones para su administración.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado pirimidina 5-sustituido de un análogo nucleosídico bloqueado conformacionalmente que tiene la fórmula:



en la que B es un derivado de uracilo 5-sustituido, en el que el 5-sustituyente es I, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHF}$, $\text{CH}=\text{CHCl}$, $\text{CH}=\text{CHBr}$ o $\text{CH}=\text{CHI}$.

2. El análogo nucleosido de la reivindicación 1, que es un nucleosido de uracilo 5-sustituido por yodo.

3. El análogo nucleosido de la reivindicación 1, que es un nucleosido de uracilo 5-sustituido por Bromovinilo.

4. Un método para ensayar el análogo nucleosido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en lo que respecta a su actividad antiviral que comprende la etapa de medir el efecto en un ensayo de inhibición del efecto citopatogénico.

5. Un método para ensayar el análogo nucleosido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la actividad antiviral que comprende la etapa de medir su efecto en un ensayo de reducción de placas virales.

6. Un método para hacer el análogo nucleosido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende la etapa de combinar un resto pirimidina 5-sustituido con un molde biciclo [3.1.0] hexano.

7. Un método para hacer el análogo nucleosido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende la etapa de proceder vía acoplamiento Mitsunobu con una base 5-sustituida.

8. Usar un compuesto de cualquier de las reivindicaciones 1-3, en un vehículo farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para tratar infecciones virales en un individuo con necesidad del mismo.

9. El uso de la reivindicación 8, en el que dicha infección viral es seleccionada a partir de grupo que consiste en virus del Herpes simplex (HSV), virus de *Varicella zoster* (VZV), virus de Epstein Barr (EBV), y citomegalovirus (CMV).

10. El uso de la reivindicación 8, en el que la etapa de administración del medicamento es parenteral, entérica, tópica, o de liberación sostenida o dirigida.

11. El uso de la reivindicación 8 en el que la cantidad eficaz del compuesto es alrededor de 100 mg a 500 mg por dosificación unitaria.

12. El uso de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un vehículo farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para terminar la elongación de la cadena de ADN en las células de un individuo con necesidad del mismo.

13. El uso de la reivindicación 12 en el que dichas células son modificadas para expresar una timidina quinasa del virus del Herpes simplex.

14. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquier de las reivindicaciones 1-3 en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Una paquete que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en forma de dosificación unitaria.